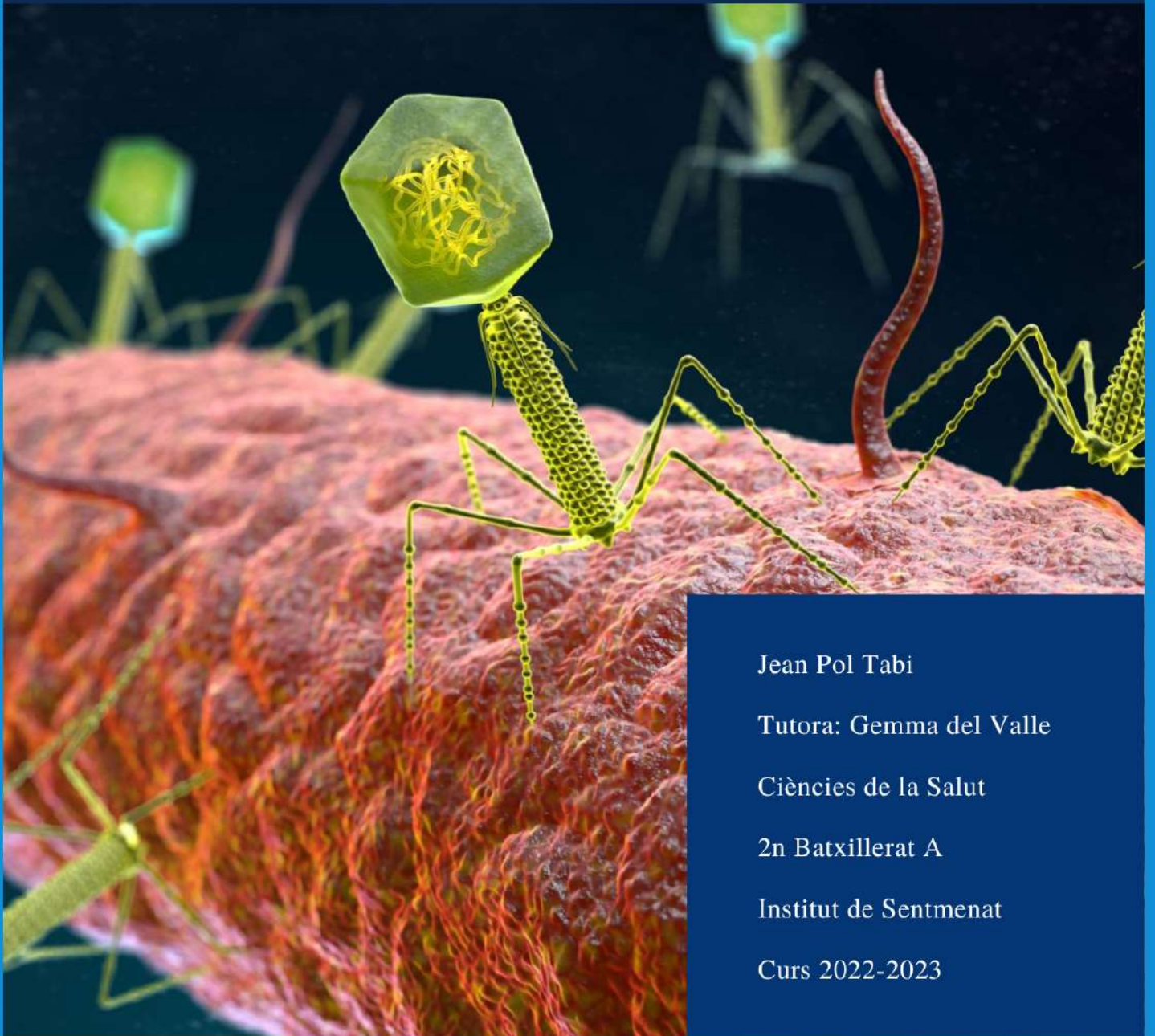


LA FAGOTERÀPIA

UNA ALTERNATIVA AL TRACTAMENT D'INFECCIONS
BACTERIANES AMB ANTIBIÒTICS



Jean Pol Tabi

Tutora: Gemma del Valle

Ciències de la Salut

2n Batxillerat A

Institut de Sentmenat

Curs 2022-2023

AGRAÏMENTS

Voldria donar gràcies a tots aquells que han pogut fer possible aquest treball de recerca, fruit d'un gran esforç en el qual molta gent està involucrada.

En primer lloc, a la Gemma del Valle, la meva tutora i professora de Biologia, que ha comprovat i monitorat la correcta redacció i estructura del meu treball.

Agraeixo també de tot cor l'oportunitat que m'ha brindat la Universitat Autònoma de Barcelona a través del Programa Argó, i a tot l'equip del Departament de Genètica i de Microbiologia. Estic molt agraït per tot allò que m'han ensenyat i els recursos que m'han oferit al llarg de tota l'estada a la Facultat de Biociències.

Gràcies a la Susana Campoy, per introduir-me al món dels bacteriòfags i la fagoteràpia, per totes aquelles classes que s'allargaven més del compte i en el que m'explicava qualsevol dubte que tenia. També agrair tot el treball i professionalitat del Jesús Aranda durant els experiments, sense ell la meva part pràctica no s'hauria pogut dur a terme.

Així mateix, agraeixo a tots els companys amb qui he compartit tantes hores al laboratori i que han fet que els matins al campus siguin més amens, convertint tot plegat en una experiència acadèmica única.

Finalment, vull agrair a la meva família per tot el suport que m'han donat al llarg de tot el procés, donant-me consells i preocupant-se perquè aquest treball es fes realitat.

RESUM

El descobriment accidental l'any 1928 del primer **antibiòtic**, la penicil·lina, pel científic britànic Alexander Fleming, va comportar una nova etapa en la història de la medicina. Inicialment, es va tenir una percepció molt optimista per aquesta troballa, però aquesta eufòria va desaparèixer amb l'aparició de les primeres **resistències bacterianes** als antibiòtics, és a dir, bacteris que no tenen l'efecte desitjat davant d'aquests fàrmacs. En pocs anys s'han format **superbacteris**, i avui en dia hi ha una lluita científica que tracta de buscar aquells mètodes més efectius per atacar aquests nous tipus de microbis, que es preveu que superin al càncer com una de les principals causes de mort al món en les pròximes dècades¹.

Dit això, en aquest treball de recerca es tractaran els **bacteriòfags**, que tenen un paper força important en la lluita esmentada. Actualment, hi ha molts grups de recerca arreu el món que es dediquen a experimentar la seva eficàcia com a alternativa als antibiòtics, entre ells el grup que em va permetre fer la part pràctica d'aquest projecte. Després d'haver explicat alguns conceptes bàsics i exposat els avantatges i desavantatges de la **fagoteràpia** en la part teòrica, donarem pas a la part experimental i comprovarem de primera mà si la capacitat dels bacteriòfags per eliminar bacteris és més alta que la dels antibiòtics.

PARAULES CLAU: Antibiòtic. Resistència bacteriana. Superbacteris. Bacteriòfags. Fagoteràpia.

¹Fergus WALSH, *Superbugs to kill 'more than cancer' by 2050*, 2014.

RESUMEN

El descubrimiento accidental en 1928 del primer **antibiótico**, la penicilina, por el científico británico Alexander Fleming, supuso una nueva etapa en la historia de la medicina. Inicialmente, se tuvo una percepción muy optimista por este hallazgo, pero esta euforia desapareció con la aparición de las primeras **resistencias bacterianas** a los antibióticos, es decir, bacterias que no tienen el efecto deseado frente a estos fármacos. En pocos años se han formado **superbacterias**, y hoy en día existe una lucha científica que trata de buscar los métodos más efectivos para atacar a estos nuevos tipos de microbios, que se prevé que superen al cáncer como una de las principales causas de muerte en el mundo en las próximas décadas.

Dicho esto, en este trabajo de investigación se tratarán los **bacteriófagos**, que tienen un papel muy importante en la lucha mencionada. Actualmente, hay muchos grupos de investigación en todo el mundo que se dedican a experimentar su eficacia como alternativa a los antibióticos, entre ellos el grupo que me permitió hacer la parte práctica de este proyecto. Después de haber explicado algunos conceptos básicos y expuesto las ventajas y desventajas de la **fagoterapia** en la parte teórica, daremos paso a la parte experimental y comprobaremos de primera mano si la capacidad de los bacteriófagos para eliminar bacterias es más alta que la de los antibióticos.

PALABRAS CLAVE: Antibiótico. Resistencia bacteriana. Superbacterias. Bacteriófagos. Fagoterapia.

ABSTRACT

The accidental discovery in 1928 of the first **antibiotic**, the penicillin, by the British scientist Alexander Fleming, led to a new stage in the history of medicine. Initially, there was a very optimistic expectation of this finding, but this joy disappeared with the appearance of the first **bacterial resistance** to antibiotics, i.e. bacteria that do not have the desired effect on these drugs. **Superbugs** have been formed in just a few years, and today there is a scientific battle to find the most effective methods to attack these new types of microbes, which are predicted to surpass cancer as one of the leading causes of death in the world in the coming decades.

Having said that, this research paper will deal with **bacteriophages**, which play a rather important role in the previous battle. There are currently many research groups around the world dedicated to testing its effectiveness as an alternative to antibiotics, including the one that allowed me to do the practical part of this project. After having explained some basic concepts and exposed the advantages and disadvantages of **phage therapy** in the theoretical part, we will observe first-hand if the ability of bacteriophages to eliminate bacteria is higher than the effects of antibiotics in the experimental part.

KEY WORDS: Antibiotic. Bacterial resistance. Superbugs. Bacteriophages. Phage Therapy.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	7
1.1. Elecció del tema.....	7
1.2. Objectius.....	7
1.3. Metodologia.....	7
2. LA MICROBIOLOGIA	8
2.1. Introducció.....	8
2.2. Inic de la microbiologia.....	9
2.3. Classificació dels microorganismes.....	9
3. ELS BACTERIS	10
3.1. Definició.....	10
3.2. Estructura bacteriana.....	11
3.3. Fisiologia bacteriana.....	13
3.3.1. Funció de nutrició.....	13
3.3.2. Funció de relació.....	14
3.3.3. Funció de reproducció.....	14
3.4. Creixement dels bacteris.....	15
3.5. Classificació.....	15
3.6. Salmonella Typhimurium.....	18
4. ELS VIRUS	19
4.1. Definició.....	19
4.2. L'inici de la virologia.....	19
4.3. Estructura viral.....	20
4.4. Els cicles dels virus.....	21
4.5. Classificació dels virus.....	23
4.6. El descobriment dels bacteriòfags.....	24
4.7. Els bacteriòfags.....	24
4.7.1. Bacteriòfag P22 lític.....	25
4.8. La fagoteràpia.....	26
4.8.1. Antecedents.....	26
4.8.2. Avantatges i desavantatges.....	26
4.8.3. Aplicació.....	27
4.8.4. Casos d'ús de la fagoteràpia en humans.....	28
4.8.5. El còctel de bacteriòfags.....	28
4.8.6. Obstacles a superar.....	28

5. ELS ANTIBIÒTICS	29
5.1. Tipus d'antibiòtics.....	30
5.2. Els antibiòtics de la part experimental.....	30
5.3. Les resistències als antibiòtics.....	31
6. PRINCIPALS TÈCNiques EN EL LABORATORI	32
6.1. Material bàsic.....	32
6.1. Mètodes de recomptes de microorganismes.....	33
6.2. Mètodes d'aïllament i de conservació de microorganismes.....	35
7. PART EXPERIMENTAL	36
7.1. Hipòtesi.....	36
7.2. Primer experiment: el test de la gota.....	36
7.2.1. Disseny experimental.....	36
7.3. Segon experiment: comparació de l'eficàcia i l'eficiència entre els bacteriòfags i els antibiòtics.....	38
7.3.1. Disseny experimental.....	40
8. CONCLUSIONS FINALS	45
9. BIBLIOGRAFIA	47
10. GLOSSARI	54
11. ANNEXOS	56

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Elecció del tema

Des d'un inici vaig saber que el meu treball de recerca seria d'un tema científic, no obstant això, no sabia en quin camp enfocar-me fins que vaig ser seleccionat pel Programa Argó de la Universitat Autònoma de Barcelona. Arran de totes les pràctiques que vam realitzar-hi, vaig començar a saber més sobre els antibiòtics i la fagoteràpia. Curiosament, no havia sentit la paraula fagoteràpia abans del programa, cosa que em va fer dubtar sobre l'elecció del tema. Després d'un temps, vaig decidir fer-ho sobre els experiments que fèiem als laboratoris. El tema definitiu del treball és el següent: la fagoteràpia com a alternativa al tractament d'infeccions bacterianes amb antibiòtics.

1.2. Objectius

Els objectius generals que m'he proposat complir en aquesta tesi són els següents:

1. Exposar l'eficàcia dels bacteriòfags en comparació dels antibiòtics davant un bacteri patogen.
2. Saber com funciona un bacteriòfag quan ataca un microorganisme.
3. Conèixer més sobre el paper dels bacteriòfags en la medicina actual i del futur.

1.3. Metodologia

Aquest treball consta d'una primera part merament teòrica, que alhora es divideix en més subapartats que tracten temes relacionats amb els fags i conceptes bàsics sobre el tòpic de la recerca. Respecte a la segona part, la pràctica, s'expliquen els experiments que se m'han permès realitzar al Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, on hem comparat l'eficàcia i l'eficiència que tenen uns tipus de bacteriòfags i antibiòtics davant d'una soca del bacteri *Salmonella enterica*. Gràcies a aquest experiment, hem pogut extreure conclusions que han respost a la meva hipòtesi inicial: els bacteriòfags són més eficients que els antibiòtics per matar bacteris patògens.

2. LA MICROBIOLOGIA

2.1. Introducció

La microbiologia² és la ciència que s'encarrega d'analitzar i estudiar els microorganismes, és a dir, aquells éssers que no són visibles a ull nu i requereixen l'ús del microscopi per observar-los. Aquests organismes, també anomenats microbis, es troben en la Terra en quantitats desmesurades de manera que hi trobem milions d'espècies diferents, cadascuna amb morfologies i fisonomies úniques.

