

PROBIÒTICS I ANTIBIÒTICS:

valoració experimental
dels pros i contres del
SEU CONSUM

Inés Mora

Tutora: Lluïsa de Yebra

INS Barcelona-Congrés

2018-2019

*“Els antibiòtics són una bona eina que s’ha de fer servir
tant com sigui necessari i tan poc com sigui possible”*

-LOURDES MIGURA, 2018

ÍNDIX

RESUM.....	1
JUSTIFICACIÓ.....	2
OBJECTIUS.....	3
HIPÒTESIS.....	3
INTRODUCCIÓ.....	4
1. BACTERIS.....	4
1.1. ESTRUCTURA BACTERIANA.....	4
1.1.1. Embolcalls i apèndixs.....	4
1.1.2. L'interior de la cèl·lula.....	6
1.2. MORFOLOGIA BACTERIANA.....	7
1.3. FISIOLOGIA BACTERIANA.....	8
1.3.1. Funció de nutrició.....	8
1.3.2. Funció de relació.....	9
2. ANTIBIÒTICS.....	11
2.2. CLASSIFICACIÓ SEGONS ELS MECANISMES D'ACCIÓ.....	12
2.2.1. Inhibidors de la síntesi o el manteniment de la paret cel·lular.....	12
2.2.2. Inhibidors de la síntesi d'àcids nucleics.....	12
2.2.3. Inhibidors de la síntesi de proteïnes.....	12
2.2.4. Alteradors de la membrana plasmàtica.....	13
2.3. FAMÍLIES D'ANTIBIÒTICS.....	13
2.3.1. β -làctamics.....	13
2.3.2. Macròlids.....	14
2.3.3. Quinolones.....	14
2.3.4. Aminoglicòsids.....	14
2.3.5. Glicopèptids.....	14
3. RESISTÈNCIES.....	15
3.1. APARICIÓ DE RESISTÈNCIES.....	15
3.2. CLASSIFICACIÓ DE LES RESISTÈNCIES.....	16
4. PROBIÒTICS.....	18
4.1. REQUISITS PER A QUE UN MICROORGANISME SIGUI CONSIDERAT UN PROBIÒTIC.....	19
4.2. Mecanismes d'acció.....	20
TREBALL PRÀCTIC.....	22
1. MATERIALS I MÈTODES.....	22
1.1. MATERIALS.....	22
1.2. MÈTODES.....	23
2. EXPERIMENTS I RESULTATS.....	25
2.1. EXPERIMENT 1: ANTIBIÒTICS vs. PROBIÒTICS ENFRONTATS A PATÒGENS.....	26
2.1.1. Objectiu relacionat amb l'experiment.....	26
2.1.2. Disseny experimental.....	26
2.1.3. Resultats.....	28
2.2. EXPERIMENT 2: DISCS DE IOGURT ENFRONTATS A PATÒGENS.....	30
2.2.1. Objectiu relacionat amb l'experiment.....	30
2.2.2. Disseny experimental.....	30
2.2.3. Resultats.....	32

2.3. EXPERIMENT 3: IOGURT BARREJAT AMB EL BACTERI PATOGEN.....	35
2.3.1. Objectiu relacionat amb l'experiment.....	35
2.3.2. Disseny experimental.....	36
2.3.3. Resultats.....	38
2.4. COSEMBRA DE PROBIÒTICS I BACTERIS PATÒGENS.....	41
2.4.1. Objectiu relacionat amb l'experiment.....	41
2.4.2. Disseny experimental.....	41
2.4.3. Resultats.....	44
DISCUSSIÓ.....	53
CONCLUSIONS.....	56
AGRAÏMENTS.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	58
ANNEXOS.....	60

RESUM

El propòsit d'aquest treball és avaluar, a partir d'un treball experimental, els avantatges i inconvenients del consum de probiòtics i antibiòtics en la lluita contra els bacteris patògens.

