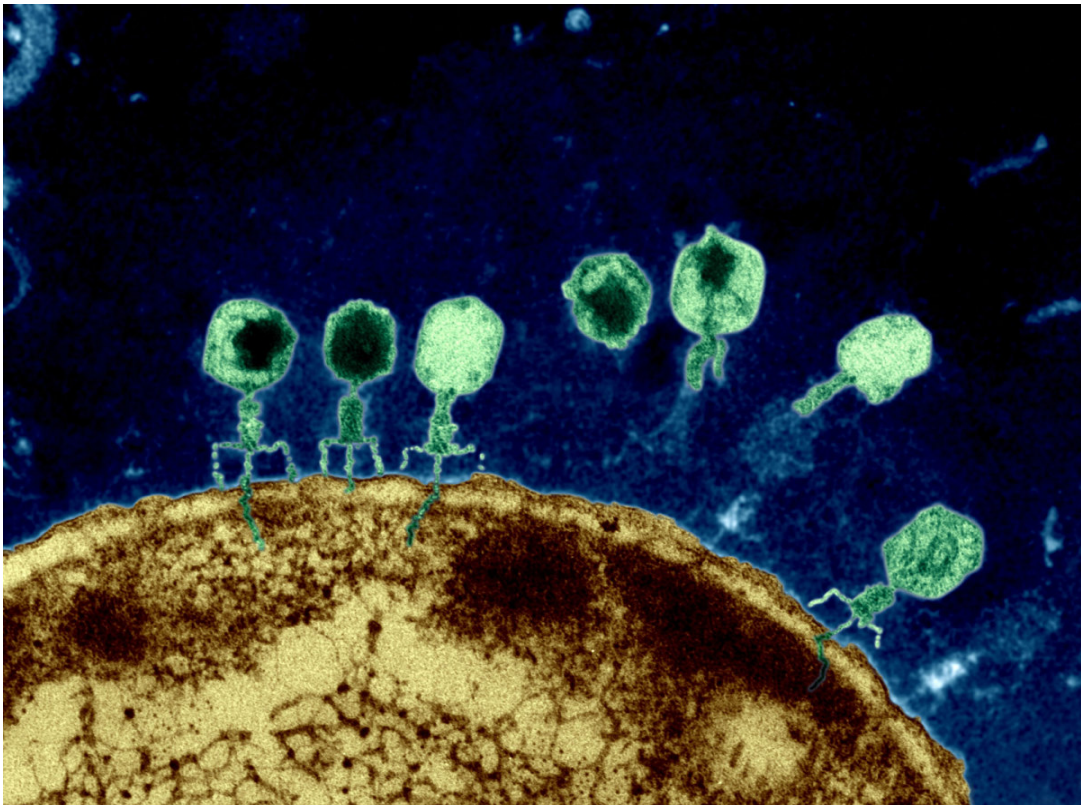


Fagoteràpia com a possible alternativa al tractament amb agents antimicrobians sintètics



Pseudònim: oreneta feliç

2n Batxillerat A

Curs: 2016-2017

Data: 21/12/2016

Agraïments

M'agradaria expressar un fort agraïment a totes aquelles persones que s'han involucrat amb el treball, ja sigui tant de manera directa com indirecta. Especialment, voldria donar les gràcies a la professora Imma Vicens Capdevila, la meva tutora, ja que des del primer moment m'ha aconsellat en l'acotació del tema de la recerca, així com també m'ha ajudat a fer front a totes les preocupacions i dificultats que se'm presentaven al llarg de l'elaboració del treball.

També trobo necessari el meu més sincer agraïment a la doctora Susana Campoy Sánchez, la qual ha estat la meva tutora durant la realització del disseny experimental a la Universitat Autònoma de Barcelona. Així mateix, també em complauria donar les gràcies al doctor Sylvain Moineau per haver contestat l'entrevista tan amablement.

Finalment, vull regradar als meus pares i a la meva germana, per tot el suport moral en els moments més difícils i estressants patits al llarg del desenvolupament del treball.

ÍNDIX

1. Abstract.....	5
2. Introducció.....	6

MARC TEÒRIC:

3. Fagoteràpia	
3.1. El concepte de fagoteràpia.....	8
3.2. Història de la fagoteràpia. Descobriment dels bacteriòfags.....	8
3.3. Bacteriòfags.....	10
3.3.1. Estructura i composició.....	11
3.3.2. Tipus de bacteriòfags segons el procés infectiu.....	12
3.3.2.1. Bacteriòfags lítics o virulents.....	12
3.3.2.2. Bacteriòfags lisogènics o atenuats.....	13
3.3.3. Tipus de processos infectius i de multiplicació.....	13
3.3.3.1. Reproducció de bacteriòfags lítics (cicle lític).....	13
3.3.3.2. Reproducció de bacteriòfags atenuats (cicle lisogènic o cicle lític).....	15
3.3.4. Bacteriòfags adients per la fagoteràpia.....	16
3.3.5. Còctel de bacteriòfags.....	17
3.3.6. Aïllament de bacteriòfags.....	17
3.3.6.1. Aïllament de bacteriòfags virulents.....	18
3.3.6.2. Aïllament de bacteriòfags atenuats.....	18
3.3.6.3. Aïllament de mutants virulents de bacteriòfags atenuats.....	19
3.4. Aplicació al cos del pacient.....	19
3.5. Altres usos de la fagoteràpia.....	19
3.6. Avantatges i inconvenients.....	20

4. Antibiótics

4.1. El concepte d'antibiòtic.....	22
4.2. Resistència adquirida als antibiòtics	22

DISSENY EXPERIMENTAL:

Bases teòriques.....	24
Pràctica 1: Tinció diferencial (gram).....	26
Pràctica 2: Test de la gota.....	28
Pràctica 3: Observar les calbes que fan els bacteriòfags.....	31
Pràctica 4: Determinar el nombre de bacteriòfags que hi ha en una calba.....	36
Pràctica 5: Comparació de l'eficàcia i l'eficiència entre els bacteriòfags i els antibiòtics.....	39
Entrevista a l'investigador Sylvain Moineau (en francès).....	46
5. Conclusió.....	49
6. Opinió personal.....	49
7. Bibliografia i llocs web.....	50

1. ABSTRACT

"Phage therapy as a possible alternative to synthetic antimicrobial drugs"

Oreneta felix and mentor, Microbiology

Due to the increasing antibiotic resistance our bacteria are acquiring, there is the necessity to find out new therapies which could complement or even substitute antimicrobial agents in order to end up with the cells that cause infections to our organism. The main aim of this research project is to compare the efficacy of the treatment based on bacteriophages with the one based on antibiotics, not only in the sense of lysing bacteria but also in the sense of knock-on effects, the price, and some others. So as to be able to try to corroborate my hypothesis, which is that maybe phage therapy is better than antibiotics when combating uncontrolled and undesired bacteria, there have been carried out many experiments in the lab and also an interview with the Canadian microbiologist Sylvain Moineau, from the Laval University in Quebec, Canada, who is the Canadian's research chair in bacteriophages and the curator of the world's largest public collection of bacteriophages.

2. INTRODUCCIÓ

El treball de recerca que s'ha d'elaborar durant l'etapa del batxillerat, tal i com el seu nom indica, és un treball que té la finalitat de que l'alumne dugui a terme una investigació sobre un tema concret que li interessi, posant en pràctica les tècniques d'aprenentatge adquirides al llarg dels anys. És un treball que d'una manera o altra prepara a l'alumne per als anys posteriors, doncs aquest aprèn a espavilar-se de manera autònoma en molts aspectes.

Sóc una persona molt curiosa i des de sempre he trobat apassionant el món de la investigació, ja que penso que la recerca d'avui és el futur de demà. Així doncs, després de varies setmanes reflexionant sobre quin tema podia ser el més adient, em vaig decantar cap a la fagoteràpia.

Solament llegint el títol del present treball, el qual és "Fagoteràpia com a possible alternativa al tractament amb agents antimicrobians sintètics", ja es pot tenir una idea general del tipus d'informació que pot contenir aquest.

D'ençà el descobriment del primer dels antibiòtics, la penicil·lina, a principis del segle XIX, que l'ús dels agents antimicrobians ha estat sempre el tractament més emprat per combatre les malalties provocades per bacteris. És cert que l'ús d'aquests ha contribuït en la reducció de la mortalitat, sobretot durant el segle passat, però en els últims anys, el seu consum s'ha popularitzat tant, que no només s'utilitzen per eliminar o impedir la multiplicació de les diferents classes de bacteris patògens sinó que també s'utilitzen, per exemple, per combatre simples constipats que, a més, són causats per virus i no per bacteris.

La gran major part de persones que fan un mal ús dels antibiòtics no són conscients que cada vegada les nostres cèl·lules bacterianes s'estan fent més resistents a ells, fins tal punt que ja n'hi ha un nombre bastant considerable que són resistents a absolutament tots els antibiòtics existents. Així doncs, si tot segueix com fins ara, que s'abusa massa de tot el que funciona, acabarà passant factura, i quan realment s'estarà patint alguna infecció bacteriana seria, no es podrà fer cap tipus de tractament amb antibiòtics ja que aquests no curaran. Per tant, tenint en compte el poc grau de consciència que té la població sobre els efectes tan perjudicials provocats per aquest mal ús, actualment s'estan duent a terme un seguit d'investigacions per tal d'intentar trobar alternatives als antimicrobians, i una d'elles és la fagoteràpia, que es basa en la utilització d'uns virus anomenats bacteriòfags, que infecten única i exclusivament bacteris i, en molts casos, els maten.

Atenent a aquesta breu contextualització, sorgeix la hipòtesi que potser el tractament per tal de combatre malalties infeccioses provocades per bacteris patògens mitjançant l'ús dels bacteriòfags és més efectiu que el tractament que es fa a partir dels antibiòtics.

A més, el treball gira entorn d'un objectiu molt clar: comparar el grau d'eficàcia i d'eficiència que presenta la fagoteràpia respecte el tractament amb agents antimicrobians sintètics per tal de veure si realment l'ús dels bacteriòfags és una bona i millor alternativa a aquests. No obstant, també cal destacar objectius de caire més genèric, els quals són endinsar-se en el món de la fagoteràpia per conèixer més detalladament el funcionament d'aquest tractament, la seva història, l'aïllament de bacteriòfags, les diferents aplicacions que presenta, i els avantatges i inconvenients que té, així com també contactar amb experts en el tema.

En el marc teòric del treball s'exposen diferents conceptes la majoria dels quals són imprescindibles per poder entendre la base del tema de treball i per poder realitzar el disseny experimental.

Per tal d'intentar corroborar la hipòtesi plantejada, s'han dut a terme una sèrie d'experiències, les quals una seguida de l'altra permeten arribar a l'experiment final, que està directament relacionat amb l'objectiu principal suscitat. A més, s'ha pogut fer una entrevista a l'investigador canadenc reconegut a nivell mundial Sylvain Moineau, la recerca del qual se centra en els bacteriòfags, que per casualitat, és el pare d'un amic que vaig conèixer fruit d'una estada de tres mesos a l'estranger.

MARC TEÒRIC

3. FAGOTERÀPIA

3.1 El concepte de fagoteràpia

La fagoteràpia, també coneguda amb el nom de teràpia fàgica, podria ser una possible alternativa als antibiòtics la recerca de la qual està sent cada vegada més desenvolupada en els laboratoris d'avui en dia. Es basa en l'ús terapèutic d'un tipus de virus anomenats bacteriòfags o senzillament fags, amb la finalitat de tractar infeccions causades per patògens bacterians. Aquesta possible alternativa consisteix en la introducció de bacteriòfags a l'interior dels bacteris patògens per tal que aquests en quedin infectats com a conseqüència de la reproducció del virus i, per tant, es produeixi la mort d'aquestes cèl·lules bacterianes.

El concepte de fagoteràpia es pot veure molt ben reflectit en el següent proverbi: L'enemic del nostre enemic és el nostre amic (Chanakya, aproximadament entre els anys 350 i 282 aC.).

Aquesta cita d'origen indi desenvolupa el concepte pel qual dos objectes que tenen un enemic en comú, haurien de poder treballar junts per tal d'obtenir una victòria conjunta contra l'enemic. Per tant, atenent a aquest significat, es podria considerar que el bacteriòfag és l'enemic del nostre enemic, el qual és el bacteri, doncs l'infecta fins a produir-li la lisi¹, mentre que al mateix temps, el bacteriòfag és el nostre amic, ja que atura l'existència i la reproducció de bacteris patògens els quals provoquen malalties infeccioses al nostre organisme.

3.2. Història de la fagoteràpia. Descobriment dels bacteriòfags

La història de la fagoteràpia està directament relacionada amb el descobriment dels bacteriòfags. Abans que aquests fossin descoberts oficialment, cap a l'any 1890, van haver-hi alguns bacteriòlegs que van observar unes substàncies que els semblava que podien ser responsables de limitar l'activitat bacteriana. No obstant, no van ser capaços d'identificar de què es podia tractar. Tot i que aquests científics van desvestir un nou fenomen, cap d'ells no va voler anar gaire més enllà, i les investigacions sobre aquest van quedar estancades. El britànic Ernest Hanbury Hankin va ser un d'aquests científics. L'any 1896 va detectar una activitat bactericida provocada per l'acció de bacteriòfags a l'Índia. Més concretament, al riu Ganges i al seu afluent

¹ Procés de ruptura de la membrana cel·lular (d'un bacteri, en aquest cas) formada per fosfolípids que provoca la sortida del material intracel·lular. (Extret de: dlc.iec.cat, editat)

Yamuna. El factor antimicrobià podia ser filtrat a través d'un filtre molt fi de porcellana, el qual retenia els bacteris, però en sotmetre els agents antimicrobians a altes temperatures, la seva activitat desapareixia. Aquest científic va estudiar malalties com la malària, el còlera, entre altres, i va adonar-se que l'activitat bactericida que hi havia va tenir un paper important en la restricció del còlera, malaltia provocada pel bacteri *Vibrio cholerae*.

No va ser fins l'any 1915 que l'investigador anglès Frederick Twort es va topar amb el mateix fenomen i va avançar la hipòtesi que podia tractar-se d'un virus per les característiques que aquest presentava. Malauradament, el fet que la Primera Guerra Mundial (1914-1918) esclatés i, la conseqüent manca de capital, van fer retirar a Twort de la investigació.