Una de les bases d'aquesta ciència és comprendre els processos biològics més bàsics, ja que els microorganismes són els millors models per entendre'ls a escala **unicel·lular** i **pluricel·lular**. Aprofitant que són essencials en molts aspectes vitals, un altre fonament de la microbiologia és posar a la pràctica el coneixement que s'aconsegueix en l'estudi d'aquests organismes pel benefici humà, aplicant-ho a la medicina i la biotecnologia. La producció de vacunes i proteïnes específiques són un clar exemple dels beneficis que busca aquesta disciplina.

Respecte als microbis, tot i ser tan petits, el seu paper dins la biosfera no ho és pas. Estan àmpliament distribuïts arreu del món, allà on hi hagi aigua líquida: des de les glaceres de l'Antàrtida fins a les profunditats de l'oceà Pacífic. Aquests éssers són indispensables pel desenvolupament de la vida al nostre planeta i, paral·lelament, la vida dels humans. Hi podem trobar milions de microorganismes dins del nostre cos, i al contrari del que molta gent pot pensar, la immensa majoria de la nostra **microbiota** és beneficiosa. Des d'actuar com a barrera contra agents externs que podrien causar-nos una infecció, fins a digerir els compostos dels aliments que ingerim.

Paradoxalment, hi ha milers de milions d'aquests éssers al nostre planeta, però s'estima que no hem pogut descobrir ni l'1% del total. Cada any es descobreixen noves espècies, i n'hi ha que s'extingiran sense haver pogut ser estudiades. Dit això, l'interès sobre els microbis és molt més gran que fa uns pocs segles i el nombre de grups de recerca especialitzats en microbiologia cada cop tenen més importància en el desenvolupament de la humanitat.

² La paraula té origen grec: *mikros* "petit", *bios* "vida" i *logos* "ciència".

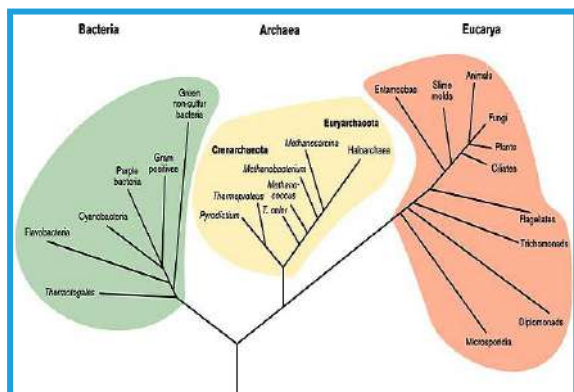
2.2. Inici de la microbiologia

Tot va començar amb les primeres observacions dels microorganismes amb un microscopi, pel neerlandès Antonie van Leeuwenhoek a mitjans del segle XVII. Considerat el pare de la microbiologia, va descobrir els glòbuls de la sang, els protozous, els bacteris i els espermatozoides, entre d'altres. Altrament, Robert Hooke, un científic anglès de la mateixa època, va publicar el 1665 *Micrographia*, el primer llibre amb dibuixos de microbis. En aquest llibre descriu una làmina de suro i fa servir per primer cop la paraula *cèl·lula* per referir-se a les cavitats que conté.

La història dels microorganismes no es limita a aquestes persones, hi ha moltes més que han col·laborat a la microbiologia durant els últims segles. De fet, el progrés d'aquesta disciplina i de la ciència en general no seria possible sense el coneixement i els estudis d'aquells que s'hi van dedicar anteriorment. Avui en dia, hi ha milers de científics investigant aquests petits organismes contínuament, i amb molta seguretat la seva història continuarà molts anys més.

2.3. Classificació dels microorganismes

Figura 1. Arbre filogenètic dels éssers vius.



Font: <https://www.sciencedirect.com>

Actualment, es fa servir un arbre filogenètic per classificar tots els éssers cel·lulars coneguts, basat en relacions evolutives entre totes les espècies i l'existència dels ascendents en comú. Convé remarcar que els microorganismes són una àmplia majoria en aquest arbre, i que només tres branques corresponen a éssers de majoria pluricel·lular (animals, fongs i plantes).

Les formes de vida acel·lular, com els virus, no apareixen aquí. Això és degut a la creença que aquests no tenen avantpassats en comú, sinó que han anat evolucionant paral·lelament a partir d'aquells organismes que han anat parasitant al llarg de la història.

Específicament, els microbis es classifiquen en cinc grups³:

³ Atès el tema d'aquesta tesi, es descriuran en detall el grup dels bacteris i els virus.

- Protozous
- Fongs
- Algues
- Bacteris
- Virus

La seva diversitat és molt gran i cal recordar que estan en constant evolució, adaptant-se a les condicions en les quals estan sotmeses. Tots menys els virus, que són acel·lulars⁴, es distingeixen entre unicel·lulars o pluricel·lulars, així com entre **eucariotes** o **procariotes**. També podem diferenciar aquells microorganismes autòtrofs dels que són heteròtrofs. Dit això, els bacteris són els primers organismes amb els quals entrarem en detall.

3. ELS BACTERIS

3.1. Definició

Els bacteris són microorganismes procariotes i unicel·lulars que es reproduïxen per **bipartició**. Estan dotats de mecanismes productors d'energia i de material genètic, indispensables pel seu creixement i desenvolupament.

Aquests organismes han arribat a ser un dels principals enemics en la història de la humanitat. Un exemple molt conegut és el de la pesta negra, que al segle XIV, va causar a Europa aproximadament 25 milions de morts. Avui en dia se sap que el culpable va ser el bacteri *Yersinia pestis*. Malauradament, també se sap que aquells bacteris amb resistència als antibiòtics no estan gaire lluny de convertir-se en un problema que afectarà la medicina a gran escala. Malgrat això, molt pocs bacteris causen malalties als humans, i aquells que no ho fan (l'àmplia majoria) ens han ajudat en molts àmbits.

L'estudi de l'estructura dels bacteris avança molt ràpidament, i s'està aconseguint la identificació bioquímica de moltes parts subcel·lulars d'aquests microorganismes, cosa que ha permès conèixer més sobre la relació que tenen amb els humans, sigui beneficiosa o perjudicial. Per exemple, el descobriment de moltes estructures bacterianes catalogades com

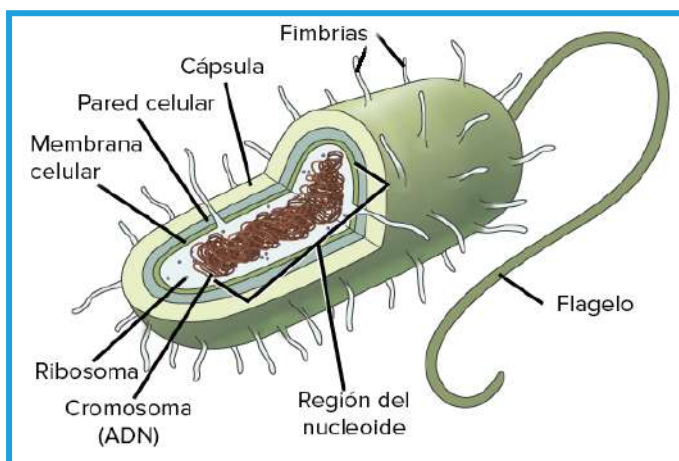
⁴ Manca de cèl·lules.

a **immunògens** ens ha donat l'oportunitat de crear vacunes que han ajudat notablement a la medicina moderna. Addicionalment, gràcies al coneixement de la composició bioquímica de l'estructura d'aquests éssers i del seu metabolisme, hem tingut la possibilitat de comprendre com funcionen realment els antibiòtics i crear-ne de nous per tal de contraatacar els bacteris patògens.

3.2. Estructura bacteriana

Les estructures que presenta un bacteri es poden dividir en dos tipus: les permanents, que es troben en tots els bacteris, i les variables, que poden no existir en tots aquests organismes. De les primeres en trobem: la paret cel·lular, la membrana cel·lular, els ribosomes i el material genètic. Les variables són: els flagels, les fimbries o pilis, la càpsula i les espores.

Figura 2. Parts d'un bacteri.



També podem separar les estructures segons siguin internes o externes. Per un costat, de les estructures internes o citoplasmàtiques en trobem les següents:

Font: <http://irenepratsbiogeo3reso.blogspot.com>

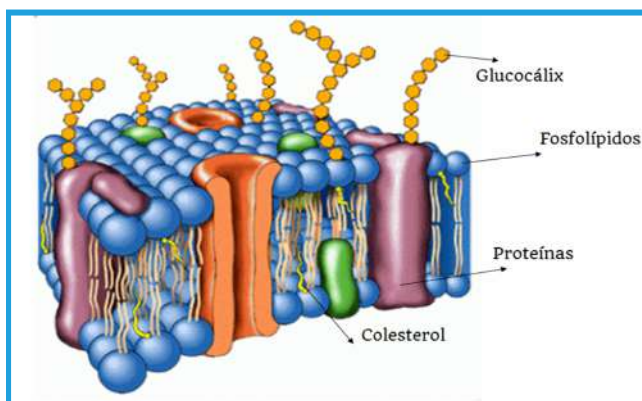
- **Material genètic:** És l'àcid desoxiribonucleic o ADN. Tant a les procariotes com a les eucariotes està constituït per dues cadenes helicoidals formades per bases nitrogenades unides entre si per enllaços d'hidrogen, formant una doble hèlix. El que diferencia els procariotes dels eucariotes és que els primers no tenen membrana nuclear. Tot i això, hi ha presència d'una zona nuclear, de manera que hi trobem concentrat ADN circular.

- **Plasmidis:** És material genètic que es troba fora de la zona nuclear, és a dir, extracromosòmic. Estan constituïts per ADN circular bicatenari i poden transferir-se de bacteri a bacteri a través d'un procés anomenat conjugació, que en molts casos permet transmetre la resistència a antibiòtics.
- **Ribosomes:** Es troben dispersats lliurement pel citoplasma i són més petits que a les cèl·lules eucariotes. Estan constituïts per proteïnes i àcid ribonucleic o ARN. La seva funció principal és la síntesi de proteïnes.
- **Cossos d'inclusió:** Són estructures subcel·lulars que es formen com a resultat d'una infecció viral.

Per l'altre costat, de les estructures externes o de l'embolcall cel·lular en trobem les següents:

- **Membrana cel·lular:** Està formada per una bicapa lipídica de fosfolípids **amfipàtics**. A diferència de les eucariotes, no conté esterols. És vital pels bacteris i té la funció de separar l'interior de l'exterior cel·lular. Té permeabilitat selectiva⁵, compleix la funció de barrera osmòtica i permet l'entrada de nutrients i la sortida de residus.

Figura 3. Il·lustració de la bicapa lipídica.



Font: <https://sites.google.com/site/arianny2016biologia>

- **Paret cel·lular:** S'ubica fora de la membrana plasmàtica i es troba en tots els bacteris. És l'encarregada de donar-los forma i està formada per **peptidoglicà**, compost que ha permès classificar els bacteris en dos grans grups que s'explicaran posteriorment.

És important saber que aquells fàrmacs que impedeixen la seva formació produeix la **lisi** i mort del bacteri, de manera que és el lloc d'acció de certs antibiòtics.

⁵ Capacitat de deixar entrar certs elements dins la cèl·lula.

Hi ha certes parts d'aquests organismes que no es troben en cadascun d'ells; aquestes parts reben el nom de variables. N'hi ha unes quantes:

- **Càpsula:** Es troba fora de la paret cel·lular. Generalment es tracta d'un polisacàrid. Com a funcions principals té evitar que el microorganisme s'assequi i protegir-lo de la fagocitosi per part d'organismes més grans. En alguns casos, la virulència del bacteri es correlaciona amb la presència d'aquesta càpsula.
- **Pilis o fimbries:** Són estructures de naturalesa filamentosa i proteica. La seva funció és adherir-se a receptors específics i superficials. Per tant, a diferència dels flagels, no compleixen funcions de desplaçament. Existeix un altre tipus de pilis anomenat pilis sexuals i la seva funció consisteix a intercanviar material genètic entre bacteris.
- **Flagel:** Són filaments proteics, helicoidals, prims i rígids que donen la capacitat de desplaçar-se al bacteri. El nombre de flagels que poden tenir varia des d'un sol fins a centenars de flagels.
- **Espora o endòspora:** És una estructura resistent a situacions estressants pels bacteris com la calor, la falta d'aigua o els desinfectants químics. Pot arribar a germinar i formar un bacteri idèntic a l'original. A causa del fet que molts bacteris amb espores són agents patògens, tenen una gran importància dins l'àmbit mèdic i de la indústria alimentària.

3.3. Fisiologia bacteriana

3.3.1. Funció de nutrició

Els bacteris poden obtenir energia i nutrients de diverses formes, sigui realitzant processos químics o establint relacions estretes amb altres organismes (mutualistes i parasitàries). Aquestes són les principals maneres:

- ◆ **Fotosíntesi:** els bacteris fotosintètics o autòtrofs utilitzen l'energia del sol per produir el seu propi aliment.

- ◆ **Descomponedor:** en aquest cas els bacteris descomponen residus i organismes morts en molècules de menor grandària.
- ◆ **Quimiòtrofs:** s'aconsegueix energia a partir dels compostos químics que es troben al seu medi.
- ◆ **Mutualisme:** és el cas de bacteris que depenen d'altres per sobreviure. Per exemple, n'hi ha que viuen en les arrels d'algunes plantes lleguminoses i converteixen les molècules que tenen nitrogen, en nitrogen que la planta pot fer servir. Alhora, les arrels aporten nutrients als bacteris i d'aquesta manera els dos es beneficien.
- ◆ **Parasitisme:** és el cas d'aquells bacteris que es beneficien de l'hoste que parasiten, però l'hoste és perjudicat.

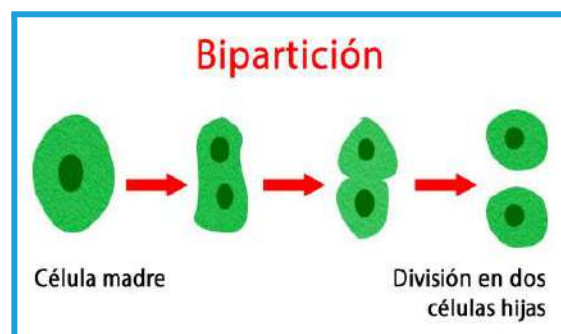
3.3.2. Funció de relació

Aquests organismes també tenen l'habilitat de respondre als canvis del medi on viuen. Per exemple, en forma de moviment. Aquest desplaçament es pot dur a terme, o bé mitjançant moviments de contracció i dilatació o bé a través dels flagels. També poden respondre davant d'estímuls lluminosos i químics.