Hi ha estudis previs que afirmen que el probiòtics són beneficiosos a l'hora de combatre infeccions degut a la competència entre espècies (Swidsinski, A. 2016). Altres defensen el contrari, atès que sostenen que d'aquesta manera, si el probiòtic en qüestió presenta algun tipus de resistència, serà molt fàcil que aquesta sigui transmesa del probiòtic al bacteri patogen i el seu efecte podria ser completament contraproductiu (Rolain JM, 2013) (Sharma P, 2014).

Per altra banda, el problema actual que suposen les resistències bacterianes als antibiòtics es fa cada vegada més gran degut al constant mal ús generalitzat que fa la població d'aquests medicaments. Es preveu que cap al 2050 hi hauran més morts degudes a infeccions bacterianes que al càncer, per tant, urgeix la cerca de solucions (Zaman S., 2017) (OMS, 2018).

Per a dur a terme l'estudi hem contrastat el creixement de diversos bacteris causants de malalties en presència de diferents tipus d'antibiòtics i probiòtics. Els probiòtics testats han estat bacteris làctics aïllats i també probiòtics presents al iogurt.

Després de valorar tots els resultats, hem pogut concloure que veritablement s'ha de fer un consum responsable de tots aquests productes, tant antibiòtics com probiòtics, i sobretot en prendre'ls conjuntament, atès que el seu ús excessiu i irresponsable pot tenir conseqüències fatals en el futur de la salut humana.

JUSTIFICACIÓ

Vaig decidir escollir aquest àmbit de la recerca perquè, en primer lloc, la resistència als antibiòtics és un problema sanitari actual molt rellevant i preocupant; i en segon lloc, perquè estic molt interessada en els temes relacionats amb la biologia, especialment amb la bioquímica i biologia molecular i en un futur m'agradaria dedicar-me a la recerca en aquests camps. Així doncs, haver fet aquest treball m'ha permès conèixer una mica més de prop la professió a la qual em voldria dedicar i a la vegada assegurar-me de que això és el que realment m'agrada. A més, el meu institut va participar en el projecte *Small World Initiative (SWI)*, el qual és un projecte internacional en el que participen diversos centres escolars de tot el món amb l'objectiu de que els alumnes cerquin nous bacteris productors d'antibiòtics a la vegada de conscienciar-los sobre la situació actual respecte aquest antimicrobians i el gran problema que suposa fer un ús irresponsable d'aquests.

Primerament es presenta el treball bibliogràfic on s'introdueixen coneixements sobre els bacteris, els antibiòtics, els probiòtics i els mecanismes de resistència. Després es detalla la part experimental, duta a terme als laboratoris del departament de microbiologia de la Facultat de Veterinària de la UAB, on explicarem com hem realitzat les experiències de les quals s'extrauran els resultats i les conclusions pertinents.

També cal mencionar que s'espera que aquesta investigació contribueixi a sensibilitzar la gent sobre la importància de fer un bon ús dels antibiòtics i dels probiòtics.

OBJECTIUS

1. Esbrinar quin és l'efecte inhibidor dels probiòtics front el creixement de diferents espècies bacterianes i comparar-lo amb la inhibició produïda per antibiòtics.
2. Avaluar l'efecte de productes alimentaris que contenen probiòtics (i.e iogurt) sobre el creixement d'altres bacteris.
3. Analitzar una possible relació entre els probiòtics i la resistència bacteriana als antibiòtics.

HIPÒTESIS

1. Potser els probiòtics tenen un efecte inhibidor superior al dels antibiòtics i ajuden a combatre les resistències bacterianes.
2. Potser el iogurt, que és un aliment amb bacteris probiòtics, té un efecte inhibidor front bacteris patògens.
3. Potser els iogurts amb bífidus són més beneficiosos a l'hora de combatre infeccions bacterianes que els que no en tenen.
4. Potser alguns probiòtics que tinguin gens de resistència als antibiòtics els poden transmetre als bacteris patògens.

INTRODUCCIÓ

1. BACTERIS

Els bacteris són microorganismes procariotes d'entre 0,5 i 5 µm que es poden trobar a qualsevol hàbitat, terrestre o aquàtic, fins i tot als més extrems, com a residus radioactius o deus d'aigües calentes i àcides. S'estima que al cos humà hi son presents deu vegades més bacteris que cèl·lules humanes, especialment a la pell i al tracte digestiu. Malgrat que una gran part són innocus o beneficiosos, alguns bacteris patògens són causants de malalties infeccioses que han de ser tractades amb antibiòtics.