No obstant, dos anys després, el 1917, a l'Institut Pasteur de París, a França i, de manera independent, el microbiòleg francocanadenc Félix d'Herelle va ser qui va anar investigant sobre aquella substància tan desconeguda fins tal punt que va descobrir la utilitat que tenia com a agent antimicrobià. Ell ho feia amb la finalitat de trobar una vacuna que pogués combatre la crisi de la disenteria hemorràgica, malaltia provocada pel bacteri *Shigella*, que va aparèixer al mateix país on investigava el 1915. Mentre realitzava aquells estudis, va observar que després d'aïllar soques² de bacteris de la matèria fecal dels malalts que patien disenteria, els bacteris eren eliminats per uns agents desconeguts. Després que



Figura 1. Félix d'Herelle, descobridor oficial dels bacteriòfags. (Font: Norkinvirology.com)

Herelle ingerís una preparació de suposats bacteriòfags i confirmés la seva seguretat, va experimentar amb un nen de 12 anys que patia la malaltia a l'hospital Enfants-Malades de París, tot administrant-li una preparació d'aquella substància desconeguda i el resultat va ser molt positiu, ja que el nen es va recuperar al cap de pocs dies. Corroborant la hipòtesi de Twort, que aquella substància desconeguda efectivament es tractava d'un virus, va veure que era infinitament més potent contra els bacteris que tots els altres tractaments coneguts fins aquell moment. Herelle va posar-li el nom de bacteriòfag; de la paraula bacteri i de la paraula grega "phagein", la qual significa menjar o devorar. Tenint en compte l'efectivitat que tenien els bacteriòfags atacant els bacteris, es va desenvolupar la teràpia fàgica, un tractament terapèutic

²Conjunt de cultius purs derivats d'un sol aïllament primari. (Extret de: dlc.iec.cat)

dissenyat per aprofitar la destrucció que provocaven els bacteriòfags als bacteris patògens. Aquesta teràpia va ser la més predominant a l'Europa Occidental fins l'any 1928, en el qual va tenir lloc el descobriment del primer antibiòtic, la penicil·lina, per Alexander Fleming. A més, existien altres motius pels quals aquesta teràpia va deixar d'utilitzar-se, com per exemple, el fet de dissenyar de manera errònia protocols experimentals, el desconeixement de la biologia dels bacteriòfags i la manca de controls adequats que demostrassin que s'estava treballant amb bacteriòfags de cicle lític i no lisogènic, entre altres. No obstant, durant la Segona Guerra Mundial (1939-1945), la teràpia basada en l'ús dels bacteriòfags va seguir en peu als Estats Units i, sobretot, a l'antiga Unió Soviètica, on encara avui s'utilitza. Per tant, es pot dir que entre els anys 1920 i 1950 va tenir lloc l'era històrica de la fagoteràpia.

3.3. Els bacteriòfags

Els bacteriòfags, també coneguts amb el nom de fags, són uns virus que infecten exclusivament bacteris. És caracteritzat pel fet que són incapaços de reproduir-se per ells mateixos, de tal manera que per fer-ho, necessiten infectar una cèl·lula hoste³ que, en el seu cas, són els bacteris. Per tal que la seva multiplicació sigui possible, han d'introduir el seu material genètic, ja sigui DNA o RNA, mai els dos, doncs si en tenen un no tenen l'altre, a l'interior dels bacteris i, en molts casos, es produeix una lisi d'aquests. Per tal que es realitzi el cicle d'infecció, cal que el bacteriòfag s'apodori de la maquinària bacteriana biosintètica per a la posterior replicació. És per aquest motiu que no poden sobreviure si no és en presència de cèl·lules metabòlicament actives. Així doncs, atenent a la infecció que provoquen als bacteris patògens, aquests virus es poden considerar els seus enemics naturals. A més, cal destacar que el fet que hagin evolucionat conjuntament per tal de poblar tots els ambients, ha suposat la creació d'una especificitat molt gran vers ells: cada tipus de bacteriòfag infecta únicament un tipus de bacteri concret.

Els bacteriòfags tenen una mida molt petita; en general, oscil·len entre els 60 nm els més petits i els 300 nm els més grans, i són molt abundants al planeta. De fet, constitueixen l'entitat biològica més extensa i diversificada de la Terra: s'estima que el seu nombre total és de 10^{31} i que n'hi ha 10 milions d'espècies diferents. Es troben en una gran quantitat de llocs; allà on hi hagin bacteris, també hi hauran presents bacteriòfags. És per aquest motiu que es poden trobar ja sigui al fang, a l'interior de les plantes i els animals i als oceans, entre altres.

³ Organisme que alberga un altre organisme. (Extret de: www.ca.unionpedia.com, editat)

3.3.1. Estructura i composició

A grans trets, les diferents parts que un virus de qualsevol tipus pot tenir les pot englobar la càpsida, una estructura simètrica formada per proteïnes que embolcallen l'àcid nucleic (genoma víric). El conjunt de la càpsida i el genoma víric s'anomena nucleocàpsida. En funció de la disposició de les proteïnes globulars, conegudes amb el nom de capsòmers, la càpsida de cada tipus de virus bacteriòfag serà d'una manera o d'una altra: isomètrica (generalment icosaèdrica), helicoïdal (per a fags filamentosos) o complexa. Com a mínim un 96% dels bacteriòfags presenten una càpsida complexa i tan sols un 4% la tenen helicoïdal o isomètrica.

-Càpsida complexa:

És un tipus de càpsida que es caracteritza per aparèixer en la gran majoria de bacteriòfags i es compon de dues parts: un cap polièdric en el qual hi ha present l'àcid nucleic embolcallat per una càpsida de proteïnes, i una cua que serveix com a lloc de pas de l'àcid nucleic a l'hora de la infecció de la cèl·lula bacteriana, i que està adaptada per a la injecció del genoma víric a l'interior d'aquesta.

•El cap:

Una característica important que es troba en els bacteriòfags és el fet que com a material genètic, poden tenir o bé DNA o bé RNA, però mai els dos a la vegada. Si tenen DNA, pot ser que sigui ds DNA (cadena doble) o ss DNA (cadena simple). El mateix passa amb l'RNA; pot ser que tinguin ds RNA (cadena doble) o ss RNA (cadena simple). Sigui quin sigui el genoma víric, sempre es trobarà al cap, recobert per una sèrie de còpies d'un o més tipus de proteïnes. Per tant, aquestes actuen com una coberta protectora del genoma víric: el protegeixen de l'acció de nucleases⁴ i altres factors del medi extern. A més, el conjunt de totes aquestes proteïnes que formen l'embolcall del genoma víric té altres funcions que corresponen a l'activitat enzimàtica, la virulència, entre altres.

•La cua:

És una estructura relativament llarga formada per proteïnes que serveix de canal conductor del material genètic a l'hora de la infecció de la cèl·lula hoste. A més, adherida a ella, presenta una placa basal en la qual hi ha unes espines basals i en la qual s'uneixen unes fibres caudals que

⁴Enzim que hidrolitza parcialment els àcids nucleics i els descompon en nucleòtids. (Extret de: www.encyclopedia.cat)

ajuden a assegurar el virus a subjectar-se a la cèl·lula amfitriona durant la invasió de la mateixa. Aquests tres components també estan formats per proteïnes.

En funció de com sigui la cua dels bacteriòfags pertanyeran a una família o a una altra:

- *Myoviridae*: presenten cues llargues i contràctils. Exemple: fag T4.
- *Siphoviridae*: presenten cues llargues i no contràctils. Exemple: fag λ .
- *Podoviridae*: presenten cues curtes i contràctils. Exemple: fag T3 i T7.

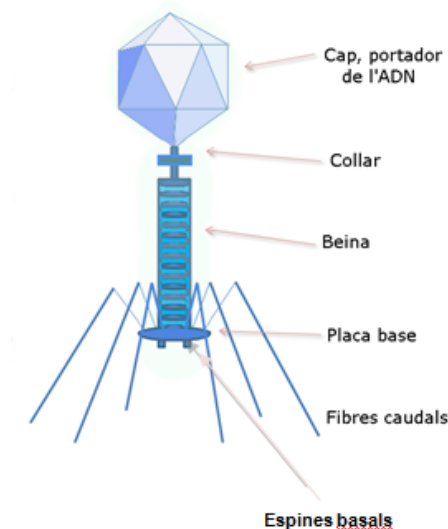


Figura 2. Estructura del bacteriòfag T4 .
(Font: *Viquipèdia.org*, editat)

3.3.2. Tipus de bacteriòfags segons el procés infectiu

En funció del cicle que duguin a terme els bacteriòfags a l'hora d'infectar la cèl·lula hoste n'hi ha de dos tipus: els lítics i els lisogènics.

3.3.2.1. Bacteriòfags lítics o virulents:

Els bacteriòfags lítics o virulents són aquells que es multipliquen dins el bacteri al qual infecten i li produeixen una lisi al final del procés infectiu, alliberant les noves partícules víriques produïdes anomenades virions⁵. Aquest tipus de bacteriòfags són els que realitzen un cicle lític.

⁵Virus madur format per un nucli central amb DNA o RNA, envoltat per una càpsida i amb característiques antigèniques que pot constituir, en alguns casos, un virus complet. (Extret de: www.enciclopèdia.cat)

3.3.2.2. Bacteriòfags lisogènics o atenuats:

Els bacteriòfags lisogènics o atenuats són aquells que després d'infectar la cèl·lula hoste, no li produeixen una lisi, sinó que continuen convivint amb ella. És a dir, hi ha una simbiosi. El genoma víric, en aquest moment de la infecció, es troba en estat de pròfag⁶, ja que no es va reproduint a l'interior del bacteri infectat per si sol sinó que ho fa al mateix temps que es replica el material genètic bacterià. D'aquesta manera, el genoma víric es va transmetent a les cèl·lules filles del bacteri de manera hereditària. No tots els bacteriòfags lisogènics han d'infectar els seus hostes durant tot el seu cicle biològic de manera lisogènica, doncs a vegades, aquests bacteriòfags poden entrar a fer un cicle lític i, ara sí, destruir la cèl·lula bacteriana a la qual infecten. El pas de fer un cicle lisogènic a fer-ne un de lític pot donar-se de manera espontània o pot estar provocat per factors externs.

3.3.3. Tipus de processos infectius i de multiplicació

El tipus de cicle que duen a terme els bacteriòfags a l'hora d'infectar la cèl·lula bacteriana i de multiplicar-se dins seu, és d'una manera o d'una altra segons si els fags són virulents o atenuats. En el cas dels virus bacterians, aquest procés d'infecció i de posterior multiplicació dura entre 20 i 30 minuts. Existeixen dos cicles diferents: el lític i el lisogènic.

3.3.3.1. Reproducció de bacteriòfags lítics (cicle lític)

El cicle lític és aquell en què els bacteriòfags de tipus lític o virulent infecten la cèl·lula bacteriana produint-li la lisi al final del procés. Aquest cicle consta de les següents fases:

1. Absorció i fixació:

En primer lloc, el bacteriòfag es fixa a la superfície del bacteri que vol infectar. Això és possible gràcies a les fibres caudals presents a la cua del fag i als receptors específics que presenta la paret bacteriana.

2. Injecció del material genètic víric:

Seguidament, té lloc la fase de penetració, en la qual l'àcid nucleic víric entra a l'interior de la

⁶Estat del fag en el qual el DNA no es troba integrat en una regió determinada d'un cromosoma d'una cèl·lula hoste, sense que es pugui diferenciar de la resta del material cromosòmic, i és transmès en les successives divisions cel·lulars a les cèl·lules filles. (Extret de: www.encyclopèdia.cat)

cèl·lula hoste mitjançant una perforació que el mateix virus realitza a partir d'uns enzims.

3. Replicació del genoma víric:

En aquesta fase, el virus bacteriòfag utilitza el bacteri en profit seu. Degrada el DNA bacterià gràcies a uns enzims propis, i té lloc una replicació del material genètic víric. Aquesta fase es pot dividir en dues:

- Fase precoç: té lloc una desorganització ràpida del funcionament cel·lular i una reorientació cap a la síntesi dels constituents vírics. Entren en funcionament mecanismes destinats a la síntesi dels elements que composaran el bacteriòfag. S'aturen els processos sintètics del bacteri, i la seva informació genètica no és utilitzada ja que un enzim ha destruït els seus cromosomes. El bacteri tampoc pot sintetitzar proteïnes, ja que la traducció de l'RNAm s'ha aturat en el moment de la infecció. Ara, tan sols és reconegut l'RNAm víric, de tal manera que té lloc la síntesi de proteïnes del DNA del fag.

- Fase tardana: té lloc la replicació del DNA del bacteriòfag en la qual hi participen alguns enzims sintetitzats en la fase precoç, com ara el DNA-polimerasa, entre altres.

4. Fabricació de tots els components de la càpside:

Aquesta fase del procés també és coneguda amb el nom de fase d'eclipse. El virus aprofita la maquinària enzimàtica de la cèl·lula hoste per produir les diferents proteïnes que constituïran la càpside (el cap), les fibres caudals, la placa basal i les espines basals. La síntesi de cada component proteic es realitza separatament. Es pot anomenar fase d'eclipse perquè durant aquest període no s'observa el bacteriòfag com a tal a l'interior de la cèl·lula bacteriana.

5. Maduració i empaquetament:

Totes les partícules víriques s'empaqueten per tal de formar una única partícula vírica madura capaç d'infectar una altra cèl·lula quan sigui alliberada.

6. Lisi i alliberament de les noves partícules víriques:

En aquesta fase és quan es pot dir que realment té lloc la lisi de la membrana cel·lular bacteriana. L'acció d'enzims com les amidases o els lisozims, són els encarregats de la destrucció de la paret del bacteri. D'aquesta manera, els virions formats durant les fases anteriors poden ser alliberats a l'exterior i infectar un altre bacteri.