3.3.3. Funció de reproducció

Els bacteris tenen reproducció asexual, el sistema de reproducció més primitiu i, conseqüentment, més estès arreu del món. El mètode més freqüent és la bipartició o fissió binària. A través d'aquest tipus de reproducció, a partir d'una cèl·lula original s'originen dos individus genèticament idèntics.

Figura 4. Esquema de la bipartició.



Font: <https://www.ejemplode.com>

A més de la bipartició, els bacteris tenen mecanismes parasexuals, que són els mecanismes que permeten l'intercanvi d'informació genètica amb altres bacteris. N'hi ha tres:

- ◆ **Conjugació:** consisteix en la transferència d'un plasmidi a través del contacte amb la cèl·lula donadora per un pèl sexual.
- ◆ **Transducció:** el material genètic es transporta mitjançant un bacteriòfag.
- ◆ **Transformació:** procés en el qual un bacteri pot introduir en el seu interior fragments d'ADN que estaven lliures al medi o procedien de la lisi d'altres bacteris.

3.4. Creixement dels bacteris

La mida dels bacteris va des dels 0,5 μm^6 fins als 3 μm , però hi ha exemplars que han arribat fins als 10 μm . Si els bacteris es troben en condicions adequades de temperatura, **pH** i nutrients, creixen fins a arribar a la mida cel·lular crítica, moment en el qual poden dividir-se per fissió binària i augmenta progressivament el nombre de cèl·lules. Per la seva dimensió, no s'estudia el creixement de cèl·lules individuals, sinó que s'estudien les poblacions.

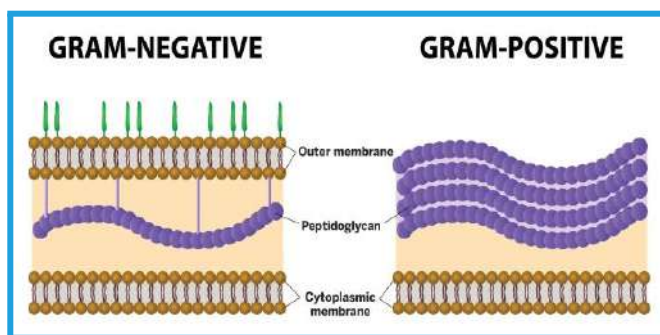
3.5. Classificació

Hi ha moltes formes de classificar els bacteris. Si ens basem en l'arbre filogenètic esmentat anteriorment, veiem que formen part del regne *Prokaryota*, i seguint criteris evolutius aquests se subdivideixen en eubacteris (*Bacteria*) i arqueobacteris (*Archaea*). D'una banda, els arqueobacteris agrupen aquells bacteris sense peptidoglicà, com els **anaerobis**. Aquests viuen en condicions àcides i de temperatures elevades. També inclou aquelles espècies que viuen en condicions salines i que redueixen el diòxid de carboni a metà, per tant, les que viuen a les profunditats del mar. De l'altra banda, els eubacteris són aquells que viuen al sòl, l'aigua i dins els éssers vius. Dins d'aquest grup estan els bacteris que són clau en el camp de la medicina, així com els bacteris verds fotosintètics, els bacteris porpra fotosintètics i els cianobacteris.

⁶ Micròmetre o 0,0001 centímetres.

També es poden classificar segons el color que adquireixen després d'aplicar-los certs tipus de tincions, com la tinció de Gram. Aquesta tinció, permet diferenciar visualment aquells bacteris grampositius dels gramnegatius.

Figura 5. Comparació de paret cel·lular grampositiva i gramnegativa.

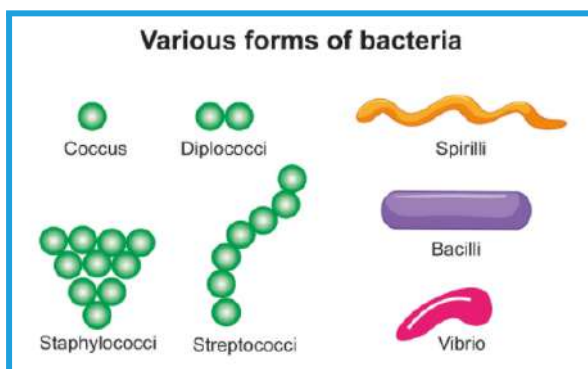


Font: <https://cen.acs.org>

Els primers són aquells que es tenyeixen de blau violeta. Això és degut al fet que la seva paret cel·lular està composta fins a un 90% de peptidoglicans. Un exemple d'aquest tipus és l'*Staphylococcus aureus*. Mentrestant, els gramnegatius es tenyeixen de color vermell i la seva paret és més fina, amb només un 10% de peptidoglicans. Són gramnegatius els *Neisseria meningitidis*, causant de la meningitis meningocòccica.

Una altra forma més popular de diferenciar la varietat de bacteris és basant-se en la seva morfologia. Trobem tres formes bàsiques: cocs (forma esfèrica), bacils (forma de bastó, tant rectes com corbats) i espirils (forma d'espiral). Cadascuna d'aquestes formes bàsiques pot variar. Per exemple, els cocs es classifiquen segons el seu pla de divisió. Si el pla de divisió és únic, els cocs seran diplococs o cocs en cadena (gènere *Streptococcus*). Si és múltiple, diem que els cocs s'agrupen en tètades (gènere *Staphylococcus*), sempre conservant la seva

Figura 6. Diverses formes de bacteris.



Font: <https://www.vedantu.com>

independència cel·lular. Els bacils poden ser al mateix temps curts (coccobacils) o llargs (gènere *Bacillus*). Hi trobem també el gènere *Vibrio*, que bàsicament són bacils en forma de coma; i els bacils agrupats en forma de lletres xineses, el gènere *Corynebacterium*.

Si ens fixem en la capacitat que tenen els bacteris de viure amb oxigen o sense, diferenciem els aerobis estrictes, els anaerobis estrictes i els anaerobis facultatius. Els primers són aquells que necessiten oxigen per viure, com els del gènere *Campylobacter*. Els anaerobis estrictes

són els que no en necessiten, com els del gènere *Bacteroides*. Els anaerobis facultatius són bastant peculiars: són capaços de desenvolupar-se amb oxigen o sense, com per exemple, els bacteris del gènere *Salmonella*.

Finalment, tenim la classificació dels bacteris segons el seu metabolisme. Segons la seva font d'energia, estan els bacteris quimiòtrofs i els fotòtrofs. Els primers són aquells que extreuen l'energia de diferents substàncies químiques, mentre que els segons són els que fan servir la llum solar per a realitzar la fotosíntesi. Segons l'origen del carboni (els nutrients) diferenciem els bacteris heteròtrofs, que obtenen el carboni a través de compostos orgànics, i els bacteris autòtrofs, que l'obtenen a partir del diòxid de carboni.

D'aquesta manera tenim quatre grans grups:

Taula 1. Classificació dels bacteris segons el metabolisme

GRUP	Fotolitoautòtrofs	Fotoorganòtrofs	Quimiolitoautòtrofs	Quimioorgano-heteròtrofs
FONT D'ENERGIA	Radiació solar (llum)	Radiació solar (llum)	Quimiòtrofs	Quimiòtrofs
ORIGEN DEL CARBONI	Diòxid de carboni (CO ₂)	Matèria orgànica	Diòxid de carboni (CO ₂)	Matèria orgànica
EXEMPLES	cianobacteris ⁷	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> , un bacteri que sol viure a fonts termals.	Els bacteris del ferro	<i>Escherichia coli</i> i el <i>Lactobacillus casei</i>

Font: Elaboració pròpia

Cal recordar que en tots els casos, una mateixa espècie de bacteri té diferents variants. Aquestes variants són subdivisions d'una mateixa espècie que difereixen en la composició genètica i en els seus components químics. Sovint, per exemple, en el cas de la fagoteràpia, moltes vacunes o medicaments són efectius només davant d'una determinada variant.

⁷ Són bacteris gramnegatius aerobis i els primers productors d'oxigen a la Terra.

3.6. *Salmonella Typhimurium*

En la part pràctica d'aquest treball treballarem amb la soca d'una serovar⁸ de la *Salmonella enterica*, la *Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*.

Taula 2. Taxonomia de la *Salmonella Typhimurium*.

Domini	<i>Bacteria</i>
Fílum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacterales</i>
Família	<i>Enterobacteriaceae</i>
Gènere	<i>Salmonella</i>
Espècie	<i>Salmonella Typhimurium</i>

Font: Elaboració pròpia

Morfològicament, aquest bacteri és un bacil i conté flagels al voltant. Seguint la classificació de tinció de Gram, és gramnegatiu. També és un microorganisme anaerobi facultatiu. No té càpsula i com a característica comuna de les salmonel·les, és un agent zoonòtic, és a dir, és el causant d'una malaltia que es transmet dels animals als humans.

La salmonel·losi és una malaltia infecciosa produïda per les salmonel·les i la seva principal manifestació és la gastroenteritis aguda. És de transmissió alimentària, trobant-se majoritàriament en la superfície dels ous, la pell dels tomàquets i aquelles verdures i fruites que hagin tocat el terra. És al mateix temps una de les causes més freqüents d'intoxicacions alimentàries a Catalunya i al conjunt d'Europa.

Malgrat això, l'LT2 és una soca de baixa virulència i, com en el cas de l'experiment que s'ha realitzat en la part pràctica, és utilitzada principalment en estudis de microbiologia. Es va aïllar per primer cop en la dècada de 1940 per K. Lilleengen. Malauradament, aquest bacteri té cada cop més resistència als antimicrobians que tradicionalment s'han aplicat per evitar i tractar la seva proliferació en les explotacions d'aviram, on és més probable que hi broti. Per aquesta raó, nosaltres, els consumidors, tenim la responsabilitat de dur a terme bons hàbits d'higiene per prevenir la seva transmissió.

⁸ Es refereix a les distintes varietats d'una mateixa espècie de bacteri o virus.

4. ELS VIRUS

4.1. Definició

Els virus són partícules microscòpiques acel·lulars, ja que no tenen estructura cel·lular i conseqüentment manquen de citoplasma i els **enzims** necessaris per a realitzar el metabolisme. És per això que quan aquests microorganismes es troben fora de les cèl·lules, les anomenem partícules víriques o virions. Estan constituïdes per un àcid nucleic, el genoma víric envoltat per una càpsula proteica i, de vegades, una coberta membranosa. S'estima que hi ha 10^{31} virus al nostre planeta, convertint-se en les entitats amb àcid nucleic més abundants i diverses a la Terra.

Al llarg de la història alguns virus han causat nombroses desgràcies a la humanitat, no anant molt enrere tenim el cas de la COVID-19. Les pandèmies i epidèmies que han causat han provocat milions de morts. Malgrat aquesta percepció tan negativa que la població general té sobre els virus, no sempre són perjudicials per a nosaltres. De fet, són necessaris per mantenir en equilibri la població dels bacteris, tant els beneficiosos com aquells que són patògens. Posteriorment, veurem que el bacteriòfag de l'experiment ataca a la *Salmonella*, com hem vist abans, un bacteri que molts cops posa en perill la salut pública.

4.2. L'inici de la virologia

El primer contacte que van tenir els metges amb els virus va ser al segle XIX, gràcies als descobriments de Louis Pasteur. Ell mateix va treballar amb la ràbia i va esbrinar que es podia transmetre d'animals a persones. Tot seguit, va elaborar una teoria que postulava que les malalties eren causades per petits agents infecciosos.

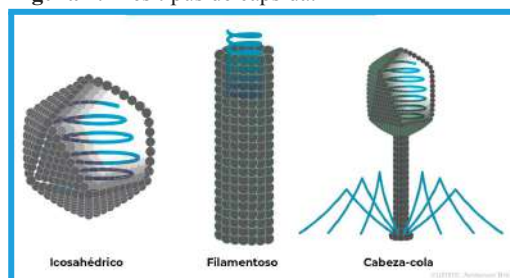
Se sap que en l'any 1899 es va anomenar per primer cop a un virus com a tal, el virus del mosaic del tabac. El microbiòleg neerlandès Martinus Beijerinck estava estudiant els experiments del biòleg rus Dimitri Ivanovski, qui havia utilitzat uns filtres per mostrar que la saba d'una planta del tabac infectada continuava sent contagiosa per a una planta del tabac sana, tot i estar filtrada. D'aquesta manera, en Martinus va anomenar a aquesta substància virus i va iniciar alhora una nova disciplina: la virologia.

4.3. Estructura viral

Els virus són molt més petits que els bacteris, de manera que el rang de la seva mida va des dels 100 nanòmetres fins a 1 micròmetre de diàmetre. Comparteixen tres característiques:

- **El genoma víric:** està constituït per una o diverses molècules d'ADN o ARN⁹, però mai de les dues alhora. L'àcid nucleic pot ser de cadena oberta i circular, i aquesta pot ser monocatenària o bicatenària.
- **La càpsida:** es tracta de la coberta proteica que envolta el genoma del virus. La seva funció consisteix a protegir l'àcid nucleic i en alguns casos reconèixer els receptors de membrana de les cèl·lules que el virus pugui parasitar. La càpsida està formada per capsòmers, proteïnes que es disposen de forma regular i simètrica.

Figura 7. Tres tipus de càpsida.



Font: <https://www.elagoradiario.com>

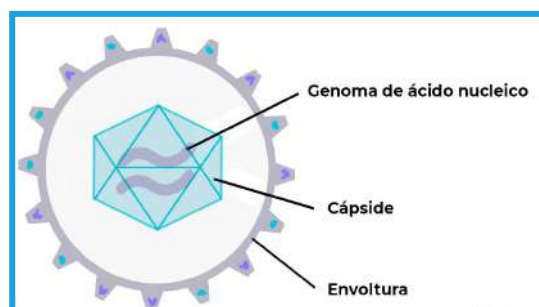
Depenent de la seva morfologia hi trobem els següents tipus:

- **Càpsida icosaèdrica:** tenen una estructura polièdrica i infecta els animals.
 - **Càpsida helicoïdal:** està formada per capsòmers col·locats helicoïdalment i infecten els vegetals.
 - **Càpsida complexa:** es troba als bacteriòfags, que infecta bacteris. Té dues parts; el cap, que és icosaèdric, i la cua on es troba una placa basal la qual s'uneix a fibres basals.
- **Coberta membranosa:** Els grups de virus que provoquen la ràbia, l'hepatitis, la grip, la verola i la sida tenen una coberta de tipus membranós que envolta la nucleocàpsida¹⁰. La coberta està composta per una doble capa lipídica.