1.1. ESTRUCTURA BACTERIANA

1.1.1. Embolcalls i apèndixs

Membrana citoplasmàtica: Sent semblant a la de les plantes i animals, la membrana citoplasmàtica és una bicapa lipídica que realitza nombroses funcions com les de transport, transducció d'energia, dirigir la duplicació del DNA, punt d'ancoratge pels flagels i de barrera osmòtica¹. La membrana ha de estar preparada per resistir pressions osmòtiques intracel·lulars elevades. Per això una gran part dels bacteris presenten una estructura rígida envoltant la membrana.

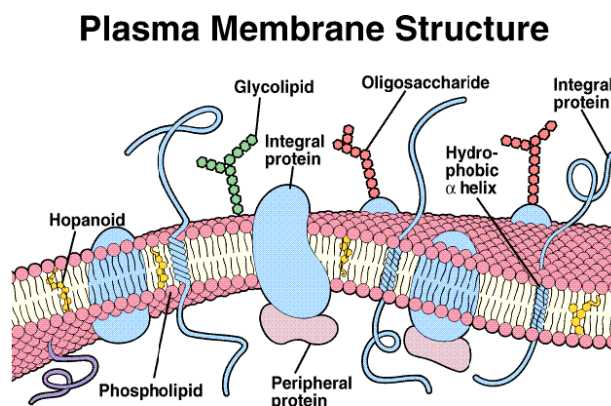


Figura 1. Estructura de la membrana plasmàtica. Font: *Microbiology*, McGraw Hill, 1999, Lansing M. Prescott

1. Schaechter, M., Ingraham, J.I., Neidhardt, F.C., (2005), *Microorganismes*, Wachington DC; Estats Units, Editorial Reverté.

Paret bacteriana: La paret cel·lular bacteriana té com a principal component un peptidoclà (polímer complex de glúcids i aminoàcids) anomenat mureïna. La cèl·lula ha de resistir pressions osmòtiques intracel·lulars elevades, per això, els bacteris presenten aquesta estructura rígida envoltant la membrana. Segons l'estructura d'aquesta paret bacteriana, podem classificar els bacteris en gramnegatius i grampositius. Els gramnegatius són més nombrosos que el grampositius, però moltes espècies patògenes d'animals i humans són grampositives. Aquests dos tipus es poden distingir gràcies a la tinció Gram; el grampositius reté un complex porpra blavós després d'un rentatge breu amb alcohol. Els gramnegatius, d'altra banda, no el retenen i esdevenen translúcids. Aquests últims es poden tenyir amb un colorant vermell.

Els bacteris grampositius presenten una paret cel·lular de mureïna, com s'ha mencionat prèviament, més gruixuda. Aquesta també és responsable de la forma i rigidesa de la cèl·lula bacteriana. A més, aquesta paret només és present als bacteris, fet que la fa susceptible de ser un bon blanc pels antibiòtics com ara tots els β -lactàmics que inhibeixen la síntesi de la mureïna. La paret també presenta una petita quantitat d'altre polímer, els àcids teiòics que contribueixen a l'adhesió dels microorganismes als teixits de l'hoste.

Els bacteris gramnegatius tenen una capa fina d'aquest peptidoglucà envoltada per una membrana externa diferent químicament de la resta de membranes biològiques i que és especialment resistent a substàncies nocives. També es tracta d'una estructura bilaminar, però la capa externa conté un lipopolisacàrid només present a les cèl·lules procariotes. Entre aquestes dues capes es crea un compartiment anomenat periplasma al qual es troben diferents enzims degradants i β -lactamases, que inhibeixen antibiòtics com la penicilina i la cefalosporina¹.