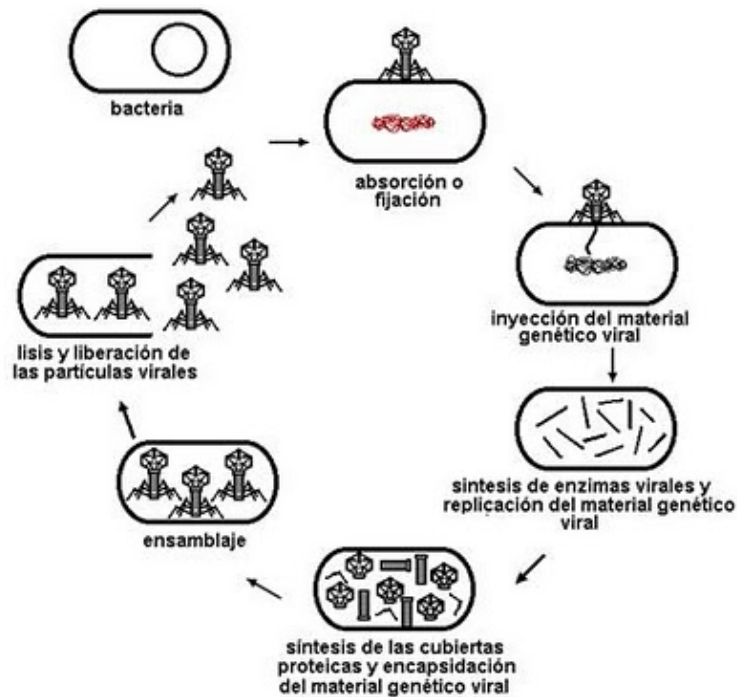


Figura 3. Representació gràfica de la reproducció de bacteriòfags virulents.
(Font: Escuelapedia.com)

3.3.3.2. Reproducció de bacteriòfags atenuats (cicle lisogènic o cicle lític)

Els bacteriòfags atenuats o lisogènics no produeixen la destrucció de la cèl·lula bacteriana a la qual infecten, tot i que en alguns casos, tan sols 1 de cada 100.000 bacteriòfags lisogènics, pot deixar de fer un cicle lisogènic per fer-ne un de lític. El cicle de reproducció dels bacteriòfags lisogènics consta de les següents fases:

1. Absorció i fixació:

Aquesta primera fase de la reproducció de bacteriòfags atenuats és equivalent a la primera fase de la reproducció de bacteriòfags virulents.

2. Injecció del material genètic víric:

El genoma víric penetra a l'interior del bacteri que infecta mitjançant una perforació que el mateix virus realitza a partir d'uns enzims determinats. En primer lloc, el material genètic del bacteriòfag es troba en forma circular fora dels cromosomes de la cèl·lula hoste. Seguidament, el material genètic del bacteriòfag s'introdueix a l'interior del bacteri i s'uneix al seu cromosoma produint un pròfag, en el cas que opti per fer un cicle lisogènic. En aquest moment, el

bacteriòfag fa la simbiosi amb el bacteri; conviu amb ell. El bacteri es va reproduint amb la característica que els seus successors contenen material genètic víric, perquè aquest es troba a l'interior dels cromosomes bacterians.

La cèl·lula pot romandre en estat de pròfag durant molt temps, fins que pot donar-se el cas que per unes determinades condicions, com ara: el dany del DNA bacterià, la manca de nutrients, els canvis de temperatura, els raigs ultraviolats, els agents químics mutàgens, etc., el DNA víric es separi del pròfag i tingui lloc el cicle lític.

La fase de la replicació del genoma víric (3), seguida per la de la fabricació de tots els components de la càpside (4), la de la maduració i empaquetament (5) i per últim, la de la lisi i alliberament de les noves partícules víriques (6), són equivalents a les que componen la reproducció de bacteriòfags virulents.

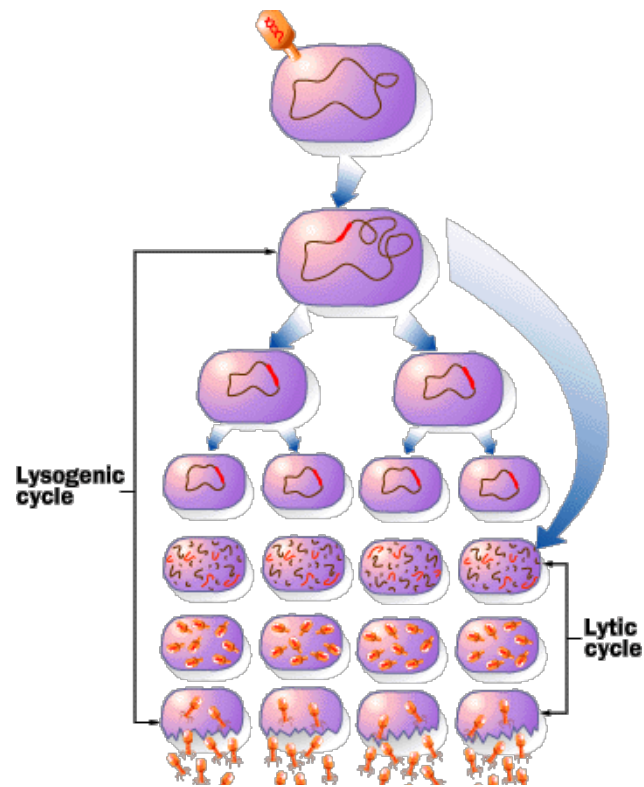


Figura 4. Representació gràfica de la reproducció d'un bacteriòfag atenuat. (Font: Science-HowStuffWorks.com)

3.3.4. Bacteriòfags adients per la fagoteràpia

Tenint en compte les grans i importants diferències que presenten els dos tipus de cicles diferents de reproducció de bacteriòfags en funció de quina classe de bacteriòfag es tracti; lític o lisogènic, només hi ha un sol tipus de virus apte per dur a terme la teràpia fàgica.

Els bacteriòfags adients per aquesta teràpia són els virulents, ja que a l'hora de multiplicar-se i infectar la cèl·lula hoste es basen únicament en fer un cicle lític, la qual cosa vol dir que fan que tingui lloc la destrucció completa de la cèl·lula bacteriana. D'aquesta manera, s'evita la lisogenització i la conversió fàgica que presenten els bacteriòfags atenuats, que enlloc de produir-li la lisi al bacteri que infecten, en la majoria de casos, conviuen amb ell, tot injectant el seu material genètic al seu interior. Tot i que algunes vegades el fag atenuat passi a fer un cicle lític per determinades condicions, no es garanteix que absolutament tots els fags atenuats hagin d'acabar duent a terme un cicle lític, per la qual cosa els bacteriòfags d'aquest tipus no són aptes per la fagoteràpia, doncs no és segur al 100% que acabin produint la destrucció completa de la cèl·lula hoste.

3.3.5. Còctel de bacteriòfags

Tot i que el grau de resistència que podrien arribar a adquirir els bacteris quan són infectats per fags és molt menor a la que ja adquireixen quan són atacats per antibiòtics, no vol dir que no s'hagin de prendre mesures per tal d'evitar aquesta resistència que es pugui arribar a crear.

Per poder prevenir al màxim aquest fet, s'ha de recórrer a la realització de còctels de bacteriòfags. Aquest fenomen consisteix en l'elaboració d'una mescla amb bacteriòfags de diferents tipus de tal manera que no tots els virus presents als còctels infectaran la mateixa soca bacteriana. La teràpia a partir de còctels consisteix, doncs, en l'ús simultani de més d'un tipus de fag, de tal manera que farà que al bacteri li sigui impossible d'elaborar diferents mutacions ràpidament per defensar-se contra tots els tipus de virus presents al còctel.⁷ Així doncs, la utilització de còctels amb bacteriòfags feta a partir de bacteriòfags amb diferents punts d'absorció evitarà l'aparició de cèl·lules resistents. A més, també s'evitarà el problema de l'especificitat que tenen aquests virus a l'hora d'infectar els bacteris.

3.3.6. Aïllament de bacteriòfags

El procés d'aïllament de bacteriòfags d'un medi concret és diferent per a cada tipus de bacteriòfag. Aquells que són virulents es poden aïllar d'una manera més senzilla que els que són atenuats. En el cas d'aquests últims, per tal de poder aïllar bacteriòfags que es puguin utilitzar per a la fagoteràpia, en primer lloc, s'hauran d'aïllar bacteriòfags atenuats de cicle lisogènic, els quals estaran sotmesos a un sistema complex anomenat SOS. Una vegada es

⁷Contingut teòric aprofitat de l'entrevista realitzada al doctor Sylvain Moineau.

tindran aïllats els bacteriòfags atenuats, es passarà a obtenir mutants virulents d'aquests, doncs es reproduïxen per cicle lític, el qual és l'ideal per dur a terme la teràpia fàgica.

3.3.6.1. Aïllament de bacteriòfags virulents

En primer lloc, s'ha d'agafar una mostra del medi ambient en la qual hi hagin bacteris. Aquesta, pot provenir ja sigui d'una granja, de l'aigua d'una bassa, del sòl, etc. Seguidament, aquesta mostra es portarà al laboratori per tal d'eliminar els bacteris i altres substàncies que hi puguin haver presents. Això es podrà fer utilitzant una centrifugadora. D'aquesta manera, els virus seran el sobrenedant de la mostra, mentre que els bacteris i les altres substàncies es quedaran al fons del recipient. El següent pas consistirà en retirar el sobrenedant i, una vegada s'hagi fet, es farà una titulació⁸ de la mostra lliure de bacteris sobre l'espècie bacteriana per la qual es vol aïllar el bacteriòfag. Si s'obtenen calbes clares que, per tant, estaran produïdes per fags virulents, voldrà dir que aquell bacteriòfag és capaç d'infectar la soca bacteriana amb la qual s'ha treballat.

3.3.6.2. Aïllament de bacteriòfags atenuats

En un inici, s'agafarà una mostra del medi ambient, ja sigui provinent d'aigües residuals, del sol, d'una granja, etc. En següent lloc, s'haurà de tractar la mostra amb compostos químics per tal que es produeixin lesions en el material genètic del bacteriòfag. D'aquesta manera, s'induirà el sistema SOS, un sistema de reparació del DNA de les cèl·lules bacterianes. Aquest sistema està controlat per dos reguladors: el repressor Lex A i l'activador Rec A. El repressor Lex A impedeix que s'expressin un seguit de gens, de tal manera que es dona un bloqueig en la replicació del DNA. Aleshores, s'acumula una gran quantitat de DNA a la cadena senzilla i té lloc l'augment de l'expressió d'aquests gens. La proteïna Rec A forma uns filaments a la cadena senzilla del DNA, adquirint d'aquesta manera activitat proteasa⁹. En aquest moment, la Rec A trenca el repressor Lex A i, per tant, els gens que aquest repressor inhibia es podran expressar.

Una vegada ha tingut lloc el sistema SOS, s'ha d'incubar la mostra durant 12 hores i, passades aquestes, s'ha de centrifugar la mateixa per tal de separar els bacteris que hi puguin haver presents a la mostra. Seguidament, s'haurà de titular la mostra lliure de bacteris sobre l'espècie

⁸ Valorar la concentració de virus o bacteris en una mostra. (Extret de: dlc.iec.cat, editat)

⁹ Hidrolasa que catalitza l'obertura de l'enllaç peptídic i que actua com a ferment digestiu en els intestins. (Extret de: www.enciclopedia.cat)

bacteriana per la que es volen aïllar els bacteriòfags. Finalment, s'han de purificar¹⁰ els bacteriòfags des de les calbes lisogèniques obtingudes.

3.3.6.3. Aïllament de mutants virulents de bacteriòfags atenuats

En primer lloc, s'agafarà una mostra de fags atenuats i s'irradiarà amb llum ultraviolada per tal d'originar-hi mutacions. Seguidament, se sembrarà per doble capa d'agar la suspensió irradiada sobre la soca bacteriana sensible al fag que es vol aïllar. Aquesta sembra es deixarà incubar 12 hores a l'estufa i, una vegada passades aquestes, s'observaran les calbes lítiques que hi hagin aparegut, la qual cosa voldrà dir que hauran estat provocades pels bacteriòfags que hagin sofert una mutació. Finalment, es purificaran els mutants virulents del bacteriòfag des de les calbes de lisi corresponents.

3.4. Aplicació al cos del pacient

En el moment en què una persona té una infecció bacteriana, se li ha de determinar quin bacteri concret és el causant d'aquesta. Una vegada se sàpiga de quin bacteri es tracta, a partir dels bacteriòfags adients per eliminar-lo s'iniciarà el tractament, la finalitat del qual consistirà en l'absorció dels fags per part dels bacteris ja siguin administrats per via nasal, tòpica o subcutània mitjançant l'aplicació de tiretes o cremes que continguin el fag, aerosols o la inhalació d'aquests virus, per via intravenosa i, la més comuna, per via oral. Tots aquests tractaments s'han de seguir durant un període de dues setmanes. Durant aquest temps, el pacient també s'haurà de fer un seguiment mèdic per tal d'assegurar-se de l'efectivitat del tractament i en funció d'aquesta, veure si s'ha de canviar o no el tipus de fags presents al còctel.

3.5. Altres usos de la fagoteràpia

Els bacteriòfags no només són emprats per tractar infeccions bacterianes sinó que presenten moltes altres utilitats:

- En l'ambient biosanitari s'utilitzen per eliminar bacteris que formen biofilms¹¹ sobre material mèdic, catèters o vàlvules d'implant. També s'utilitzen per al tractament de superfícies cremades, de ferides obertes, per al tractament de malalties cròniques associades a patògens com per exemple la fibrosis quística, l'otitis, etc.