⁹ Àcid ribonucleic

¹⁰ Conjunt de genoma víric i càpsida.

Figura 8. Estructura viral.



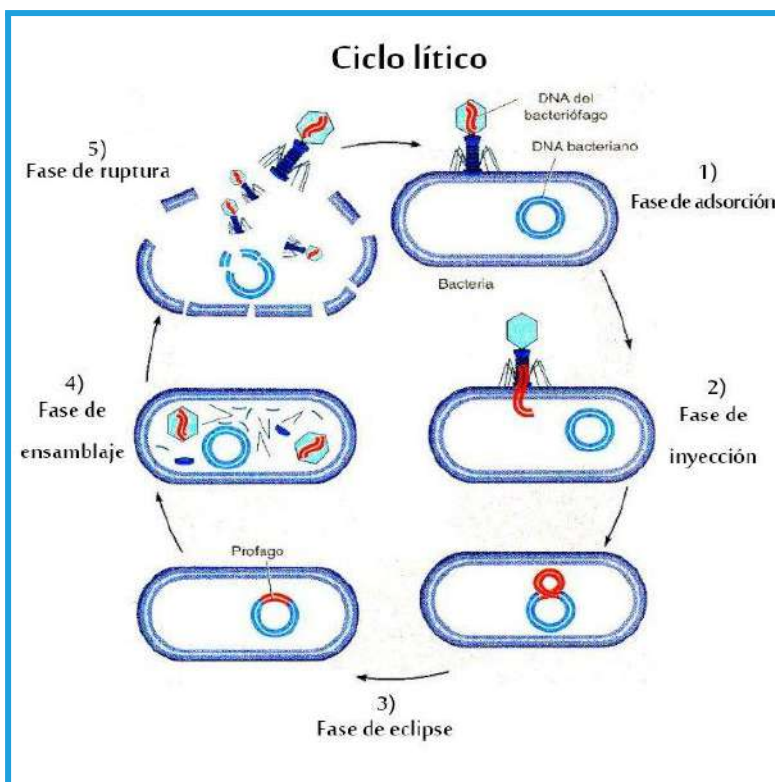
Font: <https://www.elagoradiario.com>

4.4. Els cicles dels virus

Els virus no fan la funció de nutrició, sinó que necessiten infectar una cèl·lula hoste per continuar amb el cycle vital víric. Ens fixarem com és en el cas dels bacteriòfags. N'hi ha dos tipus de cicles.

- **CICLE LÍTIC:** aquest procés condueix a la destrucció de la cèl·lula hoste com a final. Té les següents fases:

Figura 9. Esquema del cycle lític.



Font: <https://www.explicacion.net/ciclo-litico-y-lisogenico>

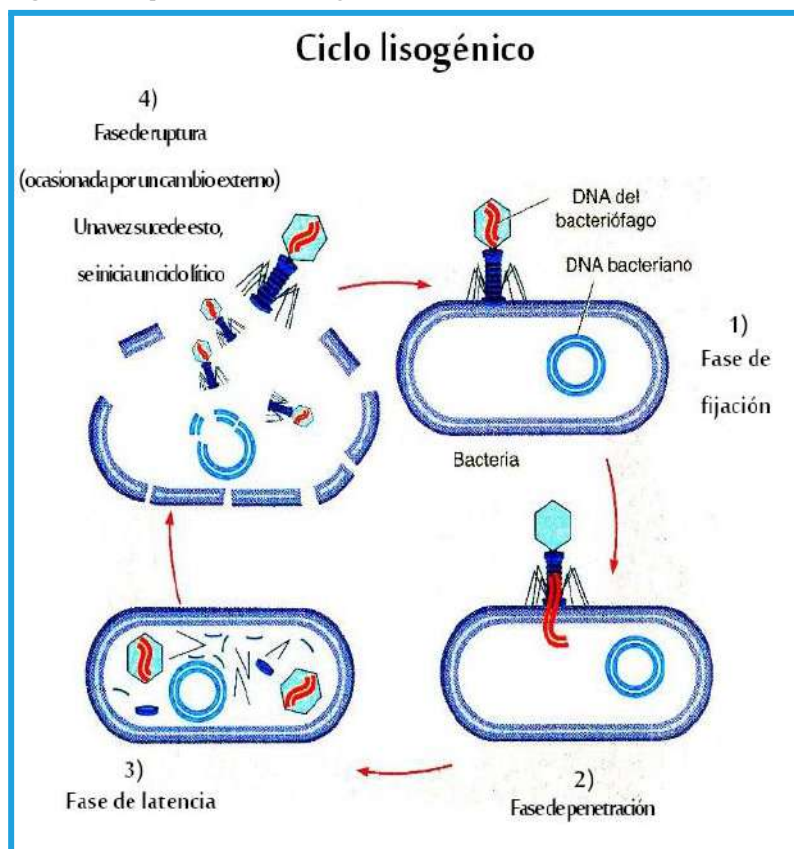
1. **Fase de fixació o adsorció:** les cèl·lules hostes tenen receptors específics en les seves membranes pels virus que les infecten, de manera que s'uneixen components de la càpsida o de la coberta membranosa amb glicoproteïnes o lipoproteïnes de la membrana de la cèl·lula hoste.

L'evolució dels virus ha permès que cada tipus tingui la capacitat de fixar-se a receptors específics en la membrana d'un tipus determinat de cèl·lula. Al mateix temps, els hostes poden fer-se resistents al virus a través de mutacions, canviant aquests receptors.

2. **Fase de penetració:** en el cas del bacteriòfag, perfora la paret cel·lular de l'hoste a través d'enzims liozims situats a la placa basal. Tot seguit, contrau la beina de la seva cua i hi injecta l'ADN d'aquest orifici, de manera que el genoma víric es transporta directament al citoplasma bacterià.
 3. **Fase d'eclipsi:** en aquesta fase es produeix la màxima activitat metabòlica provocada per l'ADN del virus. El genoma víric dirigeix la síntesi dels components que formaran els bacteriòfags, fent servir tots els recursos de la cèl·lula hoste (nucleòtids, aminoàcids, ARNt, ribosomes i enzims).
 4. **Fase d'acoblament:** Es reuneixen els capsòmers que s'han format, donant lloc a càpsides, i les noves molècules d'ADN víric es pleguen i hi penetren.
 5. **Fase de lisi o alliberament:** Es produeix la lisi de la cèl·lula hoste i els nous virions, que ja són capaços d'infectar altres bacteris, i surten a l'exterior.
- **CICLE LISOGÈNIC:** En alguns casos, els bacteriòfags no destrueixen la cèl·lula quan la infecten, sinó que la seva informació genètica s'incorpora a l'ADN de la cèl·lula hoste, a la qual anomenem lisogènica. Aleshores anomenem **pròfags** a aquests virus i el seu ADN pot viure unes quantes generacions dins de l'hoste en forma latent, proporcionant immunitat a infeccions del mateix virus.

Tot canvia quan un estímul en concret provoca la separació de l'ADN del pròfag de l'ADN de la cèl·lula hoste. A partir d'aquí, l'ADN del pròfag començarà un cicle lític des de la fase d'eclipsi.

Figura 10. Esquema del cicle lisogènic.



Font: <https://www.explicacion.net/ciclo-litico-y-lisogenico>

4.5. Classificació dels virus

Ja que els virus són partícules acel·lulars, no entren dins del sistema de classificació biològica dels organismes cel·lulars, com sí que és en el cas dels bacteris. És per això que la seva classificació és un debat constant: segons la definició tradicional no són éssers vius, però això no significa estrictament que no siguin vius.

De totes maneres, se sol classificar-los guiant-se per les seves característiques:

Taula 3. Classificació general dels virus.

Tipus de virus	Càpsida	Àcid nucleic	Embolcall	Exemple
Virus vegetals	Helicoidal	ARN monocatenari	Absent	Mosaic del tabac
Bacteriòfags	Complexa	ADN bicatenari	Absent	Bacteriòfag T4
Virus animals	Icosaèdrica	Tots tipus	Freqüent	Grip, SIDA

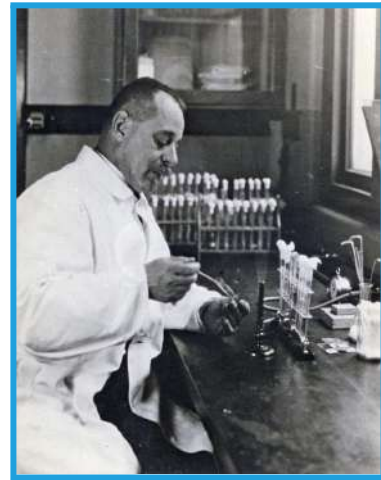
Font: Elaboració pròpia.

4.6. El descobriment dels bacteriòfags

L'any 1898, el químic britànic Ernest Hanking va publicar en la revista *Annales de l'Institut Pasteur* un article on descrivia certa activitat antibacteriana en els rius Ganges i Yamuna (Índia). Explicava que la presència d'un agent filtrable reduïa els casos de còlera (provocat pel bacteri *Vibrio cholerae*) en les poblacions properes als rius anteriors. Sense saber-ho, va escriure el primer article on s'exposava l'acció antibacteriana pròpia dels bacteriòfags.

Frederick Twort, un bacteriòleg britànic, va publicar l'any 1915 el primer article sobre virus que infectaven bacteris i els mataven. Tot i això, no va saber exactament què eren aquests agents infecciosos. L'any 1917, el microbiòleg canadenc Fèlix d'Herelle va anomenar per primer cop a un bacteriòfag com a tal, exactament a un que atacava el bacil de la disenteria. A diferència del Twort, ell va tenir clar que aquest tipus de virus atacaven específicament els bacteris i per això és considerat el descobridor oficial dels bacteriòfags. D'Herelle també es va especialitzar en l'àmbit mèdic i fins i tot va tractar pacients amb èxit.

Figura 11. D'Herelle en un laboratori.



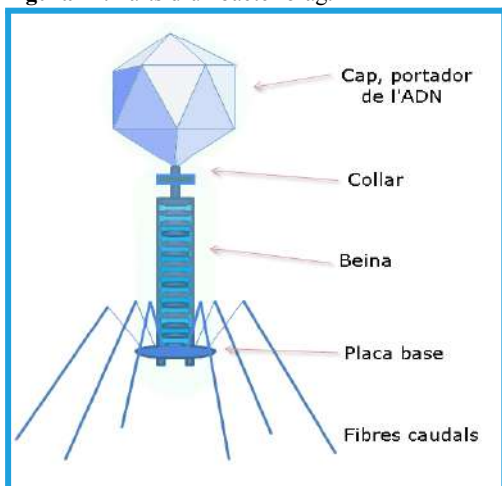
Font: <https://aeac.science>

4.7. Els bacteriòfags

També anomenats fags. Aquest tipus de virus són específics i infecten únicament bacteris. Són els més abundants a la Terra, són essencials pels cicles biològics i es troben en qualsevol ecosistema. Com tots els virus, tenen una vida intracel·lular obligada i estan constituïts per un àcid nucleic que freqüentment és ADN bicatenari. La seva mida varia entre els 20 i els 200 nanòmetres¹¹. Estan formats per una càpsida icosaèdrica, genoma víric, i a vegades una cua unida a la càpsida que serveix per transportar l'àcid nucleic cap a la cèl·lula hoste durant la injecció.

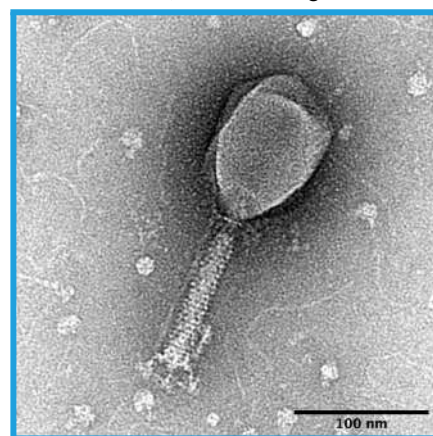
¹¹ Nanòmetre o 1×10^{-7} cm.

Figura 12. Parts d'un bacteriòfag.



Font: <https://es.m.wikipedia.org/wiki/Bacteriòfag.png>

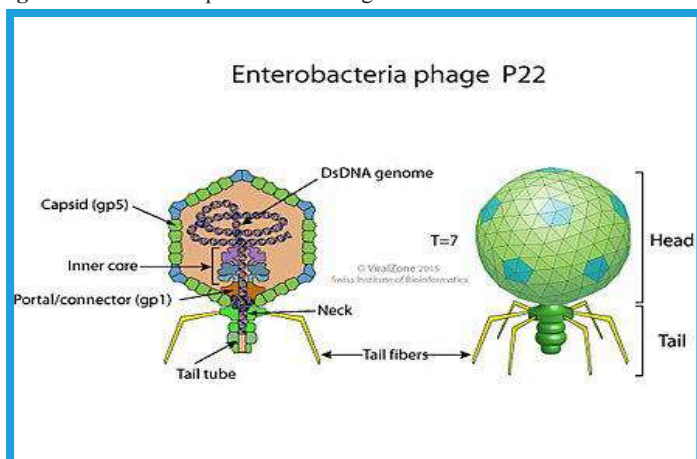
Figura 13. Micrografia del fag T2 d'enterobacteria, un bacteriòfag de cola.



Font: <https://www.csic.es>

4.7.1. Bacteriòfag P22 lític

Figura 14. Dibuix esquemàtic d'un fag P22.



Font: https://es.wikipedia.org/wiki/Fago_P22

Depenent dels tipus de fags, alguns es poden reproduir mitjançant un cicle lític (fags lítics) i han de matar a les cèl·lules hostes obligatòriament. Altres (fags temperats) poden alternar entre un cicle lític i un cicle lisogènic. El virus que fem servir en els experiments, el bacteriòfag P22 lític (o virus de la *Salmonella* P22) duu a terme el cicle lític.