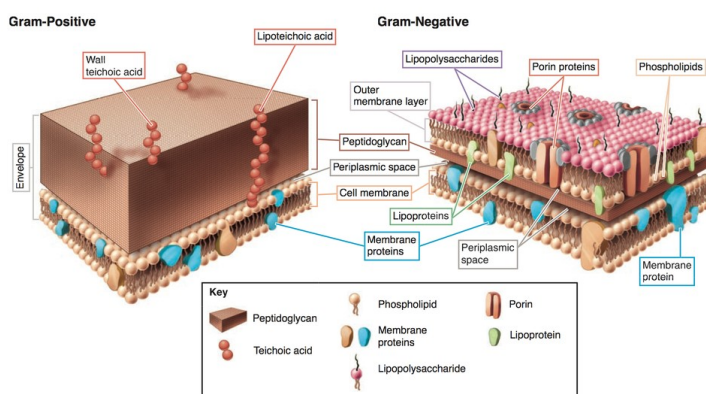


Figura 2. Paret bacteriana de bacteris Grampositius (a l'esquerra) i gramnegatius (a la dreta). Font: Selectivitatbiologia.weebly.com

Càpsula: La càpsula és un embolcall mucós format per un polisacàrid. La seva síntesi no és necessària constantment, només quan les condicions ambientals ho requereixen per a la supervivència. Protegeix contra la dessecació i és un mecanisme de defensa contra la fagocitosi.

Flagels: Són uns filaments que giren i actuen com propulsors. A algunes cèl·lules estan disposats als extrems i en altres aleatòriament al voltant de la perifèria.

Fímbries: També anomenades pèls, intervenen en diverses funcions, com ara l'adhesió a cèl·lules hoste o a la transferència de proteïnes i àcids nucleics a altres bacteris. Solen estar especialitzades i la majoria de bacteris gramnegatius en tenen.

1.1.2. L'interior de la cèl·lula

Nucleoide: La principal diferència entre les cèl·lules eucariotes i procariotes és que les últimes no tenen un nucli de debò i el DNA es troba al nucleoide que, a la gran majoria de les procariotes, conforma un únic cromosoma circular. El nombre de nucleoides pot ser variable segons les condicions de creixement.

Cromosoma bacterià: El DNA dels bacteris és una doble cadena circular plegada que es troba associada a proteïnes i es troba al nucleoide.

Plasmidis: A part dels cromosomes, alguns bacteris presenten material genètic extracromosòmic anomenat plasmidi que codifica funcions prescindibles.

Citoplasma: EL citoplasma està conformat pel citosol i els orgànuls. Donat que són organismes procariotes no presenten orgànuls citoplasmàtics delimitats per membranes, però tenen una alta concentració de ribosomes i macromolècules.

Inclusions i vesícules: Alguns procariotes tenen vesícules que s'encarreguen de diverses funcions fisiològiques; els bacteris fotosintètics en medis aquàtics (cianobacteris) presenten vesícules de gas semblant al del medi ambient per fer possible la flotabilitat a més de tilacoides aïllats i clorosomes en el cas de la resta de bacteris fotosintètics. Els bacteris autòtrofs sovint posseeixen carboxisomes, que contenen enzims necessaris per a la fixació del carboni als bacteris que fixen el diòxid de carboni per a

sintetitzar components bioquímics bàsics. Els enterosomes són similars als carboxisomes, però aquests es troben a bacteris heteròtrofs. Contenen enzims necessaris pel metabolisme d'algunes substàncies.

Ribosomes: Els ribosomes són estructures globulars dividides en dues subunitats sense membrana. Estan compostos per un 80% d'aigua, 10% d'RNAr i un 10% de proteïnes². Els ribosomes es poden trobar dispersos al citosol o adherits a la membrana del reticle endoplasmàtic rugós. La seva funció és dur a terme la traducció (síntesi de proteïnes).