¹⁰En aquest cas, sinònim d'aïllar.(Elaboració pròpia)

¹¹Comunitat estructurada de microorganismes envoltats d'una matriu polimèrica adherida a una superfície vivent o inerta. (Extret de: www.enciclopèdia.cat)

- En els darrers anys, han estat investigats en el camp de la microbiologia ambiental. Els bacteriòfags es poden utilitzar per infectar bacteris entèrics com a models en el control de la qualitat de les aigües. Altres exemples serien la utilització de bacteriòfags que infecten *Serratia marcescens* o *Staphylococcus aureus* com a traçadors de moviments d'aigües subterrànies, o els bacteriòfags que infecten *Vibrio parahaemolyticus* com a indicadors d'eutrofització d'aigües de mar.
- Cap a l'any 1966, els bacteriòfags van tenir un paper fonamental en el desenvolupament de la genètica molecular, a partir de la qual, anys més tard, es van anar desenvolupant enzims i vectors necessaris per treballar en el camp de l'enginyeria genètica.
- El 18 d'agost del 2006, la FDA (Food and Drug Administration) dels Estats Units va aprovar l'ús d'una preparació de sis tipus de bacteriòfags per ser utilitzats en carn precuinada com a agent antimicrobià contra el bacteri *Listeria monocytogenes*. Aquesta preparació s'aplica a la superfície de la carn en forma d'esprai abans de ser envasada. De la mateixa manera s'aplica l'esprai sobre la superfície de treball o dels utensilis per evitar la contaminació creuada per manipulació o per tallament. No obstant, els bacteriòfags no es poden utilitzar per a processos com la fermentació de productes càrnics, làctics, begudes alcohòliques, entre altres, ja que lisarien els bacteris fermentadors.
- Els bacteriòfags han proporcionat un material fonamental per al desenvolupament de la biologia molecular.

3.6. Avantatges i inconvenients

La teràpia fàgica presenta nombrosos avantatges respecte l'ús dels antibiòtics a l'hora de combatre bacteris patògens. Aquests es poden veure reflectits en els següents fets:

- Mentre que els antibiòtics presenten un espectre d'activitat generalment molt ampli, ja que no només eliminen el bacteri causant de la infecció sinó que també eliminen la resta de microbiota de l'organisme, part de la qual és beneficiosa, els bacteriòfags són molt específics. Això significa que tan sols eliminen el bacteri al qual infecten i no la resta de la microbiota.
- Els bacteriòfags, a diferència dels antibiòtics no tenen cap tipus d'efecte secundari a causa de la seva especificitat.

- La producció d'antibiòtics és bastant costosa mentre que la dels bacteriòfags abasta uns costos molt reduïts.
- La recerca i producció de fags és fàcil amb el sentit que la naturalesa és una font inesgotable d'aquests. En canvi, trobar nous antibiòtics resulta molt més difícil. De fet, a causa de les resistències adquirides als antibiòtics, l'Organització Mundial de la Salut preveu que fins el 2020 no es trobaran nous antibiòtics als quals cap bacteri se'ls sigui resistent.
- La fagoteràpia no presenta efectes mediambientals ja que els bacteriòfags són naturals, a no ser que siguin produïts en un laboratori, però la quantitat d'aquests últims és tan petita que els possibles efectes mediambientals que puguin tenir són negligibles.
- És cert que si tan sols s'utilitzés un sol tipus de bacteriòfag per tal de combatre un bacteri, a la llarga aquest acabaria creant una resistència vers el virus, però aquest fet no té lloc perquè per dur a terme aquest tractament s'utilitzen còctels de diferents tipus de bacteriòfags.

No obstant, la teràpia fàgica també presenta alguns inconvenients:

- Per tal que aquesta teràpia sigui reeixida, únicament es poden emprar fags de cicle lític, mai lisogènics.
- S'ha de tenir molt clara la dosi necessària que cal aplicar-li al pacient, doncs aquests virus es multipliquen de manera exponencial.
- Que els bacteriòfags presentin una elevada especificitat és bo, però no del tot, ja que per poder tractar una infecció s'ha de saber molt del cert de quin bacteri es tracta.

4. ANTIBIÒTICS

4.1. El concepte d'antibiòtic

Els antibiòtics, també coneguts com agents antimicrobians, són fàrmacs produïts per éssers vius (fongs o bacteris) o obtinguts a partir de la síntesi química, que s'utilitzen pel tractament de malalties infeccioses produïdes per bacteris, ja sigui matant-los o impedit-los la seva reproducció.

La penicil·lina, el primer antibiòtic, va ser descoberta pel científic Alexander Fleming l'any 1928 mentre estudiava cultius bacterians d'*Staphylococcus aureus*. Va observar que aquests cultius es contaminaven amb un fong filamentós del gènere *Penicillium*, el qual inhibia el creixement dels bacteris del voltant del fong que anava creixent. Així doncs, ell va concloure amb el fet que aquella reacció va ser deguda a la producció d'una toxina per part de *Penicillium*, la qual va anomenar penicil·lina.

El descobriment del primer antibiòtic va ser la clau per combatre moltes de les malalties sorgides durant la Segona Guerra Mundial (1939-1945) ja que, fins aleshores, un dels pocs tractaments existents per tal de tractar-les era mitjançant els bacteriòfags, que en aquell moment no era especialment efectiu, doncs no havia sigut gaire investigat i, per tant, es desconeixien molts afers relacionats amb l'actuació d'aquests virus.

D'ençà el seu descobriment, els antibiòtics han estat sempre el tractament més eficaç per combatre aquest tipus de malalties, però aquesta efectivitat, perdurará per sempre més?

4.2. Resistència adquirida als antibiòtics

Que els bacteris patògens desenvolupin els mecanismes necessaris per tal que els antibiòtics siguin inactius, és un fenomen que està adquirint molta importància avui en dia, tot i que segons una visió històrica de l'evolució hagi existit des de sempre. El desenvolupament de les soques bacterianes resistents va sorgir en el moment en què va aparèixer el primer antibiòtic. Així doncs, es tracta d'un fenomen natural i, per tant, és incontrolable. El que passa és que durant els darrers anys, aquest fenomen s'ha vist accelerat i agreujat per diversos motius.

Moltes de les cèl·lules que conviuen amb el nostre organisme, bacteris, en aquest cas, tenen variants amb característiques inusuals; són mutacions que presenten els seus DNA, que tenen la capacitat de resistir a l'atac d'un agent antimicrobià. Aquestes resistències són causades per canvis en la seqüència dels nucleòtids del DNA bacterià. Per tant, són mutacions gèniques. Les

resistències també es poden adquirir ja sigui mitjançant la transformació biològica del sexe, en què un bacteri pot agafar DNA d'un altre bacteri, o ja sigui per un petit cercle de DNA anomenat plasmidi, el qual pot passar d'un bacteri a un altre.

La gravetat de la resistència als antibiòtics és provocada pel mal ús que se'n fa d'aquests, ja sigui perquè el tractament amb aquests fàrmacs es fa durar més temps del necessari, per la qual cosa es dona l'oportunitat a la flora de l'organisme de fer-se resistent a ell; perquè es prenen sense haver-los receptat el metge; perquè es prenen per combatre infeccions no produïdes per bacteris i que, per tant, els antibiòtics no fan tipus d'efecte, entre altres.

Així doncs, per tal d'intentar disminuir aquesta resistència, no evitar-la completament, perquè és impossible, es necessita un canvi de cultura per part de tota la població que suposi una millora de la supervivència. No s'és conscient d'aquest bé tan gran que es té, i per impedir la seva desaparició s'ha de canviar la mentalitat ja que, en cas contrari, es podria arribar a tornar a l'era pre-antibiòtica.

ANTIBIÒTIC	ANY D'INTRODUCCIÓ A L'ÚS CLÍNIC	PRIMERES RESISTÈNCIES
Sulfonamides	1930	1940
Penicil·lina	1943	1946
Estreptomicina	1943	1959
Cloramfenicol	1947	1959
Tetraciclina	1948	1953
Eritromicina	1952	1988
Vancomicina	1956	1988
Meticil·lina	1960	1961
Ampicil·lina	1961	1973

Figura 5 . Taula comparativa dels anys d'introducció a l'ús clínic dels antibiòtics i de les primeres resistències aparegudes. (Font: elaboració pròpia)

DISSENY EXPERIMENTAL

Bases teòriques:

Per tal d'intentar corroborar o no la hipòtesi plantejada inicialment, es realitzaran una sèrie d'experiències que són complementàries les unes de les altres i que porten a l'experiment final, el qual és el que realment demostra si és certa o no.

La primera a realitzar, anomenada "Tinció diferencial (gram)", servirà per determinar si el bacteri *Salmonella* és grampositiu¹² o gramnegatiu¹³. Saber si és d'un tipus de gram o d'un altre és necessari per poder dur a terme el darrer experiment, doncs els antibiòtics dels quals es disposa infecten bacteris gramnegatiu. En el cas que el bacteri *Salmonella* sigui grampositiu, s'haurà de buscar un altre bacteri que sigui gramnegatiu.

Seguidament, es realitzarà l'experiència del "Test de la gota", la qual serà útil per veure i comprovar l'especificitat que tenen els bacteriòfags a l'hora d'infectar bacteris. És necessari fer aquesta comprovació per tal de saber quin bacteriòfag es podrà utilitzar per infectar el bacteri del qual es disposarà a l'experiment final.

També se'n realitzarà una altra que servirà per veure com els bacteriòfags infecten bacteris i com a conseqüència d'això, com es formen les calbes en les plaques de Petri. Si els resultats són els esperats, per tal de poder extreure les conclusions més adients es farà una tinció de TTC en les plaques de Petri que es consideri que sigui necessari.

Si els resultats obtinguts en la tercera pràctica són bons, es podrà dur a terme la propera, la qual consistirà en determinar la quantitat de bacteriòfags que hi ha presents en una calba per tal de veure si realment es troben en quantitats molt grans.

Per acabar, es realitzarà l'experiment més important, el qual permetrà corroborar si la hipòtesi plantejada a l'inici del treball és certa o no. Aquest, consistirà en comparar el grau d'eficàcia i d'eficiència entre dos tractaments com serien un amb la fagoteràpia i l'altre amb antibiòtics a l'hora de combatre bacteris patògens. Per fer-ho, es farà un seguiment d'unes hores amb un tipus de bacteriòfag infectant un bacteri, i amb tres tipus d'antibiòtics de diferent mecanisme d'acció

¹²Tenen la paret que fa entre 10 i 80 nm i que retenen el cristall violeta durant la tinció de Gram, de tal manera que una vegada feta aquesta, al microscopi s'observen de color blau-violeta. (Extret de: enciclopèdia.cat, editat)

¹³No retenen el cristall violeta en la tinció de Gram i, per tant, apareixen de color rosa al microscopi òptic. Molts dels bacteris gramnegatius són patògens. (Extret de: www.enciclopèdia.cat, editat)

els quals infectaran el mateix. Es mesurarà el creixement dels cultius per densitat òptica gràcies a l'espectrofotòmetre així com també fent un cultiu de les viables. Mitjançant unes fórmules matemàtiques es faran unes corbes d'infecció, a partir de les quals es podrà saber quin dels dos tractaments és més efectiu.

Per tal de dur a terme les diferents pràctiques del disseny experimental s'utilitzaran:

- Els bacteris *Salmonella*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*.
- Els bacteriòfags P22 lític, P22 wild type (WT) i λ -s105.
- Els antibiòtics espectinomicina, ampicil·lina i estreptomycinina.

A més, s'ha realitzat una entrevista al reconegut microbiòleg Sylvain Moineau de la Universitat Laval de Quebec, Canadà.

Conceptes a tenir en compte per poder entendre el resultats obtinguts en algunes experiències:

1. Tipus d'antibiòtics segons el seu espectre

En funció del conjunt d'agents patògens que puguin ser infectats per un antibiòtic concret es poden distingir dos tipus diferents d'antibiòtics: els d'espectre limitat i els d'ampli espectre.

1.1. Antibiòtics d'espectre limitat:

Els antibiòtics d'espectre limitat són aquells que tan sols actuen en bacteris o bé grampositius o bé gramnegatius.

1.2. Antibiòtics d'ampli espectre:

Els antibiòtics d'ampli espectre són aquells que poden actuar sobre bacteris tant grampositius com gramnegatius.

2. Tipus d'antibiòtics segons la seva activitat antiinfecciosa

2.1. Antibiòtics bacteriostàtics:

Els antibiòtics bacteriostàtics són aquells que inhibeixen el creixement bacterià sense provocar la mort cel·lular.

2.2. Antibiòtics bactericides:

Els antibiòtics bactericides són aquells que inhibeixen el creixement bacterià i produeixen la mort cel·lular, però sense provocar la lisi.

2.3. Antibiòtics bacteriolítics:

Els antibiòtics bacteriolítics són aquells que inhibeixen el creixement bacterià i provoquen la lisi cel·lular.

3. Fases dels cultius bacterians

- Fase de latència (1): hi ha una adaptació al medi. Existeix un augment de la massa cel·lular però no del nombre de cèl·lules.

- Fase de creixement exponencial (2): es produeix un increment exponencial del nombre de microorganismes.

- Fase estacionària (3): és la fase a la qual s'arriba quan la font d'energia s'ha esgotat.

- Fase de mort (4): hi ha una disminució exponencial del nombre de microorganismes.

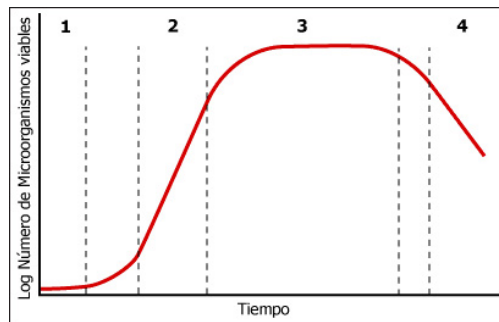


Figura 6. Evolució d'un cultiu bacterià. (Font: microbiologia.com.ar)

PRÀCTICA 1: TINCIÓ DIFERENCIAL (GRAM)

1. Objectiu:

Aquesta primera pràctica, que es pot considerar introductòria, té com objectiu determinar si el bacteri *Salmonella* és grampositiu o gramnegatiu.

2. Material i equipament:

- | | | |
|---------------------|-----------------|--------------------|
| -NaCl al 0,9% | -Portaobjectes | -Paper de filtre |
| - <i>Salmonella</i> | -Lugol | -Cristall violeta |
| -Cremador Bunsen | -Nansa de Kolle | -Aigua destil·lada |
| -Safranina | -Pipeta | |

3. Procediment:

- a) Esterilitzar la nansa de Kollei posar amb la pipeta tres gotes de NaCl al 0,9% al portaobjectes.
- b) Agafar una colònia de *Salmonella* i col·locar-la al portaobjectes.
- c) Passar el portaobjectes pel cremador Bunsen per tal que s'evapori tota l'aigua i quedi una taca blanquinosa.
- d) Fer la tinció en gram.
 - d.1) Posar unes gotes de cristall violeta al portaobjectes que conté la *Salmonella* i deixar-ho reposar durant 1 minut.
 - d.2) Passat el minut, tirar-hi aigua destil·lada i, seguidament, unes gotes de Lugol i deixar-ho reposar un altre minut.
 - d.3) Tornar a tirar aigua destil·lada i, després, unes gotes de safranina i esperar 2 minuts.
 - d.4) Tornar a tirar aigua destil·lada i, tot seguit, passar un paper de filtre pel portaobjectes.
- e) Mirar les mostres amb el microscopi òptic.