Conté ADN bicatenari, té una capsida icosaèdrica de 60 nm de diàmetre i una cua curta. Pertany a la família dels virus *Podoviridae* i infecta a la *Salmonella typhimurium*. Com molts fags, s'ha fet servir principalment en la biologia molecular per a investigar la genètica de la *Salmonella*.

4.8. La fagoteràpia

4.8.1. Antecedents

La recent crisi de la resistència als antibiòtics ha causat que la salut pública arreu del món consideri la teràpia dels fags com a complement dels antibiòtics, ja que aquest tipus de tractament no és legal a la majoria de països. Abans que els antibiòtics fossin descoberts, ja hi havia investigacions que a principis del segle XX consideraven els bacteriòfags com un tractament viable per a les malalties causades per bacteris. Aleshores, es va descobrir que aquests virus només atacaven bacteris determinats a causa de l'especificitat dels seus receptors, de manera que eren innòcues per a les cèl·lules humanes. Més tard, amb el descobriment dels antibiòtics i l'inici de la Segona Guerra Mundial, el tractament amb fags va acabar en molts llocs arreu del món, sobretot en els països angloparlants.

No obstant això, a països de l'antiga Unió Soviètica com Rússia, Polònia o Geòrgia encara es van continuar utilitzant com a tractament, fins a l'actualitat. És per això que els centres d'investigació de la fagoteràpia més importants globalment es troben en aquests llocs: L'Institut de Bacteriòfags, Microbiologia i Virologia George Eliava a Tbilissi (Geòrgia) i l'Institut d'Immunologia i Teràpia Experimental Ludwik Hirszfild a Breslau (Polònia).

Avui en dia, en aquells països on la fagoteràpia està legislada, la seva aplicació està en molts àmbits. Des del seu ús terapèutic per tractar malalties infeccioses, fins a ser controladors de la microbiota intestinal. Es fan servir també per evitar possibles infeccions en pacients en risc, sigui per cremades en la pell o per ferides obertes. Un altre ús és el de tractament en malalties cròniques associades a patògens que han esdevingut resistents, com és el cas de les otitis persistents.

4.8.2. Avantatges i desavantatges

Entre els seus avantatges trobem els següents:

- Gran especificitat d'infecció, per tant, no ataca la nostra microbiota.
- Mecanisme d'acció totalment diferent dels antibiòtics, sent efectius fins i tot contra bacteris multiresistents.

- Bona farmacocinètica: una dosi inicial de fags creix exponencialment per atacar el focus d'infecció.
- La producció de bacteriòfags és més barata que la síntesi d'un antibiòtic.
- L'habilitat que tenen els fags de mutar com a resposta a l'aparició de bacteris resistents.

No tot és positiu, aquest tipus de teràpia també té els seus desavantatges:

- Molts bacteris es tornen alhora resistents als fags. Aquests són els diferents tipus de bacteris segons la seva sensibilitat als bacteriòfags:
 - **Bacteri sensible:** aquest tipus és infectat pels bacteriòfags sense cap impediment.
 - **Bacteri resistent:** els fags no són capaços d'adherir-se a la seva superfície perquè o bé el bacteri ho impedeix o bé perquè el bacteri té repressors del cicle lític, aleshores, es queda lisogènic.
 - **Bacteri immune:** els fags són capaços d'adherir-se i ingerir la seva informació genètica, però l'ADN no és capaç de donar lloc a un cicle lític.
- Neix la necessitat de saber quin bacteri específic és per atacar-lo efectivament amb fags.
- El nostre sistema immunitari pot crear **anticossos** contra els fags.
- Les cèl·lules es lisen, per tant, si la toxina que fa mal està dins el bacteri, s'alliberen dins del cos del pacient.

4.8.3. Aplicació

A l'hora d'optar per aquest tractament tenim diferents formes d'aplicar-lo al pacient:

- Via oral: els fags poden mantenir-se catorze mesos amb vida útil dins de píndoles.
- Tòpica: Utilitzat en cas de cremada i ferida oberta, involucra l'aplicació de gases.
- Intravenosa: Menys freqüent, però l'acció dels fags és més ràpida que per via oral.

4.8.4. Casos d'ús de la fagoteràpia en humans

Felix d'Herelle va ser el primer a fer ús dels fags en l'àmbit terapèutic, i va tractar amb èxit uns dels grans problemes que afrontava París durant la Segona Guerra Mundial: la disenteria. A partir d'aquell moment, els estudis sobre la teràpia fàgica van ser cada cop més rellevants a l'Europa de l'Est, on s'han realitzat múltiples assaigs clínics.

- Per exemple, el 2002 l'Institut Hirschfeld a Polònia va reportar 550 casos d'infeccions bacterianes en humans, sobretot bacteris patògens multiresistents. Aquests pacients van ser tractats amb un còctel de fags subministrat per via oral i el percentatge d'èxit va ser d'un 90% (García & López, 2002).
- Un altre cas a Polònia va demostrar que després de tractar 372 persones infectades pel bacteri *Staphylococcus* amb fags, el 100% dels casos d'infeccions gastrointestinals i el 75% dels pacients amb úlceres varicoses van ser curats (Segundo *et al.*, 2007).

4.8.5. El còctel de bacteriòfags

A la teràpia fàgica no se sol treballar amb un sol fag, sinó que es produeixen els anomenats còctels de bacteriòfags, on es barregen entre cinc o sis tipus de fags. Amb aquesta tècnica es pretén augmentar les probabilitats d'èxit dels tractaments, a causa del fet que és més difícil que un bacteri sigui resistent a més d'un bacteriòfag. A més a més, la senzillesa del genoma dels fags permet que puguin ser modificats genèticament, buscant una major precisió a l'hora d'atacar una soca determinada. La combinació d'aquestes tècniques fan que la fagoteràpia sigui cada cop una alternativa i complement més atractiu a l'ús d'antibiòtics.

4.8.6. Obstacles a superar

- De moment, a l'Occident la fagoteràpia es troba principalment a l'agroindústria, sobretot als Estats Units, on s'ha regulat la comercialització de productes per tractar o prevenir malalties en animals de granja. Tanmateix, l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) encara no ha arribat a una resposta concloent sobre el seu ús a la Unió Europea.

- Al món occidental, el procés per portar un tractament a la població general requereix molts assaigs clínics i informes que corroborin la seva efectivitat, així com que sigui prou segura per aplicar-se als humans. No només cal que es demostrï això, sinó que també és necessari que la gent confïi en aquest tractament, ja que el fet de ser un virus i la connotació negativa que implica tot el que hi estigui relacionat ho fa tot més difícil. Per aquesta raó, algunes organitzacions com la *Red Española de Bacteriófagos y Elementos Transductores* (FAGOMA) insisteixen a conscienciar a la societat a través de l'educació i campanyes informatives, i en promoure la seva regularització a Espanya.

5. ELS ANTIBIÒTICS

Els antibiòtics¹² són fàrmacs que s'utilitzen per a tractar les infeccions bacterianes i els més utilitzats mundialment per combatre-les. Són substàncies químiques que maten o inhibeixen el creixement dels microbis que en són sensibles, i la seva producció recau tant en éssers vius com en els derivats sintètics. El seu ús és ben ampli, des de la medicina humana i animal fins a l'horticultura. Normalment, aquests fàrmacs ajuden a les defenses del pacient fins que el sistema immunitari d'aquest pugui controlar la infecció.

Figura 15. Antibiòtics en càpsules.



Font: <https://www.dolororofacial.com>

El seu mecanisme d'acció variarà segons l'estructura i el metabolisme de l'organisme on es vol aplicar el fàrmac, de manera que uns eviten la generació dels components de les membranes cel·lulars o extracel·lulars i d'altres destrueixen els ribosomes del bacteri perquè cap proteïna pugui ser sintetitzada.

¹² La paraula té origen grec i llatí: *anti* “oposat” i *biotikós* “de la vida”.

5.1. Tipus d'antibiòtics

Segons l'efecte que tenen aquests fàrmacs sobre els bacteris trobem la següent classificació:

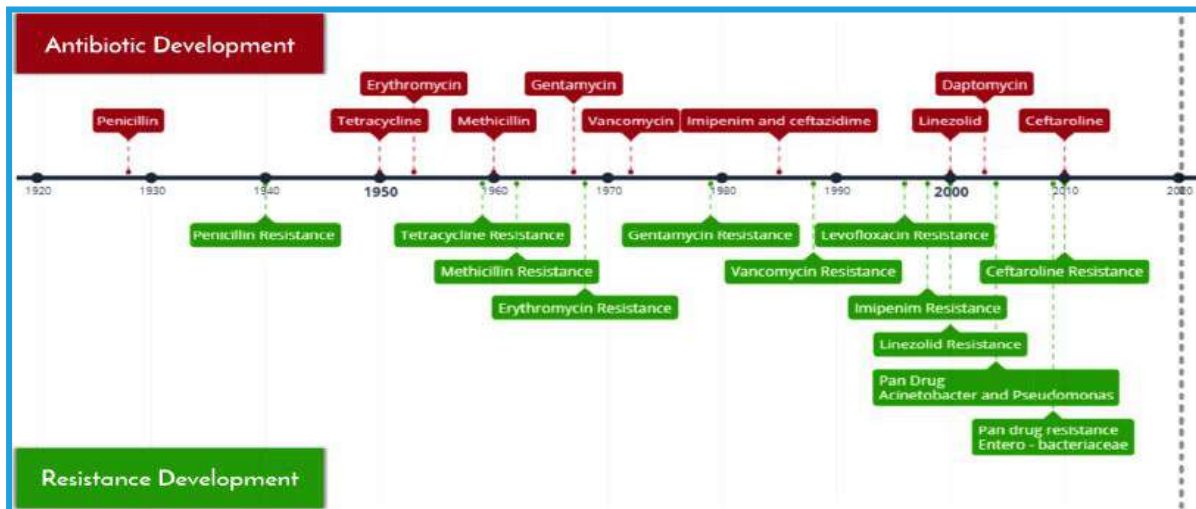
- **Bacteriostàtics:** són aquells antibiòtics que no maten els bacteris sinó que no permeten el seu creixement i reproducció. Així, el sistema immunitari del pacient pot acabar amb els patògens, tot i que, si no ho fa, els bacteris poden tornar a reproduir-se en absència de l'antibiòtic.
- **Bactericides:** és el cas dels fàrmacs que eliminen de forma ràpida els bacteris sobre els quals actua. Si aquests antibiòtics provoquen la lisi de les seves membranes plasmàtiques, s'anomenen bacteriolítics.

5.2. Els antibiòtics de la part experimental

- **Estreptomícina:** és un bactericida aïllat per primer cop en la dècada del 1940. S'utilitza per tractar la tuberculosi, provocada pel bacteri *Mycobacterium tuberculosis*. El seu mecanisme d'acció inhibeix la síntesi de proteïnes.
- **Espectinomícina:** és un bacteriostàtic descobert en la dècada del 1960 a partir d'una soca de *Streptomyces spectabilis*. S'empra per tractar la gonorrea. El seu mecanisme d'acció consisteix en la inhibició de la síntesi de proteïnes.
- **Ampicil·lina:** és un bacteriolític i és la primera penicil·lina semisintètica, desenvolupada a mitjans del segle XX. Es fa servir per tractar, per exemple, la meningitis. El seu mecanisme d'acció consisteix a intervenir en la síntesi de la paret cel·lular i destruir-la, provocant la lisi del bacteri a posteriori.

5.3. Les resistències als antibiòtics

Figura 16. Cronologia del descobriment dels antibiòtics i les posteriors resistències.



Font: <https://www.sciencedirect.com>

Aquest fenomen és causat per les mutacions dels bacteris, que s'adapten ràpidament contra els atacs dels antibiòtics. Si tothom hagués fet un ús correcte dels antibiòtics, les resistències no serien tan comunes com ara. Entre els errors hi trobem:

- **L'ús incorrecte dels antibiòtics:** molts cops es tracten infeccions víriques, cosa que els antibiòtics no poden eliminar.
- **Dosi incorrecta:** Una dosi baixa afavoreix la selecció d'aquells bacteris resistents.
- **Interval entre dosis massa llarg:** provoca que les concentracions d'antibiòtic no siguin les suficients per eliminar els bacteris.
- **Duració del tractament:** Si el tractament és massa llarg, hi ha més probabilitats de realitzar involuntàriament una selecció de bacteris resistents. I al contrari, si és massa curt, el tractament fallarà.

Tots aquests motius han provocat que molt sovint, aquestes resistències hagin aparegut poc després que els antibiòtics eren descoberts. Malauradament, ara hi ha resistències per a tants antibiòtics que cada cop és més difícil utilitzar-los com a tractament.

6. PRINCIPALS TÈCNIQUES EN EL LABORATORI

1.1. Material bàsic

Primer de tot repassarem els diferents materials que hem fet servir en el laboratori:

- **Material de vidre o de plàstic esterilitzable:** pipetes graduades, pipetes Pasteur, nanses de Digralski, plaques de petri, tubs d'assaig de diferents mides, matrassos, erlenmeyers, provetes, ampolles amb tap de rosca, entre d'altres.
- **Material divers:** Bunsens, trípod, termòmetres, cotó, indicador de pH, nanses de Kolle, etc.
- **Aparells:** microscopis, balances, refrigeradors, estufes o cambres d'incubació, centrifugadores, espectrofotòmetre.

Figura 17. Espai de treball al laboratori.



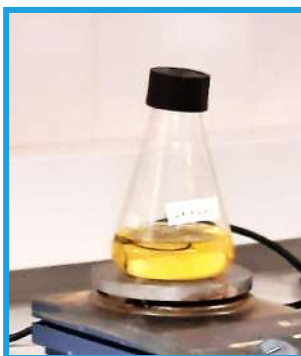
Font: Elaboració pròpia.

Figura 18. Tub d'assaig.



Font: Elaboració pròpia.

Figura 19. Agar tou sent preparat.



Font: Elaboració pròpia.

Figura 20. Agar tou en bloc tèrmic a 60°C.



Font: Elaboració pròpia.