PARTES DE LA CÉLULA PROCARIOTA

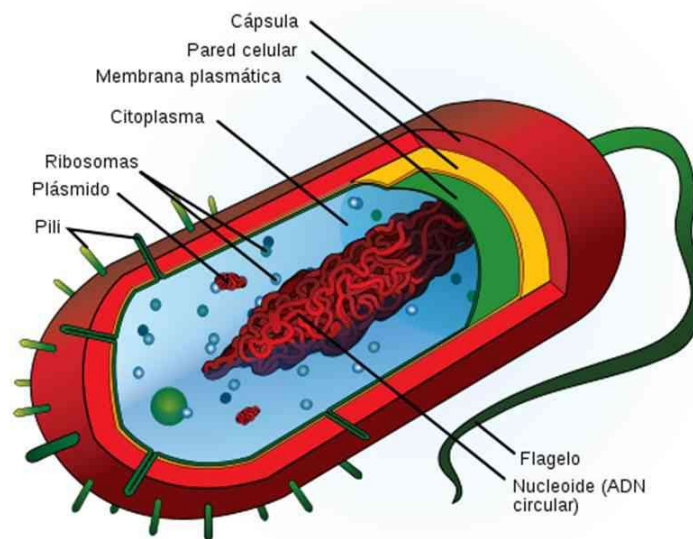


Figura 3. Estructura d'una cèl·lula bacteriana. Font: Partesdel.com

1.2. MORFOLOGIA BACTERIANA

La forma d'un bacteri està determinada per la rigidesa de la seva paret cel·lular. Els podem classificar en²:

Cocs: Tenen forma d'esfera i poden viure individualment o agrupats. Els diplococs són agrupacions de dos, els estreptococs en forma de cadenes, els estafilococs en forma de raïm irregular i les sarcines en forma de cub de 8 cèl·lules. Una porció important són patògens pels humans.

Bacils: Tenen forma ovalada i els més comuns produeixen malalties com el tètanus.

2. Fernández, A.J., Vázquez, M.B., (2016), *Biología. Sèrie observa*, Barcelona; Espanya, Santillana.

Espirils: Són bacteris gramnegatius en forma d'esprial. Són més sensibles a les condicions ambientals que altres bacteris, per això la via de transmissió, en cas que siguin patògenes, és el contacte directe.

Vibrions: Són bacteris gramnegatius amb una forma corba. Diverses espècies vibríó són patògenes i afecten el tracte digestiu, com ara *V. cholerae*, causant de la còlera.

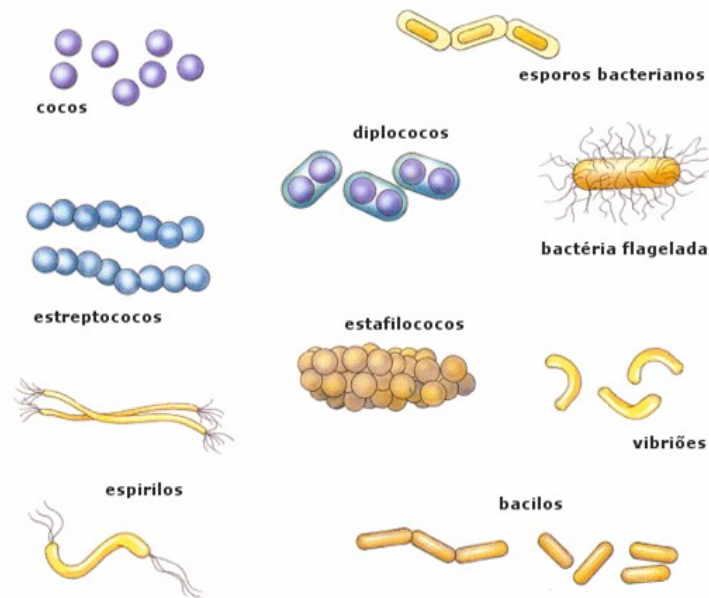


Figura 4. Representació de la morfologia bacteriana. Font:

<https://profdavidemobili.wordpress.com/2015/07/23/morfologia-y-estructura-bacteriana/>

1.3. FISIOLOGIA BACTERIANA

1.3.1. Funció de nutrició

Podem trobar bacteris amb tots els tipus de metabolisme que hi ha, fins i tot, existeixen bacteris que poden dur a terme dos tipus de metabolisme diferents segons el que hi convingui més. Els podem classificar segons tres criteris³:

a) La font de carboni:

Autòtrofs o litòtrofs: Sintetitzen els nutrients necessaris a partir de substàncies inorgàniques senzilles i obtenen el carboni del CO₂.