4. Resultats i observacions:

En observar la preparació amb el microscopi s'ha vist que s'ha tenyit d'un color fúcsia.

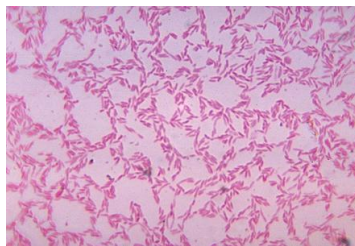


Figura 7. *Salmonella* vista amb el microscopi òptic a 100X.(Font: elaboració pròpia)

5. Conclusió científica:

Es pot concloure aquesta pràctica amb el fet que la *Salmonella* és un bacteri gramnegatiu, doncs havent realitzat la tinció en gram s'ha tornat de color fúcsia. Per tant, la *Salmonella* és un bacteri apte per ser infectat pels antibiòtics dels quals es disposa per dur a terme l'experiment final, els quals són l'ampicil·lina, l'espectinomicina i l'estreptomicina.

PRÀCTICA 2: TEST DE LA GOTA

1. Objectiu:

Determinar l'efecte que tenen els bacteriòfags P22 lític, P22 WT i λ -s105 sobre els bacteris *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Bacillus Subtilis*, i veure si realment cada bacteriòfag és específic per un bacteri concret. A més, determinar quin bacteriòfag utilitzar de cara el darrer experiment que infecti el bacteri *Salmonella*.

2. Material i equipament:

-3 tubs d'assaig de plàstic amb 2,5 ml de medi LB tou (0,7 %) a 50°C

-Micropipeta (amb puntes de recanvi)

- <i>Escherichia coli</i>	}	en dilució de 10^{-1}
- <i>Salmonella</i>		
- <i>Bacillus Subtilis</i>		

-Retolador per a vidre -3 plaques de Petri

-Bacteriòfag P22 lític (L1) -Bacteriòfag P22 WT

-Bacteriòfag λ -s105 -Estufa

3. Procediment:

a) Agafar les tres plaques de Petri i, amb el retolador per a vidre, escriure en cada placa el nom d'un dels tres bacteris (diferent per a cada placa). Dividir cada placa en tres seccions i escriure en cada secció el nom d'un dels tres bacteriòfags. A totes les plaques han d'haver-hi els tres bacteriòfags, un a cada secció.

b) Posar 100 μ l de la dilució de 10^{-1} d'*Escherichia coli* dins el tub d'assaig de plàstic amb 2,5 ml de medi LB tou (0,7 %) a 50°C i, ràpidament, per tal d'evitar que el medi LB tou quedi pres, dipositar la mescla en la placa de Petri marcada amb el nom d'aquest bacteri. Fer el mateix procediment amb els bacteris *Salmonella* i *Bacillus Subtilis*.

c) Esperar 15 minuts per tal que la mescla anterior es refredi.

d) Dipositar en cada una de les tres seccions de cada placa de Petri 20 µl de bacteriòfag. (A cada secció hi ha d'haver el bacteriòfag corresponent.)

e) Deixar les tres plaques de Petri a incubar a l'estufa a 37°C durant entre 16 i 18 hores.

4. Resultats i observacions:

En treure les plaques de Petri de l'estufa s'ha pogut veure que a la placa on hi havia el bacteri *Escherichia coli*, només han sortit calbes a la secció en la qual hi havia el bacteriòfag λ-s105.

A les altres dues seccions no ha sortit cap calba.

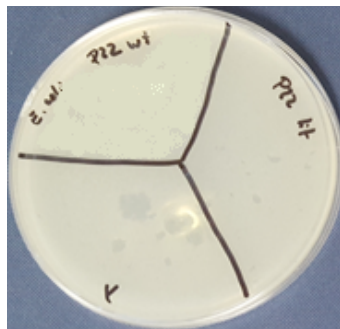
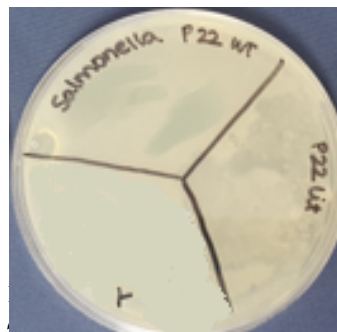


Figura 8. Placa de Petri amb *Escherichia coli* amb calbes a la secció del bacteriòfag λ-s105. (Font: elaboració pròpia)

A la placa de Petri on hi havia el bacteri *Salmonella* s'ha pogut veure que únicament han sortit calbes a les seccions on hi havien els 20µl de bacteriòfag P22 lític i P22 WT. Més concretament, es pot veure que les calbes aparegudes a la secció amb el P22 lític són calbes clares (lítiques) mentre que les aparegudes al P22 WT són, la gran major part d'elles, lisogèniques, excepte alguna, que, per alguna mutació ha optat per fer un cicle lític. A més, es pot veure que en la secció en la qual hi havia el bacteriòfag λ-s105 no ha aparegut absolutament cap calba.



seccions de bacteriòfag P22 lític i P22 WT.(Font: elaboració pròpia)

Finalment, a la placa de Petri on hi havia el bacteri *Bacillus Subtilis*, s'ha pogut observar que en cap de les tres seccions no ha sortit cap calba.

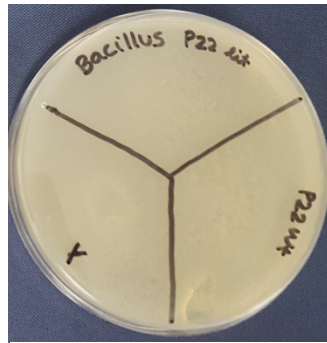


Figura 10. Placa de Petri amb *Bacillus Subtilis* sense cap calba.
(Font: elaboració pròpia)

5. Conclusió científica:

Aquesta pràctica ha permès comprovar l'especificitat que presenten els bacteriòfags, de tal manera que s'ha arribat a la conclusió que el bacteri *Escherichia coli* únicament pot ser infectat pel bacteriòfag λ -s105; el bacteri *Salmonella* només pot ser infectat pels bacteriòfags P22 lític i pel P22 WT; i finalment, el bacteri *Bacillus Subtilis* no pot ser infectat per cap dels bacteriòfags dels quals es disposava per realitzar aquesta experiència.

Per tal de poder dur a terme l'experiment final i, tenint en compte que es farà amb el bacteri *Salmonella*, s'haurà d'escollir si realitzar-lo amb el bacteriòfag P22 lític o amb el P22 WT. Aquesta segona pràctica ha permès veure els tipus de calbes que es formen amb un bacteriòfag i amb l'altre i, tenint en compte aquestes, per al proper experiment s'utilitzarà el bacteriòfag P22 lític ja que les calbes que produeix són lítiques i, aquestes calbes són les ideals per la fagoteràpia.

b.1) Tub Eppendorf 1:

Agafar 10 µl amb la micropipeta de l'inòcul original de bacteriòfags que es troben en una concentració d'entre 10^8 i 10^{11} cfu¹⁴/ml i es barrejar-los amb el vòrtex juntament amb 990 µl de dissolvent MgSO₄. Seguint aquest procediment s'aconseguirà fer una dilució de 10^{-2} .

b.2) Tub Eppendorf 2:

Per tal de fer una dilució de 10^{-4} s'han d'agafar amb la micropipeta 10 µl de dilució de 10^{-2} i barrejar-los amb 990 µl de MgSO₄ amb l'ajuda del vòrtex.

b.3) Tub Eppendorf 3:

Agafar 10 µl de la dilució de 10^{-4} i barrejar-los amb el vòrtex amb 990 µl de MgSO₄ per tal d'obtenir una dilució de 10^{-6} .

b.4) Tub Eppendorf 4:

Agafar 100 µl de la dilució de 10^{-6} i barrejar-los amb el vòrtex juntament amb 900 µl de MgSO₄. D'aquesta manera, s'obtindrà una dilució de 10^{-7} .

b.5) Tub Eppendorf 5:

Per tal de fer una dilució de 10^{-8} es barrejaran amb el vòrtex 100 µl de la dilució de 10^{-7} juntament amb 900 µl de MgSO₄.

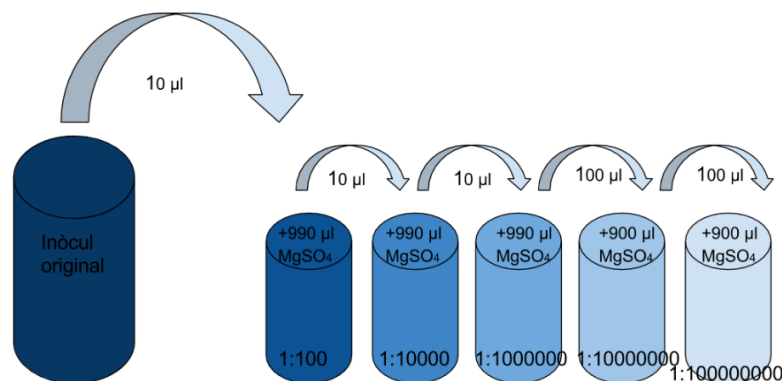


Figura 11. Indica com fer un banc de dilucions en sèrie. (Font: elaboració pròpia)

c) Dipositar els 15 tubs Eppendorf a la gradeta. (5 per cada bacteriòfag)

d) Tenint en compte que de les 5 dilucions fetes anteriorment amb cada bacteriòfag només se'n cultivaran 3; les dilucions de 10^{-6} , de 10^{-7} i de 10^{-8} , s'hauran d'agafar i nombrar les 9 plaques

¹⁴Unitat formadora de colònia.

de Petri (3 plaques per cada bacteriòfag) amb el retolador per vidre de tal manera que a cada placa de Petri hi hagi escrit de quin bacteriòfag i de quina dilució es tracta.

e) Per a cada placa de Petri:

e.1) Agafar un tub d'assaig de plàstic amb 2,5 ml de medi LB tou (0,7 %) a 50°C i amb una micropipeta afegir-hi 100 µl de bacteri (agafar *Salmonella* per als bacteriòfags P22 lític i P22 WT, i agafar *Escherichia coli* per al bacteriòfag λ-s105). A més, també s'hi afegiran 100 µl de llisat, que és la dilució que conté els bacteriòfags. Aquest, per a cada placa de Petri serà d'una concentració diferent: de 10^{-6} , de 10^{-7} o de 10^{-8} .

e.2) Una vegada s'hagi barrejat l'agar semi sòlid amb el bacteri i el bacteriòfag, es tirarà la mescla a la placa de Petri mirant que quedi tot homogeni.

e.3) Deixar reposar totes les plaques de Petri a l'estufa a una temperatura de 37°C durant un dia.

4. Resultats i observacions:

Després de deixar reposar les 9 plaques de Petri a l'estufa durant un dia, els bacteris i bacteriòfags han tingut el temps suficient per reproduir-se, de tal manera que han sortit calbes a totes les plaques.

-Bacteriòfag λ-s105:

Si s'observen les plaques de Petri en les quals hi ha el bacteriòfag λ-s105, es pot veure que el fag sí que ha infectat i eliminat el bacteri *Escherichia coli*. Això es veu reflectit en les calbes formades a les tres plaques de Petri amb concentracions diferents de bacteriòfag; de 10^{-6} , de 10^{-7} i de 10^{-8} . No totes les calbes són iguals; n'hi ha de clares, en les quals es veu l'agar, i n'hi ha de tèrboles. Es pot veure que la placa de Petri amb concentració de 10^{-6} té un nombre major de calbes que la que té una concentració de 10^{-7} i de la que en té una de 10^{-8} .

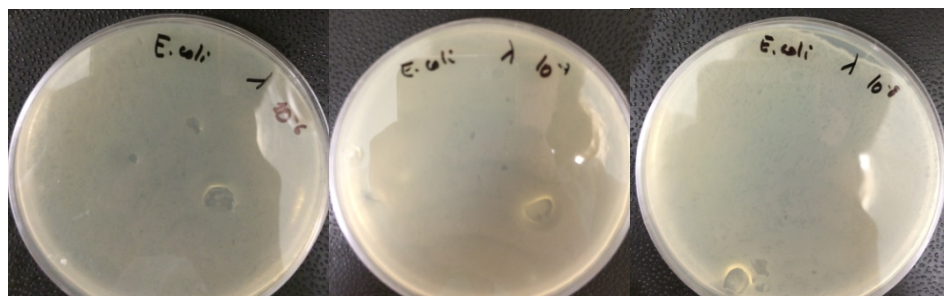


Figura 12. Indica el que s'ha format a les plaques de Petri amb el bacteriòfag λ-s105 després de deixar-les reposar a 37°C. (Font: elaboració pròpia)

-Bacteriòfag P22 WT:

Es pot veure que el bacteriòfag P22 WT ha infectat les 3 plaques de Petri on hi havia cultivat el bacteri *Salmonella*. No totes les calbes que s'han format són del mateix tipus; a totes tres n'hi ha de clares i n'hi ha de tèrboles. Observant les tres plaques, es pot veure que a la placa que té una concentració de 10^{-6} hi ha moltes més de calbes que a la que té una concentració de 10^{-7} i encara més respecte la que en té una de 10^{-8} .