6.1. Mètodes de recomptes de microorganismes

El recompte de microbis es pot fer o bé determinant el nombre de microorganismes que creixen en un determinat medi de cultiu desenvolupant colònies visibles (recompte viable), o bé comptant les cèl·lules o agrupacions de cèl·lules que es poden observar en la mostra mitjançant tècniques microscòpiques (recompte directe o total).

→ Tècniques de dilució i càlculs

En condicions adients de creixement, els bacteris es reproduïxen i formen poblacions tan grans que normalment cal diluir-les per aconseguir colònies aïllades que es puguin comptar. Per això, és necessari barrejar una petita quantitat de mostra amb un volum d'aigua o bé d'una dissolució salina estèril (diluent).

Una dissolució simple es calcula així:

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

Per exemple, la dilució d'1 ml de mostra en 9 ml de diluent equival a:

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

Se sap que les dilucions són més exactes si es fan sèries de petites dilucions que fent-ne una gran. Anomenem **dilució seriada** al conjunt d'aquestes dilucions, i la dilució total és el producte de cadascuna de les dilucions de la sèrie. Per posar un exemple: si diluïm 0,5 ml de mostra en 4,5 ml de diluent, i llavors 0,5 ml d'aquesta primera dilució en 4,5 ml de diluent, la dilució final serà:

$$\frac{0,5}{5} \times \frac{0,5}{5} = \frac{1}{100} \quad \text{o també 1:100}$$

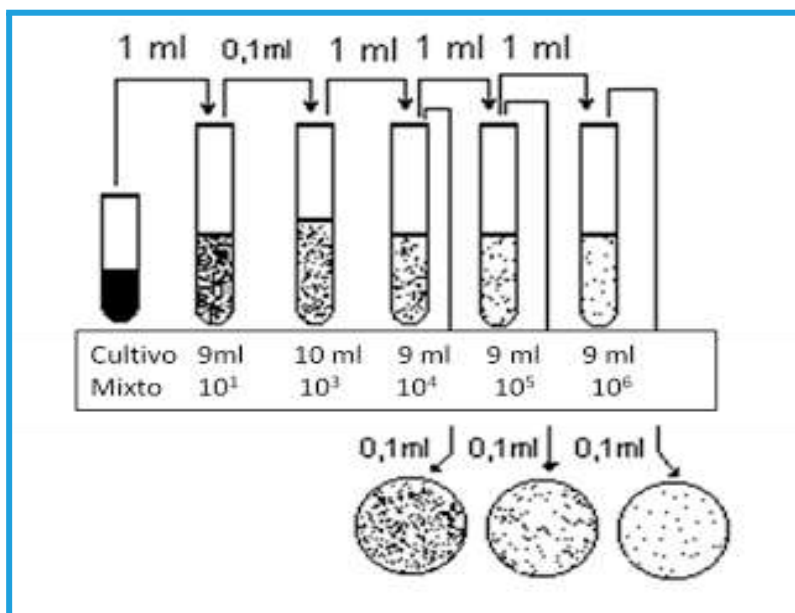
Per fer els càlculs més senzills s'escriu en notació exponencial, per tant, en l'exemple la dilució final s'escriu 10^{-2} o directament -2.

Els passos per fer una dilució seriada són els següents:

1. Pipetejar en condicions **estèrils** la mostra en el tub diluent.
2. Barrejar els continguts agitant lleugerament el tub.
3. Repetir el procés de forma seriada fins a tenir un 0,1 ml de l'última dilució en nombre de bacteris adequat.
4. De les últimes dilucions realitzades se sembra 0,1 ml sobre la placa estenent amb la nansa de Digrafski.
5. Incubar les plaques a temperatura òptima i fer recompte del nombre de colònies un cop passat el temps necessari, en aquelles plaques que tinguin entre 15 i 300 colònies.
6. Els resultats s'expressen en unitats formadores de colònies per mil·límetre ($\text{cfu}^{13}/\text{ml}$) segons la següent fórmula:

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

Figura 21. Procediment de dilucions seriades.



Font: <https://www.researchgate.net>

¹³ cfu: unitats formadores de colònies.

6.2. Mètodes d'aïllament i de conservació de microorganismes

L'aïllament dels microbis consisteix en la separació en medi sòlid de dos o més microorganismes que es troben junts en una determinada mostra, amb la finalitat d'aconseguir colònies separades i poder obtenir cultius purs. Aquests són els diferents procediments que es poden emprar per aïllar microorganismes.

A. Protocol 1. Aïllament per dilució

Es basa en l'extensió per la superfície d'una placa d'agar d'un nombre de microbis prou petit de manera que en créixer, cadascun d'ells doni lloc a una colònia ben aïllada. Per exemple, les dilucions seriades.

B. Protocol 2. Aïllament per esgotament en placa

a. En ziga-zaga

A partir de la suspensió de microbis o una colònia, s'agafa una mostra amb la nansa de Kolle. Després, se sembra per estria en ziga-zaga fins a "esgotar la nansa" sobre una o dues plaques de medi sòlid, per posteriorment incubar les plaques a una temperatura adequada.

Figura 22. Sembrar per estria en ziga-zaga.

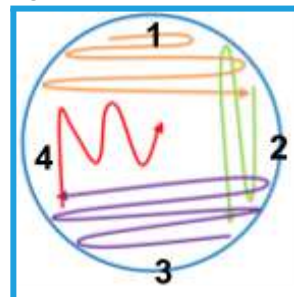


Font: Elaboració pròpia.

b. En escocès

Amb la nansa de Kolle, procedim tal com s'indica a la Figura 23. En les etapes 1, 2, 3 i 4 cal esterilitzar la nansa de Kolle cada cop que es canvia d'etapa.

Figura 23. Sembrar en escocès.



Font: <http://microbiologia3bequipo5.com>

7. PART EXPERIMENTAL

7.1. Hipòtesi

En aquest apartat, que consta de dues parts correlacionades, la meua intenció és comprovar l'eficàcia dels bacteriòfags per atacar bacteris patògens. En la primera part, he realitzat un experiment per comprovar els efectes que tenen diferents tipus de fags sobre un mateix bacteri i, d'aquesta manera, decidir quin fag escollir per fer el segon experiment. En aquest últim experiment es compara l'eficàcia del bacteriòfag elegit amb tres tipus d'antibiòtics.

Així doncs, la hipòtesi plantejada és aquesta:

- Els bacteriòfags són més eficients que els antibiòtics per matar bacteris patògens.

7.2. Primer experiment: el test de la gota

Aquesta metodologia es fa servir per determinar l'efecte que ha produït un bacteriòfag sobre un bacteri específic. En aquesta primera part pràctica, he comprovat els efectes dels fags P22 lític, P22 lisogènic, SE1 i λ sobre el bacteri *Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*.

7.2.1. Disseny experimental

1) Objectiu

Comprovar quin efecte tenen els bacteriòfags P22 lític, P22 lisogènic, SE1 i λ sobre el bacteri *Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*.

2) Material

- | | |
|-------------------|---|
| - Placa de Petri | - ON ¹⁴ de <i>Salmonella LT2</i> |
| - Tubs d'assaig | - Bacteriòfags: P22 lític, P22 lisogènic, SE1 i λ |
| - Micropipetes | - 3 ml LB tou (0,7%) |
| - Tub d'Eppendorf | - Ringer |

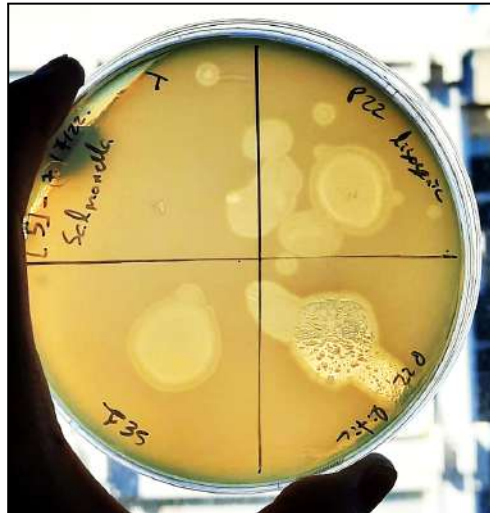
¹⁴ L'*overnight* (ON) és un cultiu de bacteris crescut durant tota una nit a 37°C i en agitació.

3) Procediment

- a) Dividim la placa en quatre seccions i posem el nom del tipus de fag que hi cultivarem.
- b) Elaborem una dilució 1/10 de l'ON de *Salmonella LT2* dipositant 900 μL de Ringer i 100 μL de *Salmonella LT2* amb una micropiteta dins d'un tub d'Eppendorf.
- c) Dipositem 100 μL d'aquesta mescla en un tub d'assaig amb 3 ml de LB tou (0,7%).
- d) Estenem la mescla a poc a poc sobre tota la placa i esperem 5 minuts perquè s'assequi.
- e) Un cop sec, dipositem una gota (1 μL) de cada fag en la secció corresponent.
- f) Deixem assecar i incubem la placa ON a 37 °C.

4) Resultats

Figura 24. Placa de Petri del test de gota després de l'overnight.



Font: Elaboració pròpia.

El següent dia vaig poder veure els resultats del test de gota: en la secció on es va dipositar la dilució del bacteriòfag λ no hi ha cap canvi visible, el que es tradueix en la seva incapacitat per infectar la *Salmonella LT2*. Podem veure que en les seccions dels fags SE1 i P22 lisogènic trobem cercles més translúcids que el seu voltant. Anomenem calbes tèrboles a aquests cercles, i la seva aparició significa que els fags que han infectat el bacteri en qüestió

són temperats i que, aleshores, molts continuen un cicle lisogènic i no acaben d'eliminar totalment la *Salmonella*.

Finalment, en la secció corresponent al P22 lític podem apreciar que en aquest cas les calbes són transparents. Es tracta de les calbes clares, i demostren que el fag ha sigut capaç d'eliminar totalment el bacteri mitjançant el cicle lític.

5) Conclusions

Les conclusions que podem extreure són que el fag λ no és capaç d'infectar la *Salmonella* LT2, per tant, l'aplicació d'aquest virus per contraatacar aquest bacteri seria inútil. En el cas dels fags SE1 i P22 lisogènic podem concloure que són capaços d'infectar el bacteri, però no acaben d'eliminar-lo del tot, mentre que en el cas del P22 lític sí és així.

En conseqüència, el bacteriòfag que farà servir en el següent experiment és el P22 lític. Això també dona la raó al fet que en la fagoteràpia sempre es fan servir fags lítics.

7.3. Segon experiment: comparació de l'eficàcia i l'eficiència entre els bacteriòfags i els antibiòtics

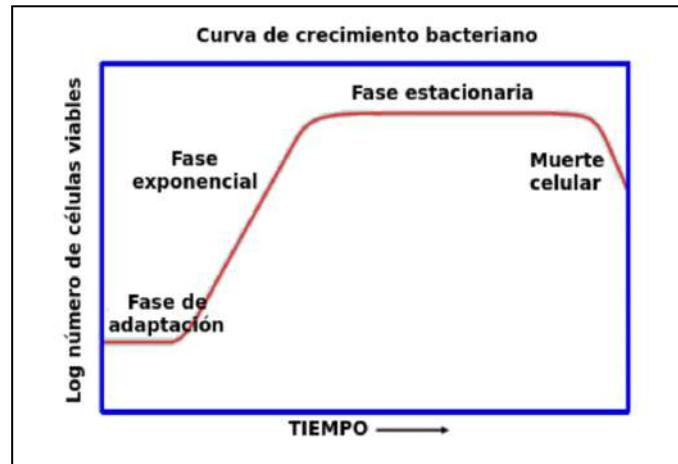
En aquesta part, la hipòtesi es formula de nou i es torna més específica:

- El bacteriòfag P22 lític és més eficaç que els antibiòtics espectinomomicina, ampil·lina i estreptomomicina per matar una soca de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* LT2.

Abans de continuar, cal recordar alguns conceptes per entendre correctament el comportament dels bacteris. El creixement de les poblacions d'aquests microorganismes és exponencial, ja cada cop que un bacteri es divideix dona lloc a dues cèl·lules i així successivament, fent que a cada període de divisió la població es dupliqui. Anomenem temps de generació al temps necessari perquè un bacteri es dupliqui i varia segons l'espècie.

Dit això, és necessari introduir la corba del creixement bacterià, que consta de quatre fases:

Figura 25. Gràfic de la corba del creixement bacterià.



Font: <https://bachilleratovirtual.com>

- **Fase de latència:** En aquesta fase d'adaptació al medi, existeix un augment de la massa de les cèl·lules, però el nombre de cèl·lules no creix.
- **Fase de creixement exponencial:** És la fase on té lloc un increment exponencial del nombre de microorganismes.
- **Fase estacionària:** Si s'arriba a aquesta fase és perquè s'ha esgotat la font d'energia.
- **Fase de mort:** En aquesta fase es produeix una disminució exponencial del nombre de bacteris.

També és important saber que farem servir dos mètodes per comptar el nombre de bacteris a mesura que els antibiòtics i els fags hi actuïn. En primer lloc, tenim l'espectrofotòmetre, un aparell que ens permet calcular l'absorbància¹⁵ d'una mostra; en segon lloc, tenim el recompte de viables per dilucions seriades, explicada en l'apartat de mètodes de recomptes de microorganismes.

¹⁵ Mesura que indica la intensitat de la llum absorbida després d'haver travessat una mostra.

7.3.1. Disseny experimental

1) Objectiu

Comparar l'eficiència de l'acció del bacteriòfag P22 lític amb l'acció dels antibiòtics espectinomícina, ampicil·lina i estreptomícina per reduir una població de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium LT2*.