Heteròtrofs o organòtrofs: Requereixen d'una font de carboni orgànica, com ara alcohols, àcids grassos i hidrats de carboni.

Mixòtrofs: Poden obtenir carboni de les dues maneres prèviament mencionades.

b) La font d'energia:

Fotòtrofs: Obtenen energia a partir de la llum solar (fotosintètics)

Quimiòtrofs: Obtenen energia oxidant determinades substàncies inorgàniques.

1.3.2. Funció de relació

Una de les respostes més conegudes davant de les variacions mediambientals és la formació d'espores, que tenen com a finalitat protegir el material genètic de les condicions més adverses; es forma una complexa coberta al voltant del DNA anomenada endòspora i quan la resta de la cèl·lula es destrueix, les endòspores queden lliures al sòl i les anomenem exòspores. Les exòspores són resistents a temperatures elevades, sequeres i agents químics com ara àcids i desinfectants o radiacions.

1.3.3. Funció de reproducció

Els bacteris es reproduïxen asexualment, on el individu resultants són genèticament idèntics al progenitor. Després de la duplicació del DNA es genera un septo que divideix el citoplasma per la meitat i el resultat són dues cèl·lules clons de la progenitora i entre elles.

Malgrat la seva reproducció asexual, pot esdevenir-se un intercanvi genètic (fenomen anomenat parasexualitat) no com una etapa obligada de la reproducció sinó que succeeix aleatòriament i es pot donar de tres maneres⁴:

Transformació: El bacteri incorpora DNA procedent de la lisi d'una altra i ho integra al seu cromosoma. Les cèl·lules capaces de fer això s'anomenen «competents» i aquesta característica es desenvolupa de manera espontània a algunes espècies. Moltes cèl·lules no la tenen perquè sintetitzen endonucleases de restricció que eliminen el material genètic exogen.

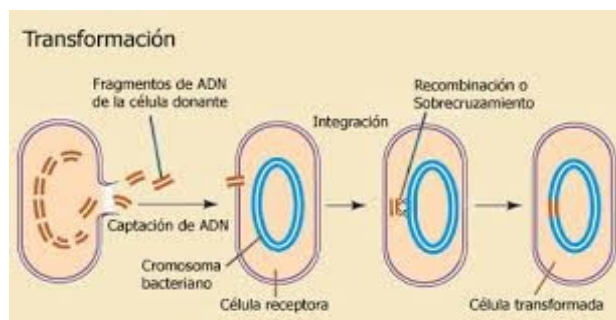


Figura 5. Mecanisme de parasexualitat per transformació. Font: Satur62.bolgsport.com

3. Jimeno, A., Ballesteros, M., (2016), *Biología 2. Sèrie observa*, Barcelona; Espanya, Santillana

Transducció: A la transducció es transfereix el DNA mitjançant un bacteriòfag el qual té DNA bicatenari. Aquests substitueixen el seu DNA total o parcialment pel del bacteri hoste. Quan el bacteriòfag infecta una altra cèl·lula i intercanvia el material genètic de la mateixa manera, s'estarà produint un intercanvi entre la cèl·lula infectada prèviament i la següent⁴. Podem distingir dos tipus de transducció; generalitzada i especialitzada. Segons els gens que es transdueixen, podem dir que és generalitzada si els fags poden desplaçar qualsevol gen de la cèl·lula infectada o especialitzada si només en poden desplaçar uns gens determinats. El 10% del DNA transduït pel fag s'incorpora al genoma bacterià, la resta romandrà al citoplasma, llavors es dona una transducció avortiva.