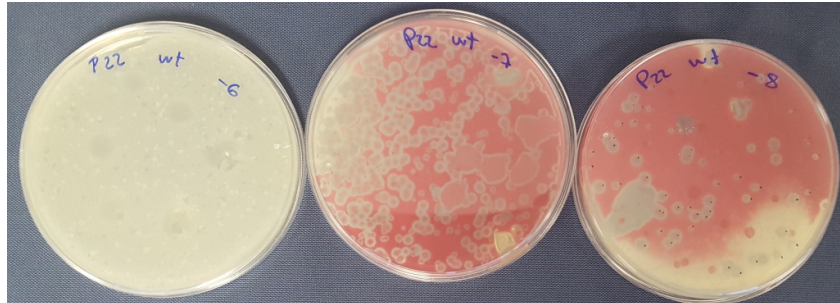


Figura 13. Calbes formades a les plaques de Petri amb P22 WT després d'haver-les deixat reposar a 37°C

-Bacteriòfag P22 lític:

En aquest cas, es pot observar que el bacteriòfag P22 lític ha infectat el bacteri *Salmonella* de totes les tres plaques. A causa que la concentració de totes és diferent, a la que la té de 10^{-6} hi ha un nombre major de calbes que a la que la té de 10^{-7} i que a la que la té de 10^{-8} . Totes les calbes que s'han format amb aquest bacteriòfag són clares.

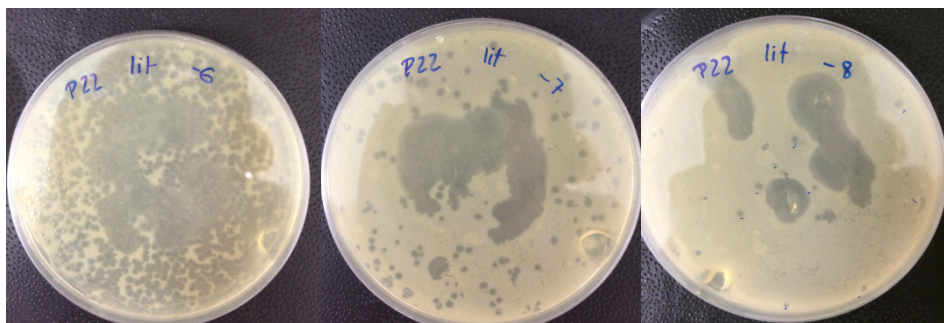


Figura 14. Calbes formades a les plaques de Petri amb el bacteriòfag P22 lític després de deixar-les reposar a 37°C

5.Conclusió científica:

Realitzant aquesta pràctica s'ha pogut comprovar que realment els bacteriòfags infecten els bacteris i com a conseqüència d'això, la formació de les calbes.

En el cas del bacteriòfag λ -s105 i del bacteriòfag P22 WT, com que han aparegut els dos tipus de calbes a les plaques de Petri, es pot dir que tant un fag com l'altre són atenuats. En el cas del bacteriòfag P22 lític, com el seu nom indica, fa únicament cicle lític, de tal manera que les calbes formades a les 3 plaques de Petri eren iguals; calbes clares, en les quals es podia veure l'agar.

Han aparegut calbes a absolutament totes les plaques de Petri i en termes de quantitat, a les que tenien una concentració de 10^{-6} n'han sortit 10 vegades més que a les que la tenien de 10^{-7} i 100 més respecte les que la tenien de 10^{-8} . A més, cal destacar que en almenys una placa de cada tres de cada bacteriòfag hi ha entre 15 i 300 colònies, fet que vol dir que aquestes són aptes per ser utilitzades per dur a terme un altre experiment.

*Per poder comptar més bé les calbes, en el cas del bacteriòfag P22 WT s'ha dut a terme una tinció amb el colorant vital clorur de trifeníl de tetrazoli (TTC).

Per fer aquesta coloració, s'han afegit 5 ml de solució de TTC al 0,1 % sobre cada placa de Petri i s'ha deixat reposar durant 30 minuts a 37 °C. Passats els 30 minuts, s'ha vist que els bacteris han quedat tenyits d'un color vermellós mentre que les calbes produïdes pels bacteriòfags no han experimentat cap canvi de color, quedant-se del color de l'agar.

PRÀCTICA 4: DETERMINAR EL NOMBRE DE BACTERIÒFAGS QUE HI HA EN UNA CALBA

1. Objectiu:

Aquesta pràctica té la finalitat de recuperar calbes lítiques i lisogèniques aparegudes a les plaques de Petri del bacteriòfag P22 WT de la pràctica 3 i cultivar-les per tal de saber quants bacteriòfags hi ha en una sola calba i veure si realment es troben en grans quantitats.

3. Material i equipament:

.14tubs Eppendorf (tubs de microcentrífuga)

-Micropipeta (amb puntes de recanvi)

-12 plaques de Petri amb medi LB (6 plaques per a cada calba)

-10 tubs d'assaig de plàstic amb 2,5 ml de medi LB tou (0,7 %) a 50°C

-Placa de Petri de la pràctica 3 amb entre 15 i 300 calbes lisogèniques i lítiques produïdes pel bacteriòfag P22 WT

-MgSO₄

.Centrifugadora

-Nansa de Kolle

-Estufa

-Vòrtex

-Cremador Bunsen

-Gradeta

-*Salmonella*

4. Procediment:

a) Posar 1.000 µl de MgSO₄ amb la micropipeta en dos tubs Eppendorf .

b) Recuperar amb l'ajuda de la nansa de Kolle una calba lítica (mutant virulent) de la placa de Petri amb bacteriòfag P22 WT i dipositar-la en un dels dos tubs Eppendorf. Realitzar el mateix procediment amb la calba lisogènica.

c) Passar els dos tubs amb la calba de bacteriòfags i els 1.000µl de MgSO₄ per la centrifugadora durant 1 minut a 13.000 revolucions per minut (rpm). Aquest pas es necessari per tal que s'obtingui un sobrenedant, el qual estarà format per bacteriòfags, i així l'agar i els bacteris que hi puguin haver a la calba se separaran dels fags.

d) Recuperar el sobrenedant de cada tub Eppendorf i dipositar-lo en un altre tub Eppendorf.

e) Realitzar un banc de dilucions en sèrie amb cada un dels dos tubs Eppendorf centrifugats. Per tant, es faran dos bancs de dilucions diferents. Es necessitaran 5 tubs Eppendorf per a cada banc de dilucions. S'ha de realitzar el mateix procediment per a les dues calbes.

e.1) Tub Eppendorf 1:

Agafar 10 µl amb la micropipeta de la dissolució de la calba amb els 1.000µl de MgSO₄ i barrejar-los en un tub amb 990 µl de MgSO₄. Passar el tub de plàstic pel vòrtex. D'aquesta manera s'obtindrà una dilució de 10⁻².

e.2) Tub Eppendorf 2:

Per tal de fer una dilució de 10⁻⁴ s'agafaran amb la micropipeta 10 µl de la dilució de 10⁻² i es barrejaran amb 990 µl de MgSO₄ amb l'ajuda del vòrtex.

e.3) Tub Eppendorf 3:

Agafar 10 µl de la dilució de 10⁻⁴ i barrejar-los amb el vòrtex amb 990 µl de MgSO₄ per tal d'obtenir una dilució de 10⁻⁶.

e.4) Tub Eppendorf 4:

Agafar 10 µl de la dilució de 10⁻⁶ i barrejar-los amb el vòrtex juntament amb 990 µl de MgSO₄. D'aquesta manera, s'obtindrà una dilució de 10⁻⁸.

e.5) Tub Eppendorf 5:

Agafar 10 µl de la dilució de 10⁻⁸ i barrejar-los amb el vòrtex juntament amb 990 µl de MgSO₄ per tal d'obtenir una dilució de 10⁻¹⁰.

f) Per a cada placa de Petri:

f.1) Agafar un tub d'assaig de plàstic amb 2,5 ml de medi LB tou (0,7 %) a 50°C i amb una micropipeta afegir-hi 100 µl de bacteri *Salmonella* i també 100 µl d'una de les dilucions del banc de dilucions en sèrie. A cada placa de Petri els 100 µl seran de dilucions amb una concentració diferent: de 10⁻², de 10⁻⁴, de 10⁻⁶, de 10⁻⁸ i de 10⁻¹⁰.

*Hi hauran dues plaques de Petri (una per cada calba) de control les quals portaran l'agar tou barrejat amb 100µl de bacteri *Salmonella* i 100 µl de la dilució inicial (patró) que conté la calba de bacteriòfags i els 1.000 µl de MgSO₄ passats per la centrifugadora.

f.2) Una vegada s'hagi barrejat l'agar semi sòlid amb el bacteri i la dilució de la calba, es tirarà la barreja a la placa de Petri mirant que quedi tot homogeni.

f.3) Deixar reposar totes les plaques de Petri a l'estufa a una temperatura de 37°C durant un dia.

4. Resultats i observacions:

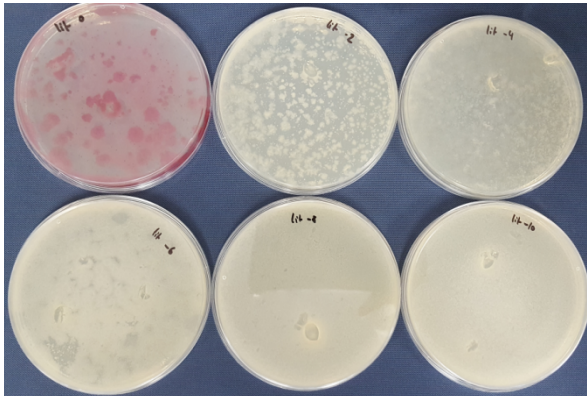


Figura 15. Calbes formades amb el bacteriòfag P22 WT de cicle lític. (Font: elaboració pròpia)

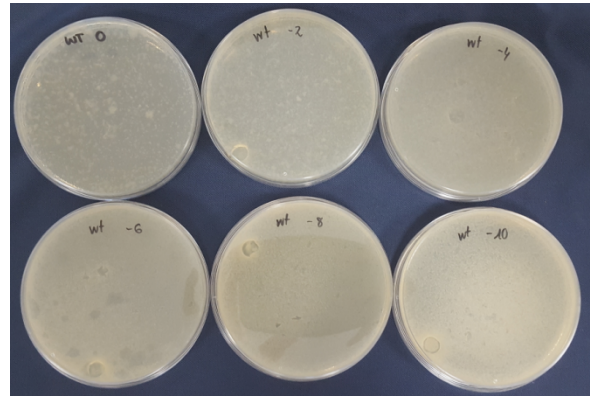


Figura 16. Calbes formades amb el bacteriòfag P22 WT de cicle lisogènic. (Font: elaboració pròpia)

Després d'esperar un dia, han sortit clapes de lisi circulars, que són regions que no contenen bacteri o el contenen però en una quantitat molt petita, a totes les plaques de Petri. No hi ha la mateixa quantitat a totes, doncs totes les dilucions són d'una concentració diferent. Per tal de saber exactament quants bacteriòfags hi havia en les calbes formades a la repetició de la pràctica 3, s'haurà d'aplicar la següent fórmula:

$$\text{pfu}^{15} / \text{ml} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de calbes}}{\text{volum sembrat} \times \text{factor de dilució acumulat}}$$

Així doncs, tenint en compte que s'agafa com a bona la dilució de 10^{-6} tant de les lítiques com lisogèniques procedents del P22 WT, que hi ha unes 100 calbes, i que el volum sembrat és de 100µl que equival a 0,1 ml, si s'aplica la fórmula, dona que hi ha aproximadament 10^8 pfu/ml.

5. Conclusió científica:

Realitzant aquesta pràctica s'ha pogut comprovar que realment en una sola calba de bacteriòfags hi ha un nombre molt elevat d'aquests, fins al punt que es consideren els més nombrosos del planeta.

¹⁵Unitat formadora de calba.

PRÀCTICA 5: COMPARACIÓ DE L'EFICÀCIA I L'EFICIÈNCIA ENTRE ELS BACTERIÒFAGS I ELS ANTIBIÒTICS

1. Objectiu:

Aquesta pràctica té la finalitat de comparar l'eficàcia i l'eficiència entre dos tractaments com serien un amb fagoteràpia i l'altre amb antibiòtics per tal de combatre bacteris patògens. L'objectiu és comparar-ho tot fent un seguiment del creixement per densitat òptica i per les viables (cfu/ml) dels diferents cultius. Realitzant aquesta experiència es podrà saber quin dels dos tractaments dona uns resultats més positius.

2. Hipòtesi:

Per tal de combatre bacteris patògens, el tractament que es duu a terme mitjançant els bacteriòfags és més efectiu que el que es duu a terme mitjançant uns agents antimicrobians com els antibiòtics.

3. Material i equipament:

-Antibiòtic espectinomicina	-Antibiòtic ampicil·lina	-Antibiòtic estreptomicina
-Espectrofotòmetre	-5 matrassos d'Erlenmeyer	-Estufa
- <i>Salmonella</i>	-Bacteriòfag P22 lític	-Agitador
-40 Plaques de Petri	-Vòrtex	-Cremador Bunsen
-Medi LB al 0,5 % de NaCl	-Cubetes per l'espectrofotòmetre	
-NaCl al 0,9%	-40 tubs Eppendorf (tubs de microcentrífuga)	
-Nansa de Digrafsky	-Micropipeta (amb puntes de recanvi)	

4. Procediment:

- Un dia abans de realitzar l'experiment, s'ha de preparar un cultiu d'un volum de 10 ml de *Salmonella* en un medi de cultiu ric en LB que es deixarà durant tota la nit en agitació a 37°C.
- Passada la nit, s'ha de realitzar una ressebra del cultiu anterior 1:50 en 100 ml de LB. Això vol dir afegir 2 ml del cultiu de nit en 100 ml de LB al 0,5 % de NaCl.

c) Agafar 1ml de la ressembra de *Salmonella*, que serà el control negatiu, i posar-lo en una cubeta. Posar aquesta cubeta dins l'espectrofotòmetre per tal de mesurar la DO¹⁶ inicial, a una longitud d'ona de 550 nm i a temps = 0.

d) Agafar els 5 matrassos d'Erlenmayer i posar-hi:

d.1) Matràs 1:

20 ml de *Salmonella* i 1ml d'ampicil·lina a una concentració de 200 µg/ml.

d.2) Matràs 2:

20ml de *Salmonella* i 1ml d'espectinomicina a una concentració de 200 µg/ml.

d.3) Matràs 3:

20 ml de *Salmonella* i 1ml d'estreptomicina a una concentració de 200 µg/ml.

d.4) Matràs 4:

20 ml de *Salmonella* i 1 ml de bacteriòfag P22 lític a una MOI¹⁷ de 1.

d.5) Matràs 5:

20 ml de *Salmonella*. Aquest matràs serà el de control negatiu.

e) Deixar els matrassos a la incubadora a una temperatura de 37°C i amb constant agitació per tal que les cèl·lules dels cultius estiguin en moviment.

f) Cada 30 minuts fins al minut 180, observar la DO dels diferents cultius. Això s'ha de fer de la següent manera:

f.1) Agafar els 5 matrassos de la incubadora i posar 1 ml de cada cultiu en 5 cubetes (1 cubeta per cada matràs) i, seguidament, mirar la DO amb l'espectrofotòmetre i anotar els resultats.

f.2) Tornar a deixar els 5 matrassos a la incubadora, esperar 30 minuts més i repetir el procediment fins arribar al minut 180.