2) Material

- | | | |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| - ON de <i>Salmonella LT2</i> | - Micropipetes | - Ampicil·lina |
| - Espectrofotòmetre | - Tubs d'assaig | - Estreptomícina |
| - Cubetes d'espectrofotometria | - Bacteriòfag P22 lític | - LB amb 0,5% de NaCl |
| - Plaques de Petri | - Espectinomícina | - Ampolles amb rosca |

3) Procediment

- a) Primer realitzem una sembra 1/50 d'un ON de *Salmonella LT2* en 200 mL de LB, tot dins d'una ampolla amb tap de rosca. Això significa que afegim 4 mL del cultiu de nit en 200 mL de LB al 0,5% de NaCl. Deixem el nou cultiu unes 2 hores a 37 °C i amb agitació fins a obtenir una absorbància de 0,2 a 0,3.
- b) Passades les 2 hores, la població de *Salmonella LT2* es troba en fase exponencial (temps 0) i assolim l'absorbància desitjada. La calculem amb exactitud:
 - i) Agafem 1 ml del cultiu amb una micropipeta i el dipositem a una cubeta d'espectrofotometria.
 - ii) Introduïm la cubeta a l'espectrofotòmetre i apuntem l'absorbància.
- c) Al mateix temps (temps 0) dividim el cultiu en 5 ampolles diferents, on dipositem 20 mL del cultiu de *Salmonella LT2* a cadascuna i afegim els tractaments corresponents:

- (1) Control: afegir 200 μL de Ringer.
 - (2) Ampicil·lina (Ap): afegir 200 μL a una concentració de 20 mg/mL.
 - (3) Espectinomicina (Spc): afegir 200 μL a una concentració de 20 mg/mL.
 - (4) Estreptomycin (Str): afegir 200 μL a una concentració de 20 mg/mL.
 - (5) Bacteriòfag P22 lític: afegir 200 μL a una concentració de 10^{10} pfu/mL¹⁶.
- d) Un cop hem ficat els tractaments a les ampolles les deixem 10 minuts a 37 °C sense agitació, per facilitar l'adsorció dels bacteriòfags als bacteris.
- e) Després dels 10 minuts, es posen les ampolles en agitació i després de 20 minuts (30 minuts des del temps 0) prenem mesures de l'absorbància de cada ampolla amb l'espectrofotòmetre.
- f) A partir d'aquí, cada 30 minuts (fins a arribar als 180) s'agafa 1 mL del contingut de cada ampolla, es dipositen en les cubetes d'espectrofotometria corresponents i s'obtenen les **DO** amb l'espectrofotòmetre.
- g) En els minuts 0, 90 i 180 prenem mostra de cada ampolla per realitzar el recompte de viables (cfu/mL). Per fer tal recompte, s'han de fer dilucions seriades de cada mostra agafada, i sembrar 0,1 mL de les dilucions -2, -4 i -6 en plaques de medi LB sòlid.

¹⁶ pfu/mL = unitats formadores de plaques per mil·límetre.

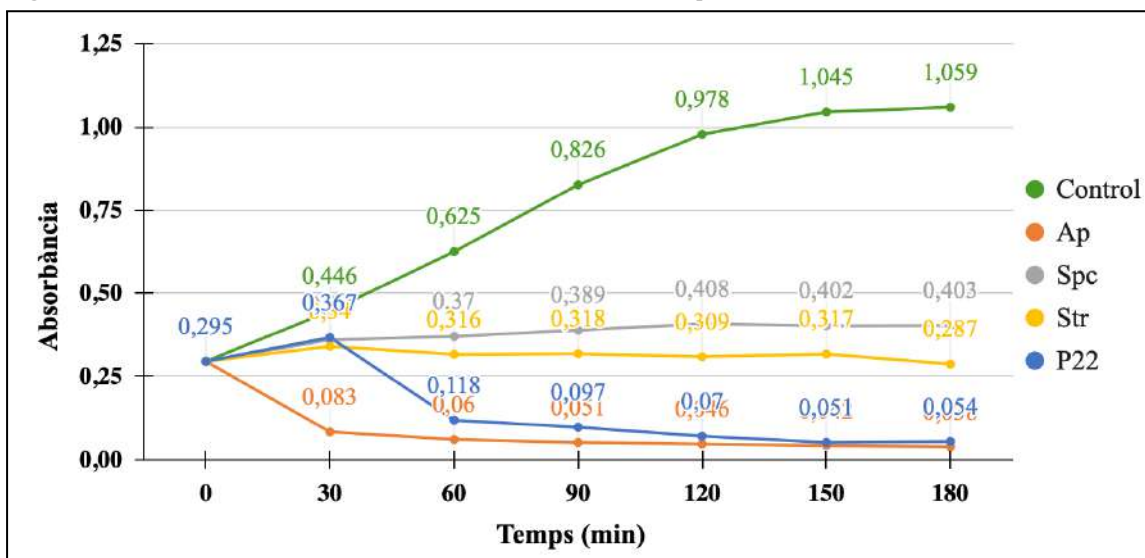
4) Resultats

Taula 6. Densitat òptica (longitud d'ona 550 nm).

Temps (min)	0	30	60	90	120	150	180
Control	0,295	0,446	0,625	0,826	0,978	1,045	1,059
Ap		0,083	0,06	0,051	0,046	0,042	0,038
Spc		0,36	0,37	0,389	0,408	0,402	0,403
Str		0,34	0,316	0,318	0,309	0,317	0,287
P22 lític		0,367	0,118	0,097	0,07	0,051	0,048

Font: Elaboració pròpia.

Figura 26. Gràfic de la DO dels diferents tractaments en funció del temps.



Font: Elaboració pròpia.

Fixant-nos en la DO notem que en el minut 0 tots tenen el mateix valor: ni els antibiòtics ni el fag han pogut actuar encara contra la *Salmonella LT2*. Malgrat això, a partir de la mitja hora els resultats varien més. El control continua el seu creixement exponencial i, per tant, la DO és cada cop major, tot i que a partir del minut 150 probablement els recursos del medi s'estaven acabant i per això la DO no puja al mateix ritme.

Veiem que en el cas de l'estreptomicina i l'espectinomicina, bactericida i bacteriostàtic respectivament, les seves DO no augmenten gaire. Això és degut al fet que cap d'aquests antibiòtics lisa la membrana dels bacteris, per tant, tot i matar-los, la DO serà la mateixa, ja que els cossos morts continuen interferint en la intensitat de la llum.

En canvi, en el cas del fag P22 lític i l'ampicil·lina, la DO decreix dràsticament a causa d'aquests tractaments lisen les membranes bacterianes. La primera mitja hora, el bacteriòfag P22 lític triga més a matar els bacteris perquè primer ha de dur a terme el cicle homònim.

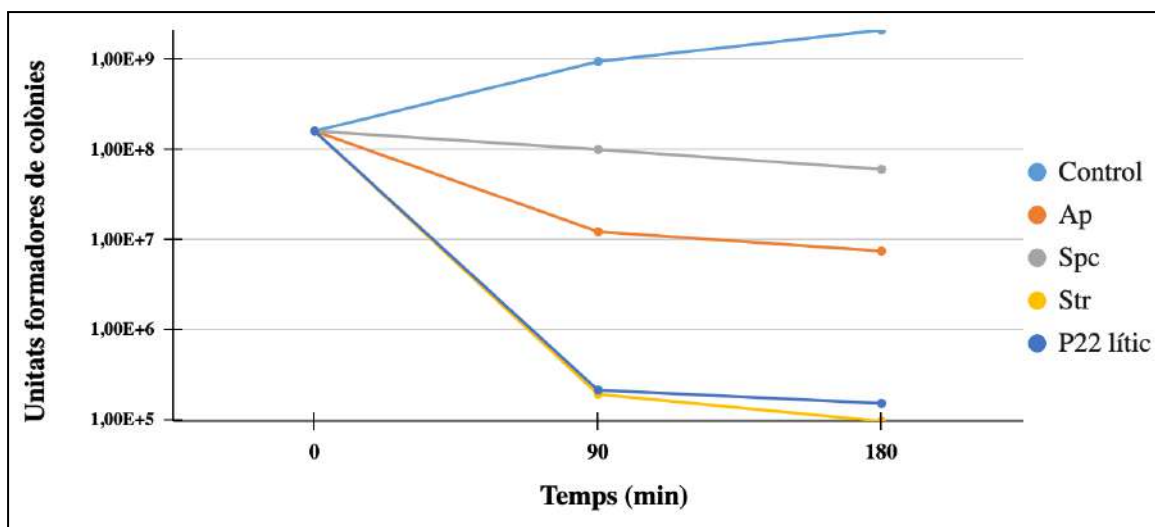
Després d'haver mesurat les DO és necessari fer un recompte de viables perquè, com hem vist, aquest mètode no ens dona informació útil en el cas d'aquells tractaments que no lisen les membranes dels bacteris.

Taula 7. Recompte de viables (cfu/mL)

Temps (min)	0	90	180
Control	1,6 · 10 ⁸	9,5 · 10 ⁸	2,13 · 10 ⁹
Ap		1,22 · 10 ⁷	7,4 · 10 ⁶
Spc		1 · 10 ⁸	6 · 10 ⁷
Str		1,89 · 10 ⁵	2,4 · 10 ⁴
P22 lític		2,1 · 10 ⁵	1 · 10 ⁵

Font: Elaboració pròpia.

Figura 27. Gràfica en escala logarítmica de l'evolució de les ufc dels diferents tractaments en funció del temps.



Font: Elaboració pròpia.

Si ens fixem en les unitats formadores de colònies per mil·límetre, un cop fetes les dilucions i les sèmres corresponents, els resultats són més aclaridors. Un altre cop, la població de *Salmonella LT2* en les plaques control és cada cop més nombrosa.

Per una banda, les plaques amb ampicil·lina i espectinomicina deixen més de 10^7 ufc/ml al final de l'experiment. En el cas de l'espectinomicina això és així perquè és un bacteriostàtic, per consegüent, només inhibeix la reproducció del bacteri i no l'elimina.

Per l'altra banda, l'estreptomina i el fag P22 lític eliminen molts més bacteris i no deixen més de 10^5 ufc/ml, sent l'estreptomina el tractament més efectiu en aquest experiment.

5) Conclusions

Aquest experiment caldria repetir-lo més cops per tenir una conclusió realment definitiva. Malgrat això, el procediment ha sigut el correcte i les dades obtingudes no han variat molt de les esperades. Tots els tractaments excepte el control han reduït el nombre de *Salmonella LT2*. La hipòtesi principal afirmava que el bacteriòfag P22 lític era més efectiu per atacar aquest bacteri que els tres antibiòtics utilitzats en l'experiment, tanmateix, s'ha demostrat que no és així. Mitjançant el recompte de viables, hem vist que l'estreptomina ha sigut el tractament que més bacteris ha eliminat al cap de 180 minuts. Tot i això, podem també afirmar que el fag emprat és una bona alternativa als antibiòtics per tractar la infecció d'aquesta salmonel·la.

8. CONCLUSIONS FINALS

Com hem vist al llarg d'aquest treball, la resistència dels bacteris als antibiòtics és un problema cada cop més gran, causat per l'ús abusiu dels pacients i la consegüent mutació dels microorganismes. Arran d'això, s'estan considerant possibles alternatives a aquest tipus de tractament, com els bacteriòfags. Avui en dia el seu ús no és gaire extens, exceptuant els països que un cop van ser part de la Unió Soviètica. Probablement, això canviarà en les pròximes dècades gràcies al sorgiment dels superbacteris. Segons el GRAM¹⁷ (*Global Research on Antimicrobial Resistance*) van ser els causants directes d'1,27 milions de morts l'any 2019. Malauradament, s'espera que aquestes xifres es multipliquin per deu de cara al 2050, de manera que molts científics parlen ja d'una "pandèmia silenciosa".

La bona notícia és que la comunitat científica ja n'és conscient del que ens espera, per això ha decidit actuar i plantejar-se alternatives a l'ús dels antibiòtics. El 2015 es va celebrar una reunió organitzada per l'Agència Europea de Medicaments (EMA) amb l'objectiu de posar a la taula el possible paper de la fagoteràpia en el tractament de bacteris multiresistents. A poc a poc, els estudis sobre aquesta alternativa s'han vist afavorits i s'estan duent a terme diversos assaigs clínics per establir la seguretat i eficàcia terapèutica dels fags. De fet, hi ha casos de teràpia experimental en humans a l'Europa Occidental i als Estats Units on s'ha demostrat que la teràpia fàgica és una alternativa excel·lent per eliminar bacteris multiresistents. Dit això, adjunto les meves valoracions finals:

- En finalitzar aquest treball he complert els meus objectius principals i en soc conscient d'un problema bastant greu del que molta gent ni n'ha sentit parlar. La meva curiositat per aquest tema m'ha ajudat a fer tota la part teòrica i pràctica, així com ampliar els meus coneixements sobre els temes i conceptes que s'han explicat.
- Gràcies al Programa Argó he pogut familiaritzar-me amb un laboratori universitari i veure de primera mà com es treballa en un grup d'investigació, específicament un enfocat en l'aplicació de la fagoteràpia en l'avicultura.

¹⁷Projecte dirigit per la Universitat d'Oxford que investiga la resistència als antimicrobians.

- En la part pràctica he pogut veure l'eficàcia d'un bacteriòfag davant la *Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2* i he comprovat que és una bona alternativa als antibiòtics per tractar-lo. També he comprès els seus avantatges, que van des de l'absència d'efectes secundaris fins a la seva replicació en el lloc de la infecció.
- La fagoteràpia no és una panacea, també té els seus desavantatges. Un n'és el fet que per atacar un bacteri s'ha de saber quin és amb molta especificitat. També hi cap la possibilitat que el cos generi anticossos contra aquests virus.
- Finalment, cal recordar que el procés perquè un tractament mèdic s'apliqui en la població general és molt complex, així doncs, no és una opció que veurem al nostre país fins d'aquí a un bon temps.