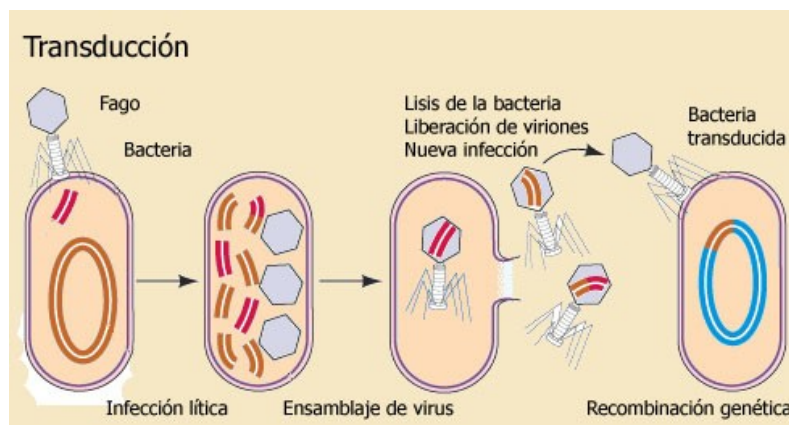


Figura 6. Mecanisme de parasexualitat per transducció. Font: Satur62.bolgspot.com

Conjugació: Mitjançant la conjugació s'intercanvia material extra-cromosòmic (plasmidis) a través d'un pèl sexual. Un bacteri pot fer de cèl·lula donant amb la presència d'un plasmidi transmissible que codifica la generació d'un pèl i la transferència del DNA (factor de transferència). Aquest mitjà de parasexualitat és el que es dona més comunament quan es transmeten gens de resistència.

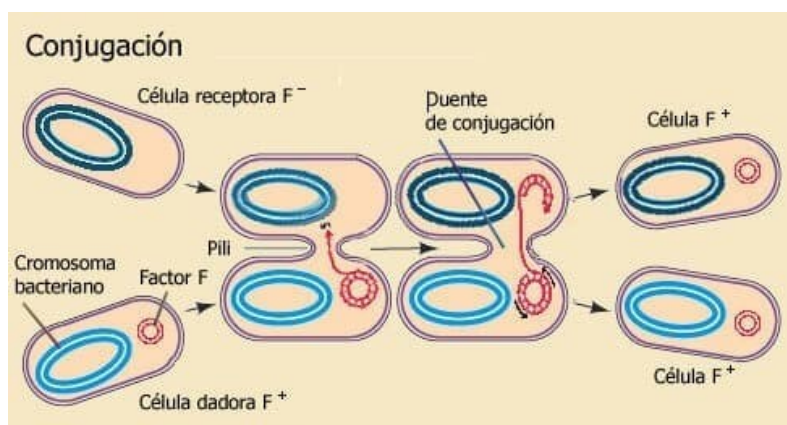


Figura 7. Mecanisme de parasexualitat per conjugació. Font: Satur62.bolgspot.com

4. Pérez, R. G., Villaverde, M.C., (1997), *Microbiología I*, Madrid; Espanya, Paraninfo.

2. ANTIBIÒTICS

Els antibiòtics són substàncies produïdes per bacteris o fongs amb la finalitat de competir amb altres espècies. Aquestes inhibeixen el creixement d'altres organismes i faciliten el desenvolupament de l'individu que les produeix bloquejant funcions vitals dels competidors, d'aquesta manera, els antibiòtics solen ser substàncies innòcues per a les cèl·lules eucariotes⁴.

Els antibiòtics poden ser bactericides (maten als bacteris) o bacteriostàtics (inhibeixen el creixement bacterià). No obstant això, no hi ha una clara classificació segons aquest criteri ja que depèn de la concentració i l'espècie de bacteri. No tots els antibiòtics són efectius contra tots els bacteris; tenim antibiòtics d'alt espectre d'acció, que actuen sobre un gran nombre d'espècies, i de baix espectre, que actuen sobre un nombre reduït⁵.

2.1. Descobriment dels antibiòtics

Al 1928, Alexander Fleming estava treballant amb bacteris estudiant el seu creixement. Les condicions amb les que treballava no eren les més higièniques. Un dia va veure com una de les plaques on havia sembrat *Stafilococcus aureus* havia estat contaminada pel fong *Penicillium notatum*. El que va sorprendre a Fleming va ser que al voltant d'aquest fong no hi havia creixement bacterià.

Ell va suposar que el fong estava secretant una substància capaç d'inhibir el creixement d'aquest bacteri, i no estava equivocat. Va denominar aquesta substància *penicil·lina* i va continuar investigant amb aquesta fins a adonar-se que no era tòxica per un ratolí.