¹⁶Densitat òptica.

¹⁷Multiplicitat d'infecció.

g) Paral·lelament a l'observació de la DO dels diferents cultius, també es farà un control de les viables (cfu/ml) als minuts 0, 90 i 180. Per tal de realitzar aquest control s'han de fer dilucions en sèrie de cada cultiu als minuts indicats i sembrar-les en plaques de Petri.

h) Per al minut 0 només s'ha de fer una dilució en sèrie del matràs que conté el control negatiu. Es necessiten 4 tubs Eppendorf.

h.1) Tub Eppendorf 1:

Per tal d'obtenir una dilució de 10^{-2} , barrejar 990 μ l de NaCl al 0,9% amb 10 μ l de *Salmonella*. Passar-ho pel vòrtex.

h.2) Tub Eppendorf 2:

Per tal de fer una dilució de 10^{-4} , s'agafaran amb la micropipeta 10 μ l de dilució de 10^{-2} i es barrejaran amb 990 μ l de NaCl al 0,9 % amb l'ajuda del vòrtex.

h.3) Tub Eppendorf 3:

Agafar 10 μ l de la dilució de 10^{-4} i barrejar-los amb el vòrtex amb 990 μ l de NaCl al 0,9% per tal d'obtenir una dilució de 10^{-6} .

h.4) Tub Eppendorf 4:

Barrejar amb l'ajuda del vòrtex 10 μ l de la dilució de 10^{-6} amb 990 μ l de NaCl al 0,9% per tal d'obtenir una dilució de 10^{-8} .

i) Agafar 100 μ l de cada tub Eppendorf i sembrar-los amb la nansa de Digrafsky en 4 plaques de Petri. Ha d'haver-hi una placa per a cada dilució.

j) Per als minuts 90 i 180, es seguirà el mateix procediment que al minut 0 amb el control negatiu. Aquesta vegada, però, es faran dilucions en sèrie dels cultius de cada matràs: el del control negatiu, l'ampicil·lina, l'espectinomicina, l'estreptinomicina i el bacteriòfag P22 lític. Una vegada estiguin fetes les dilucions, també se sembraran en plaques de Petri.

K) Esperar 4 hores per veure els resultats obtinguts a les plaques de Petri.

5. Resultats i observacions:

DO:Resultats obtinguts amb l'espectrofotòmetre

Cultiu	Temps						
	0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'
Control negatiu	0,297	0,419	0,605	0,819	0,957	1,122	1,178
Ampicil·lina		0,362	0,447	0,393	0,451	0,492	0,495
Espectinomicina		0,363	0,510	0,571	0,551	0,511	0,505
Estreptomicina		0,381	0,470	0,502	0,509	0,823	0,880
Bacteriòfag P22 lític		0,375	0,418	0,383	0,203	0,111	0,115

Figura 17. Control de la DO dels diferents cultius cada 30'. (Font: elaboració pròpia)

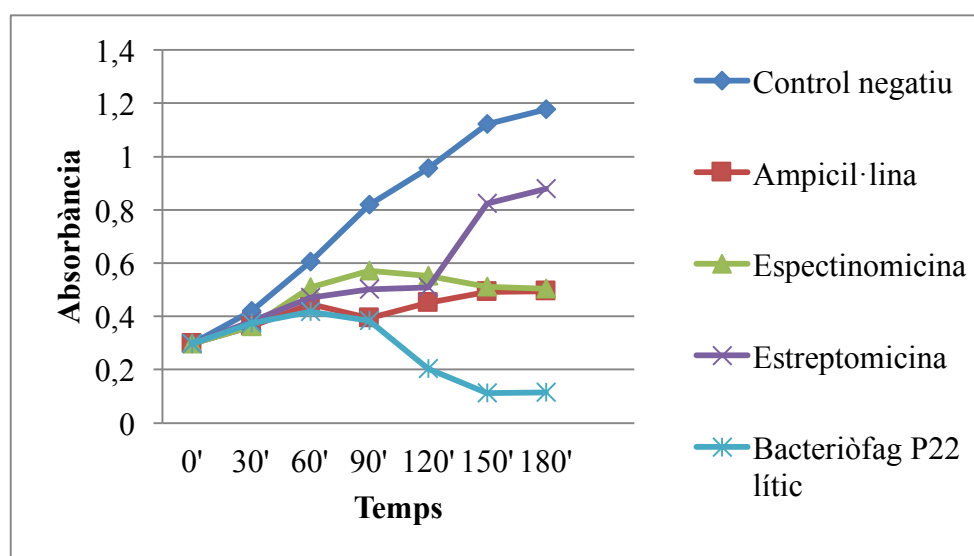


Figura 18. Gràfic de l'evolució de la DO dels diferents tractaments. (Font: elaboració pròpia)

Recompte de viables (cfu/ml):

Per tal de realitzar el recompte de viables s'haurà d'aplicar la següent fórmula:

$$\text{cfu/ml} = \frac{\text{Nº de colònies}}{\text{volum sembrat} \times \text{factor de dilució acumulat}}$$

Per poder aplicar la fórmula, s'ha de tenir en compte que el volum sembrat és per a tots els cultius 100 µl que equivalen a 0,1 ml. El factor de dilució acumulat serà diferent per a cada

cultiu doncs dependrà de la dilució del banc de dilucions que s'agafi en funció del nombre de colònies que tingui.

*Per saber el nombre de colònies presents en una placa de Petri s'han d'agafar les plaques de Petri d'un mateix cultiu i que hagin estat sembrades al mateix minut i aleshores s'ha de mirar quina de les plaques de Petri pot tenir entre 15 i 300 colònies. Una vegada es tingui la placa adequada, s'han de comptar totes les colònies que hi hagin.

Cultiu	Temps		
	0'	90'	180'
Control negatiu	$6 \cdot 10^7$ cfu/ml	$1,6 \cdot 10^8$ cfu/ml	$7,9 \cdot 10^8$ cfu/ml
Ampicil·lina		$6,4 \cdot 10^6$ cfu/ml	10^6 cfu/ml
Espectinomicina		$2,6 \cdot 10^7$ cfu/ml	$1,8 \cdot 10^7$ cfu/ml
Estreptomicina		$2,3 \cdot 10^8$ cfu/ml	$2 \cdot 10^8$ cfu/ml
Bacteriòfag P22 lític		$3,4 \cdot 10^4$ cfu/ml	$1,7 \cdot 10^4$ cfu/ml

Figura 19. Control de cfu/ml dels diferents cultius cada 90'. (Font: elaboració pròpia)

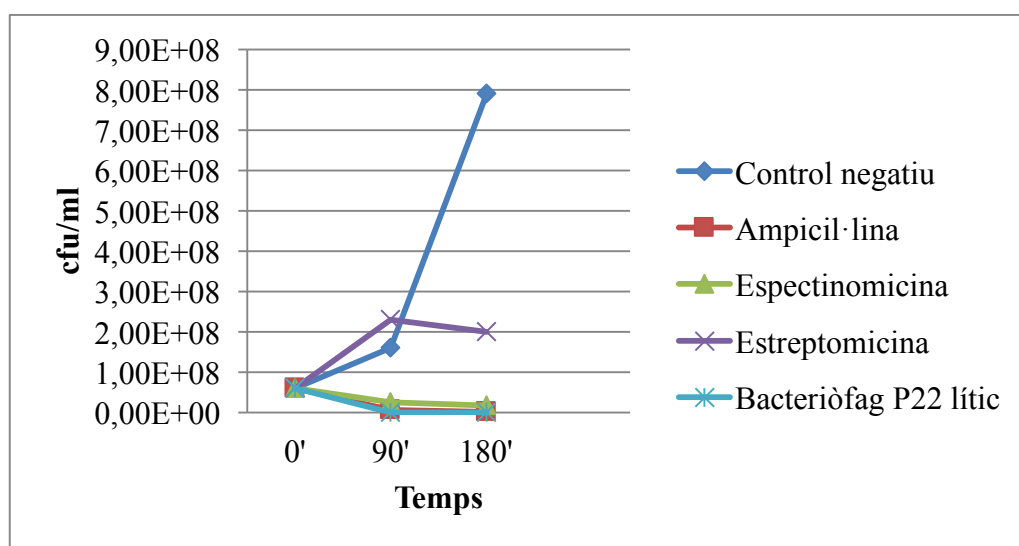


Figura 20. Gràfic de l'evolució del nombre de colònies dels diferents tractaments. (Font: elaboració pròpia)

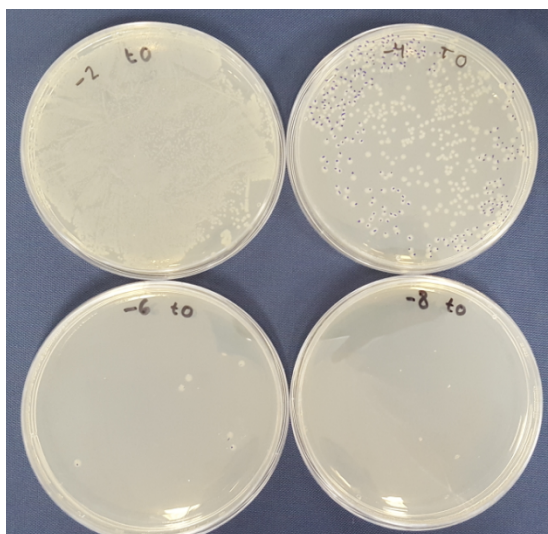


Figura 21. Sembrada del cultiu de control negatiu al minut 0. (Font: elaboració pròpia)

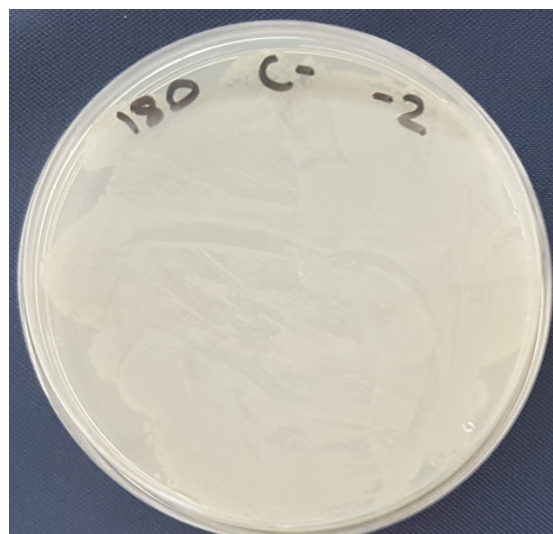


Figura 22. Sembrada de la dilució de 10^{-2} del control negatiu al minut 180. (Font: elaboració pròpia)

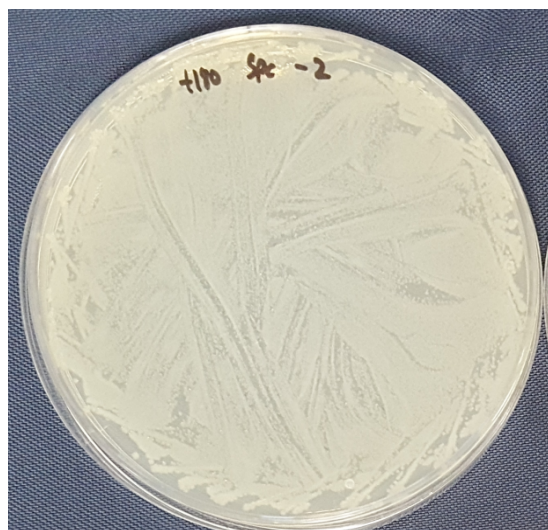


Figura 23. Sembrada de la dilució de 10^{-2} de l'antibiòtic espectinomicina al minut 180. (Font: elaboració pròpia)

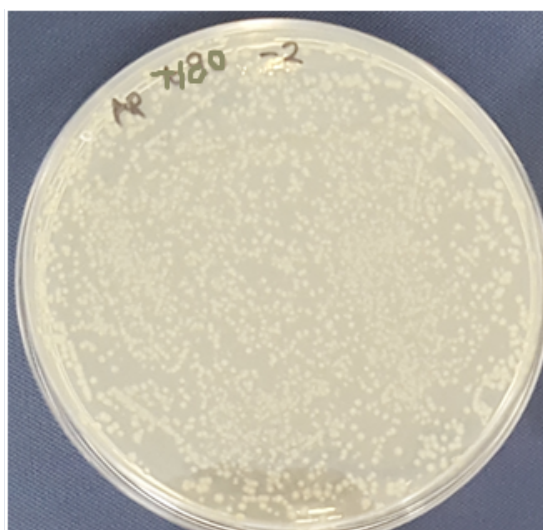


Figura 24. Sembrada de la dilució de 10^{-2} de l'antibiòtic ampicil·lina al minut 180. (Font: elaboració pròpia)

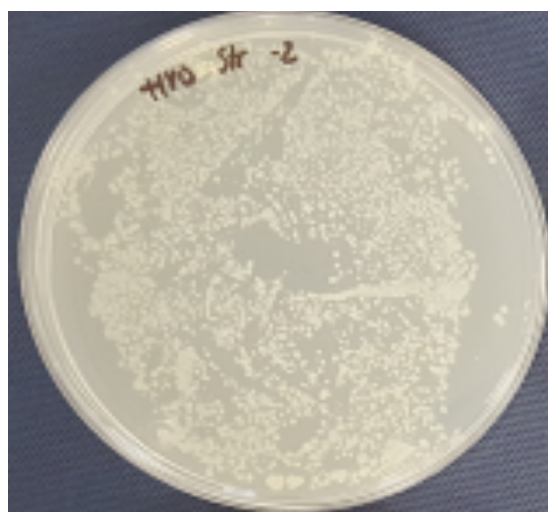


Figura 25. Sembrada de la dilució de 10^{-2} de l'antibiòtic estreptomycinina al minut 180. (Font: elaboració pròpia)