9. BIBLIOGRAFIA

a) Llibres

- PRESCOTT, Lansing. *Microbiología*. 5a ed. McGraw-Hill Interamericana de España, 2004.
- CARNERO, Raquel. *Antibióticos vs bacterias : de la resistencia al contraataque*. 1a ed. Larousse, 2021.

b) Artículos de revista de divulgación científica

- HONORIO, César; VALLENAS, Angelo; BAZÁN, Johanny. “Cóctel de bacteriófagos como sustituto de promotores de crecimiento tipo antibiótico en avicultura”. *Scientia Agropecuaria*, vol.12, 2021, núm 4, p. 499-508.
- GARCÍA, Elkin; LÓPEZ, Rocío. “Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos”. *Revista Española de Quimioterapia*, vol.15, 2002, núm 4, p. 306-312.
- SEGUNDO, Nallelyt, et al. “Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia)”. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol.41, 2010, núm 3, p. 17-26.
- VARGAS Tatiana; VILLAZANTE Leydi Geovana. “Clasificación de los Microorganismos”. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, vol. 44, 2014, p. 2309-2313.

c) Articles científics digitals

- MORA, Camilo, et al. *How many species are there on Earth and in the ocean?* [En línia]. PLoS biology, 2011. <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1001127&utm_campaign=Au%20fil%20des%20lectures&utm_medium=email&utm_source=Revue%20newsletter> [Consulta: 20 juny 2022]
- PÍREZ, Marta; MOTA, María. *Morfología y estructura bacteriana* [En línia]. Temas de bacteriología y virología médica, 2006. <https://www.academia.edu/16460125/Morfologiay_Estructura_Bacteriana?from=cover_page> [Consulta: 3 juliol 2022]
- PLOEGMAKERS, Marieke. Pros and cons of using phages and enzybiotics [En línia]. All about feed, 2019. <https://www.allaboutfeed.net/animal-feed/feed-additives/pros-and-cons-of-using-phages-and-enzybiotics/?_ga=2.52167151.798934652.1663186854-2066329382.1663186854> [Consulta: 15 maig 2022]

d) Webgrafia

- BUSH, Larry. *Overview of Bacteria* [En línia]. MSD Manual for the Consumer, 2020. <<https://www.msmanuals.com/home/infections/bacterial-infections-overview/overview-of-bacteria>> [Consulta: 2 juliol 2022]

- COL·LABORADORS DE VIQUIPÈDIA. *Microbiologia* [En línia]. Viquipèdia, L'enciclopèdia lliure, 2022. <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Microbiologia>> [Consulta: 20 juny 2022]
- COL·LABORADORS D'ECURED. *Microorganismo* [En línia]. EcuRed, 2021. <<https://www.ecured.cu/index.php?title=Microorganismo&oldid=3993307>> [Consulta: 20 juny 2022]
- HARWOOD, Jessica; WILKIN, Douglas. *Bacteria Nutrition* [En línia]. CK-12 Foundation, 2020. <<https://flexbooks.ck12.org/cbook/ck-12-middle-school-life-science-2.0/section/5.3/primary/lesson/bacteria-nutrition-ms-ls/>> [Consulta: 13 juliol 2022]
- MORÁN, Alberto. *Antibióticos* [En línia]. Dciencia, 2015. <<https://www.dciencia.es/antibioticos/>> [Consulta: 15 juliol 2022]
- PORTO, Alejandro. *TEMA 20: MICROORGANISMOS* [En línia]. CURSO DE BIOLOGÍA, 2006. <<https://www.bionova.org.es/biocast/tema20.htm>> [Consulta: 28 juny 2022]
- RODRÍGUEZ, Larissa. *Tabla de clasificación de bacterias (según metabolismo, nutrición, temperatura y pH)* [En línia]. Universidad de Guadalajara, Microbiología, 2019. <<https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-de-guadalajara/microbiologia/tabla-de-clasificacion-de-bacterias-segun-metabolismo-nutricion-temperatura-y-ph/17631964>> [Consulta: 10 juliol 2022]

- ROJAS, Alberto. *Conceptos y práctica de microbiología general* [En línia]. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2011. <<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/8391/albertorojastrivino.2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> [Consulta: 28 juny 2022]
- SERRANO, José María. *Los bacteriófagos como alternativa terapéutica a los antibióticos* [en línia]. Universidad de Sevilla, Departamento de Microbiología y Parasitología, 2020. <<https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/103482/SERRANO%20ROMERO%20JOSE%20MARIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> [Consulta: 12 juny 2022]

e) Diaris digitals

- GABALDÓN, Toni. *¿Qué porcentaje de nuestro cuerpo está formado por microbios?* [En línia]. La Vanguardia, 2018. <<https://www.lavanguardia.com/ciencia/cuerpo-humano/20180710/45811879659/preguntas-big-vang-porcentaje-cuerpo-microbios-microbiota-bacterias.html>> [Consulta: 2 juliol 2022]
- RODRÍGUEZ, Héctor. *En 2050 la resistencia a los antibióticos será responsable de 10 millones de muertes anuales* [En línia]. National Geographic España, 2022. <https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/2050-resistencia-a-antibioticos-sera-responsable-10-millones-muertes-anuales_18090> [Consulta: 20 maig 2022]
- WALSH, Fergus. *Superbugs to kill 'more than cancer' by 2050* [En línia]. BBC News, 2014. <<https://www.bbc.com/news/health-30416844>> [Consulta: 3 juny 2022]

f) **Imatges**

- **Portada.** MATTHEW, Cynthia. BBC, 2020. Recuperat de: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-51912192> [Consulta: 3 setembre 2022]
- **Figura 1.** WOESE, Carl. ScienceDirect, 1996. Recuperat de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982202706647> [Consulta: 3 juny 2022]
- **Figura 2.** PRATS, Irene. Biologia i Geologia 3r ESO, 2017. Recuperat de: <http://irenepratsbiogeo3reso.blogspot.com/2017/10/la-cellula.html> [Consulta: 9 juny 2022]
- **Figura 3.** OVIEDO, Arianny. Biología Celular, 2016. Recuperat de: <https://sites.google.com/site/arianny2016biologia/bienvenidos/membrana-celular-y-potencial-celular> [Consulta: 28 juny 2022]
- **Figura 4.** CALEL, Linian. Ejemplode, 2018. Recuperat de: https://www.ejemplode.com/36-biologia/4484-ejemplo_de_reproduccion_asexual.html [Consulta: 28 juny 2022]
- **Figura 5.** GEBEL, Erika. Chemical & Engineering News, 2015. Recuperat de: <https://cen.acs.org/articles/93/web/2015/04/New-Spin-Old-Gram-Stain.html> [Consulta: 28 juny 2022]
- **Figura 6.** COL·LABORADORS DE VEDANTU. Vedantu. Recuperat de: <https://www.vedantu.com/question-answer/discuss-the-various-forms-of-bacteria-classes-11-biology-cbse-5f99b7f01a38d07aba20fc38> [Consulta: 9 juliol 2022]
- **Figura 7.** REDACTORS DE EL ÁGORA. El Ágora, 2020. Recuperat de: <https://www.elagoradiario.com/agorapedia/que-son-los-virus-es-coronavirus/> [Consulta: 9 juliol 2022]

- **Figura 8.** REDACTORS DE EL ÁGORA. El Ágora, 2020. Recuperat de: <https://www.elagoradiario.com/agorapedia/que-son-los-virus-es-coronavirus/> [Consulta: 9 juliol 2022]
- **Figura 9.** COL·LABORADORS DE EXPLICACION.NET. Explicacion.net., 2020. Recuperat de: <https://www.explicacion.net/ciclo-litico-y-lisogenico/> [Consulta: 17 juliol 2022]
- **Figura 10.** COL·LABORADORS DE EXPLICACION.NET. Explicacion.net., 2020. Recuperat de: <https://www.explicacion.net/ciclo-litico-y-lisogenico/> [Consulta: 18 juliol 2022]
- **Figura 11.** MIRAMBEAU, Guilles. Asociación Española para el Avance de la Ciencia, 2014. Recuperat de: <https://aeac.science/anterior/fagoterapia2/> [Consulta: 18 juliol 2022]
- **Figura 12.** SPEARING, Alistair. Wikipedia, 2008. Recuperat de: <https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Bacteriòfag.png> [Consulta: 18 juliol 2022]
- **Figura 13.** SNAXMIKN. Wikimedia Commons. Recuperat de: <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/los-virus-que-infectan-bacterias-pueden-comunicarse-entre-si-para-establecer> [Consulta: 22 juliol 2022]
- **Figura 14.** COL·LABORADORS DE WIKIPEDIA. Wikipedia, 2015. Recuperat de: https://es.wikipedia.org/wiki/Fago_P22 [Consulta: 22 juliol juny 2022]
- **Figura 15.** VÁZQUEZ, Eduardo. Instituto Craneomandibular, 2021. Recuperat de: <https://www.dolororofacial.com/blog/los-antibioticos-de-hace-tres-decadas-podrian-ofrecer-una-alternativa-a-los-analgesicos-a-base-de-opioides/> [Consulta: 3 agost juny 2022]

- **Figura 16.** ZAINAB, Syeda, et al. ScienceDirect, 2020. Recuperat de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135420309908> [Consulta: 3 agost 2022]
- **Figura 21.** CUERVO, Laura. ResearchGate, 2020. Recuperat de: https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Metodo-de-diluciones-seriadas-para-conteo-en-placa-Fuente-Banco-de-Diluciones_fig1_341507579 [Consulta: 5 agost 2022]
- **Figura 23.** GARCÍA, Quistián. Microbiología: Cultivo Puro, 2014. Recuperat de: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/cultivo-puro.html> [Consulta: 7 agost 2022]
- **Figura 25.** COL·LABORADORS DE BACHILLERATO VIRTUAL. Bachillerato Virtual, 2020. Recuperat de: <https://bachilleratovirtual.com/aula/mod/lesson/view.php?id=9374&pageid=4468&startlastseen=no> [Consulta: 17 agost 2022]

10. GLOSSARI

- **Agar:** medi solidificat més emprat en la preparació de medis de cultiu per microorganismes.
- **Amfipàtic:** que presenta una zona hidròfila i lipòfila.
- **Antibiòtic:** fàrmac que s'utilitza per a tractar infeccions bacterianes.
- **Anticossos:** proteïna sintetitzada per les cèl·lules plasmàtiques en resposta a l'estimulació que provoca un antigen.
- **Bacteriòfag:** virus que infecta només bacteris.
- **Bipartició:** forma de divisió cel·lular pròpia dels bacteris que consisteix en la divisió d'una cèl·lula en dues filles idèntiques.
- **Densitat òptica (DO):** magnitud física que mesura l'absorció d'un element òptic per unitat de distància.
- **Enzim:** substància orgànica, gairebé sempre formada per proteïnes, que accelera reaccions químiques.
- **Estèril:** (espai) lliure de microorganismes, no contaminat per cap microbi indesitjat. En el meu cas es deixava encès un bec Bunsen per mantenir l'espai de treball en condicions estèrils.
- **Eucariota:** (cèl·lula) que conté un nucli diferenciat.
- **Immunogen:** antigen capaç de provocar immunitat al pacient.
- **Incubació:** procés que consisteix a mantenir un cultiu de bacteris a una temperatura constant adequada de manera que es desenvolupin i es reproduïxin.

- **Microbiota:** conjunt dels microorganismes que es troben dins d'un organisme humà.
- **Microbis anaerobis:** tipus de microbis que són capaços de viure sense oxigen.
- **Micrografia:** fotografia feta per un microscopi electrònic.
- **Lisi:** trencament de la membrana cel·lular.
- **Peptidoglicà:** compost exclusiu dels bacteris, format per sucres i aminoàcids, que dona consistència i rigidesa a la paret cel·lular bacteriana.
- **pH:** és una variable química que ens permet mesurar el grau d'acidesa d'una substància. Va del 0 al 14, sent el 0 el grau més àcid i el 14 el que menys.
- **Pluricel·lular:** organisme compost de dues o més cèl·lules.
- **Procariota:** (cèl·lula) que no té nucli diferenciat.
- **Pròfag:** estat del fag en el qual el genoma és inserit en el cromosoma d'un bacteri.
- **Superbacteri:** són soques de bacteris resistents a la majoria d'antibiòtics.
- **Unicel·lular:** organisme compost per una única cèl·lula.

11. ANNEXOS

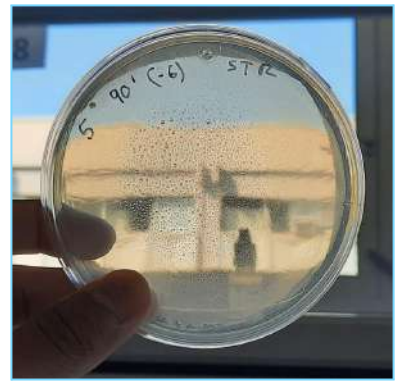
ANNEX A: Diversos cultius pel recompte de viables del segon experiment.



1) Str - 90' - 10⁻²



2) Str - 90' - 10⁻⁴



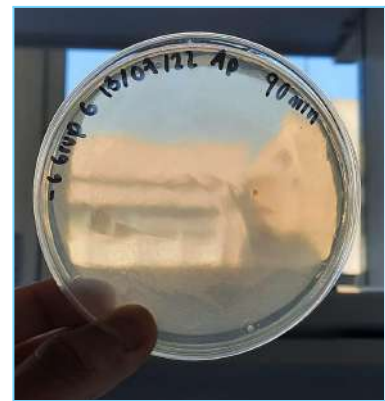
3) Str - 90' - 10⁻⁶



4) Ap - 180' - 10⁻²



5) Ap - 180' - 10⁻⁴



6) Ap - 180' - 10⁻⁶



7) P22 lític - 90' - 10⁻²



8) P22 lític - 90' - 10⁻⁴






9) P22 lític - 90' - 10⁻⁶

ANNEX B: Material utilitzat als experiments.

Imatge	Nom	Descripció
	<p>Agitador d'incubació</p>	<p>Aparell que permet agitar els cultius quan estan incubant.</p>
	<p>Bec Bunsen</p>	<p>Instrument a base de gas que permet escalfar i mantenir l'esterilització adequada als experiments.</p>
	<p>Cubeta d'espectrofotometria</p>	<p>Recipient on es disposa la mostra que llegirà l'espectrofotòmetre.</p>
	<p>Espectrofotòmetre</p>	<p>Aparell que mesura la DO d'una mostra. Com més bacteris tingui una mostra, més alta serà la DO.</p>

	<p>Incubadora</p>	<p>Aparell on es deixen els cultius que es volen incubar <i>overnight</i> (ON).</p>
	<p>Nansa de Digrafsky</p>	<p>Utensili que permet repartir una mostra homogèniament en una placa de Petri.</p>
	<p>Micropipeta</p>	<p>Instrument que permet agafar volums molt petits de líquids.</p>
	<p>Placa de Petri</p>	<p>Recipient on es realitzen els cultius de bacteris.</p>

	<p>Tub d'assaig</p>	<p>Tubs de vidre llargs i oberts que permet contenir mostres petites líquides.</p>
	<p>Tub d'Eppendorf</p>	<p>Recipient de petita mida on s'emmagatzemen les solucions de bacteris.</p>
	<p>Vòrtex</p>	<p>És un petit agitador que permet agitar tubs d'assaig i altres tubs petits.</p>