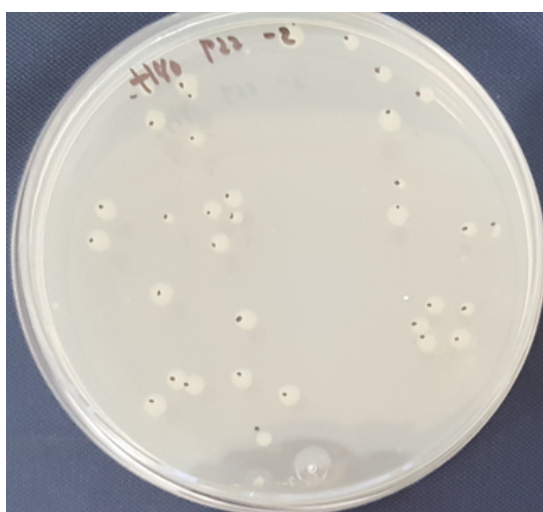


Figura 26. Sembrada de la dilució de 10^{-2} del bacteriòfag P22 lític al minut 180. (Font: elaboració pròpia)

6. Conclusió científica:

- Amb el control negatiu s'ha pogut veure que el bacteri *Salmonella* quan més temps passava més s'anava reproduint, doncs el matràs el qual el sostenia no estava sotmès a cap tipus de tractament antimicrobià. Es pot dir que el cultiu bacterià estava en plena fase de creixement exponencial.
- En el cultiu que contenia l'antibiòtic ampicil·lina el nombre de bacteris ha anat pujant de manera bastant gradual. Al minut 90 però, aquest ha baixat una mica però en els següents minuts ha anat augmentant. Per l'evolució que ha tingut aquest cultiu es pot veure que aquest antibiòtic és de tipus bacteriolític ja que comparant aquests resultats amb els dels altres antibiòtics es pot veure que l'ampicil·lina és el més letal per la cèl·lula, la qual cosa significa que és el que té més activitat matant les cèl·lules bacterianes.
- En el cultiu que contenia l'antibiòtic espectinomicina el nombre de bacteris ha anat augmentant fins al minut 90 i, a partir de llavors, aquest s'ha anat mantenint. Aquesta evolució demostra que es tractava d'un antibiòtic bacteriostàtic ja que, com indica el nom, és un antibiòtic que manté el nombre de viables. Els microorganismes ni creixen amb la presència de l'antibiòtic ni moren de manera immediata com és el cas d'altres tipus d'agents antimicrobians.
- En el cultiu que contenia l'antibiòtic estreptomicina el nombre de bacteris ha anat augmentant de manera gradual. El nombre de bacteris que hi havia al final de l'experiment era molt més alt que el que hi havia al principi, és per aquest motiu que es tracta d'un antibiòtic bactericida. Deixant de banda el cultiu que ha servit de control, el tractament amb aquest antibiòtic ha sigut el menys efectiu de tots.
- El nombre de bacteris del cultiu bacterià que s'estava tractant amb el bacteriòfag P22 lític ha pujat una mica fins al minut 60 però a partir d'aquí, ha anat baixant molt bruscament de tal manera que és el tractament que ha eliminat més cèl·lules bacterianes, ja que el nombre de cèl·lules i l'absorbància era molt més petit que en els altres tractaments.

Per tant, tenint en compte els resultats obtinguts, es pot concloure aquest experiment amb el fet que la hipòtesi plantejada en aquesta pràctica i en tot el treball de recerca en general és certa; realment els bacteriòfags són una alternativa més eficaç per combatre bacteris que els antibiòtics.

ENTREVISTA A SYLVAIN MOINEAU (EN FRANCÈS)

S'ha tingut l'oportunitat de contactar amb el microbiòleg canadenc Sylvain Moineau, el qual és el cap de recerca de bacteriòfags de Canadà, així com també director del centre de referència a nivell mundial de virus bacterians Félix d'Herelle de la Universitat Laval de Quebec, Canadà i professor titular d'aquesta mateixa universitat. A més, cal destacar que per tercer any consecutiu, el doctor figura dins el prestigiós palmarès de científics més influents del món establert per la societat d'informació estratègica Thomson Reuters.

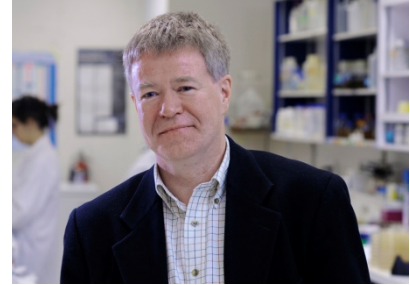


Figura 27. Retrat del doctor Sylvain Moineau. (Font: www.fsg.ulaval.ca)

Se li ha realitzat una entrevista per tal de conèixer una mica la seva història en aquest món de la virologia així com també s'ha aprofitat per deixar clars alguns conceptes relacionats amb el marc teòric del treball:

-Bonjour, Monsieur Sylvain Moineau. Je m'appelle "oreneta felix" et je suis de l'Espagne. En ce moment, je suis en terminale et je suis en train de finir le travail de recherche qu'on doit faire en Espagne pendant deux années. Je connais votre fils à cause d'un échange étudiant que j'ai fait il y a deux ans à son école et j'imagine qu'il vous a déjà parlé de l'intérêt que j'ai pour parler avec vous car mon travail s'agit de la phagothérapie et je sais que vous êtes un investigateur qui étudie les bactériophages très reconnu.

Bonjour, Júlia. Merci pour votre courriel et votre intérêt! Et oui, il m'en a parlé!

-Combien d'années est-ce que ça fait que vous faites des recherches sur les bactériophages?

Depuis le début de mon doctorat, soit septembre 1989...et oui, depuis plus de 25 ans!

-Quel est le motif par lequel vous faites des recherches sur les bactériophages?

J'ai décidé d'étudier la microbiologie après avoir observé pour la première fois des microorganismes avec un microscope optique à l'école secondaire! J'ai décidé de me spécialiser en virologie, après avoir observé des virus de bactéries (phages) avec un microscope électronique! Je suis toujours fasciné par les virus, leur mode de répllication, leur évolution, etc. Je m'intéresse aussi aux mécanismes utilisés par les bactéries pour se défendre contre les phages.

-Est-ce que vous pourriez me dire quelques découvertes que vous avez faites?

Difficile à identifier puisqu'il y en a eu quelques unes. Mais nos réussites les plus « connues » sont liées au système CRISPR-Cas. En effet, nous avons participé à la découverte du système CRISPR-Cas utilisé par les bactéries pour se défendre contre les phages (article publié dans la revue Science en 2007). Nous avons aussi démontré dans un article publié en 2010 dans la revue Nature que le système CRISPR-Cas coupait l'ADN et c'était d'une manière très précise, entre d'autres.

-Comment est-ce que vous vous êtes senti au moment où vous avez su que vous étiez considéré pour une troisième année consécutive, un des scientifiques les plus influents au monde selon la société d'information stratégique Thomson Reuters?

Très honoré. Mais je partage aussi ces reconnaissances avec tous les membres de mon équipe, anciens et présents. J'ai (eu) la chance de superviser des étudiants et étudiantes très talentueux et ayant un esprit d'équipe exceptionnel. Nous avons aussi développé au fil des années un réseau de collaborateurs qui a été essentiel pour nos réussites.

-Est-ce que vous pensez qu'un jour le traitement avec les antibiotiques pourrait être remplacé par la phagothérapie?

À court et moyen terme, je ne crois pas. Par contre, je pense qu'ils seront éventuellement utilisés en combinaison avec les antibiotiques. Ils seront sans doute utilisés aussi dans des cas rares, lorsqu'une personne sera infectée par une bactérie résistante à tous les antibiotiques disponibles.

-Ayant fait la partie pratique de mon travail, j'ai pu voir que le traitement avec des bactériophages lytiques est plus efficace que celui avec des antibiotiques.

Je ne suis pas tout à fait d'accord avec toi ici. Les antibiotiques sont très efficaces aussi et ils sont même plus faciles à manipuler que les phages à cause de la spécificité des derniers.

- En plus, j'ai vu que la phagothérapie n'a pas d'effets secondaires et que c'est très difficile que les bactéries soient résistants aux bactériophages grâce aux cocktails.

Comme un antibiotique, une bactérie peut devenir assez rapidement résistante aux phages. Mais oui, avec l'utilisation de cocktails c'est plus difficile que les bactéries soient résistants aux phages.

- Alors, en considérant tout ça, pourquoi pensez-vous que la phagothérapie n'est pas utilisée? Est-ce que c'est à cause des affaires économiques et politiques ou c'est parce que le traitement avec des antibiotiques c'est encore mieux?

Il est très difficile d'obtenir un brevet pour un phage, voir impossible. Alors qu'il est plus facile de le faire avec une nouvelle molécule antibiotique. Les compagnies pharmaceutiques investissent dans les domaines où tu peux protéger ta propriété intellectuelle. De plus, ces compagnies investissent davantage dans les maladies chroniques (diabète, cholestérol, etc.) que dans des maladies ponctuelles comme les infections...

-Il y a une idée que je ne comprends pas du tout: pourquoi avec l'utilisation de cocktails c'est très difficile que les bactéries se fassent résistantes aux bactériophages?

Les phages sont les entités biologiques les plus abondants et diversifiés sur la planète. Donc, il est possible d'isoler des phages très différents qui vont tuer une même souche bactérienne. Si ces phages sont vraiment différents, ils vont utiliser aussi des façons différentes pour tuer la bactérie. Donc, il devient très difficile pour la bactérie de muter rapidement pour se défendre contre des virus différents.

- Merci beaucoup pour vos réponses et pour être aussi gentil!

Ça fait plaisir. J'espère que ça va vous aider. Bonne chance avec le travail!

5. CONCLUSIÓ

Atesa la informació cercada i els resultats obtinguts al llarg de les experiències del disseny experimental, i basant-me amb l'entrevista realitzada, es pot concloure aquest treball amb el fet que els bacteriòfags són més efectius que el tractament que es fa amb agents antimicrobians sintètics a l'hora de combatre bacteris, pel que fa referència a la hipòtesi plantejada. Tot i els nombrosos avantatges que presenta respecte els antibiòtics, no es pot dir que puguin considerar-se una alternativa a aquests perquè, deixant de banda les resistències, els antibiòtics són molt eficaços i més fàcils d'utilitzar i, a més, encara no s'ha realitzat la suficient recerca en bacteriòfags com per poder substituir-los. En tot cas, el que sí es podria afirmar és que la fagoteràpia podria utilitzar-se, ara per ara, com a tractament complementari als antibiòtics, a no ser que es doni el cas que se sigui resistent a absolutament tots els antibiòtics existents, que aleshores sí que podrien emprar-se com una alternativa a aquests.

Que la teràpia fàgica sigui molt més investigada del que està avui en dia, és un fet que malauradament, trigarà temps en ser-ho perquè a la indústria farmacèutica no li interessa invertir en la recerca d'un tractament de malalties puntuals i de curta durada com serien les infeccions bacterianes. Així doncs, prefereix destinar diners a la investigació de malalties cròniques, ja que la teràpia per tractar-les suposa un cost més elevat per al pacient.

Per acabar, a causa que el tractament amb bacteriòfags requereix estar encara molt més investigat del que està per tal de poder-se emprar com a alternativa als antibiòtics, la població ha de fer un esforç per consumir al mínim i de la manera més adequada possible els antibiòtics, amb la finalitat de reduir al màxim l'acceleració a la resistència d'aquests.

6. OPINIÓ PERSONAL

L'elaboració d'aquest treball m'ha permès no tan sols ampliar els meus coneixements en fagoteràpia, complint els objectius plantejats, sinó que m'ha permès entendre els interessos econòmics als quals està sotmesa la societat d'avui en dia. A més, a nivell personal, m'ha ajudat a aprendre a treballar de manera autònoma, a confiar en mi mateixa, i que, amb molt esforç i constància, un pot aconseguir tot allò que es proposi. Finalment, el fet d'haver pogut estar una mica en contacte amb el món universitari treballant en uns laboratoris tan ben equipats, i el fet d'haver pogut parlar amb un investigador tan reconegut, m'ha fet sentir una persona molt afortunada.

7. BIBLIOGRAFIA I LLOCS WEB

- Llibres:

- ABEDON, Stephen. *Bacteriophage ecology*. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
- HORNE, Robert W. *Estructura y función de los virus*. Barcelona: Omega, 1979.
- JIMENO, Antonio., BALLESTEROS, Manuel. *Biología 2 batxillerat*. Barcelona: Grup Promotor Santillana, 2009.
- MATTHEW K., [et al.]. *Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*. Washington, D.C: ASM Press, 2005.
- WALSH, Christopher. *Antibiotics*. Washington, D.C.: ASM Press, 2003.

- Articles científics:

- THIEL, Karl. "Old dogma, new tricks-21st Century phage therapy". *Nature biotechnology*. Vol. 22, Núm. 1. pp. 31-36. USA, 2004.
- SULAKVELIDZE, Alexander, [et al.]. "Bacteriophage Therapy" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 45, Núm. 3. pp. 649- 659. USA, 2001.

- Llocs web:

- Ernesto García y Rubens López (2002). *Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos*. Recuperat de: <https://oldearth.wordpress.com/microbios-enaccion/los-bacteriofagos> (Consultat: 23/07/2016)
- Enciclopèdia catalana. Recuperat de: <http://www.enciclopedia.cat/> (Consultat: 8/12/16)
- Gené Mayer (2010). *Virology*. Recuperat de: <http://www.microbiologybook.org/book/virology/virology.htm> (Consultat: 20/07/2016)
- Miguel Ángel Cevallos (2016). *Virus contra bacterias, renovada esperanza para tratar infecciones*. Recuperat de: <http://www.comoves.unam.mx/numeros/articulo/172/virus-contra-bacterias-renovada-esperanza-para-tratar-infecciones.htm> (Consultat: 25/08/2016)
- Phage Therapy Center (2000). *Bacteriophage Therapy for Patients Across the Globe*. Recuperat de: <https://www.phagetherapycenter.com> (Consultat: 15/09/2016)