El desencadenament de la Segona Guerra Mundial va augmentar la necessitat de tractar ferides amb antimicrobians⁶. Howard Florey, Ernst Chain i el seus col·laboradors van començar desenvolupant la penicil·lina a Oxford i van acabar diversos centenars de científics treballant en aquest projecte. Com a resultat, al 1944 ja hi havia suficient antibiòtic per tractar a tots els combatents nord-americans i britànics. A partir d'aquell moment moltes infeccions que fins a llavors tenien un alt percentatge de morts, com ara la tuberculosi, es van poder tractar amb aquestes substàncies recentment descobertes i aïllades.

5. Tte. Cor. Fernando Fernández Riverón, My. Jorge López Hernández, Dra. Laida María Ponce Martínez, y Dra. Caridad Machado Betarte, *Resistencia bacteriana, Rev Cubana Med Milit 2003;32(1):44-8*.

6. Prentis, S., (1993), *Biothecnology: a new industrial revolution*, Londres; Gran Bretanya, Orbis Publishing Limited

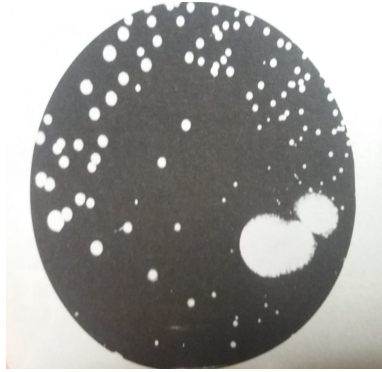


Figura 8. Efecte del fong *Penicillium* davant al creixement bacterià. A la cantonada inferior dreta es troba el fong i els puntets més petits que creixen al voltant de la placa són colònies bacterianes no afectades per la penicil·lina. (Font: *Biotecnología: una revolución industrial. Làmina 4*)

2.2. CLASSIFICACIÓ SEGONS ELS MECANISMES D'ACCIÓ

2.2.1. Inhibidors de la síntesi o el manteniment de la paret cel·lular

Els bacteris tenen una pressió osmòtica interna molt elevada, per tant, sense la paret bacteriana la cèl·lula no pot sobreviure. Els antibiòtics que tenen com a mecanisme d'acció inhibir la síntesi de la paret interrompen el procés de producció i transport dels peptidoglicans que componen la paret atacant enzims implicats. A conseqüència d'una paret cel·lular feble es produeix la lisi del bacteri.

Les penicil·lines i cefalosporines tenen aquest efecte i són considerats antibiòtics bactericides.

2.2.2. Inhibidors de la síntesi d'àcids nucleics

Aquest tipus d'antibiòtics bloquegen la síntesi de components que formen el DNA o RNA impedit la transcripció o aturant la traducció i són considerats antibiòtics bacteriostàtics. Un exemple d'aquest tipus són les sulfamides.

2.2.3. Inhibidors de la síntesi de proteïnes

Aquests antibiòtics tenen efecte en els ribosomes del bacteri on es duu a terme aquest procés. Poden actuar sobre la subunitat 50s o 30s. Els antibiòtics aminoglicòsids, per exemple, es fixen de manera irreversible a la subunitat 30s i interfereixen a la fixació del RNA de transferència (tRNA), que

transporta els aminoàcids fins al ribosoma. També poden actuar contra l'RNA missatger (mRNA), cosa que produeix una lectura errònia i per tant, la síntesi de proteïnes no funcionals.

Altres antibiòtics, com ara el cloramfenicol, es fixen a la subunitat 50s i boqueixen l'activitat de l'enzim peptidil transferasa, cosa que fa impossible la formació d'enllaços peptídics entre aminoàcids.

2.2.4. Alteradors de la membrana plasmàtica

Els antibiòtics alteradors de la membrana plasmàtics creen porus a la membrana plasmàtica, encarregada de regular el pas de substàncies entre el medi intracel·lular i extracel·lular, de tal manera que els ions i macromolècules s'escapen de l'interior fent que el bacteri no pugui obtenir energia. Els antibiòtics que produeixen tal efecte són bactericides, però tenen un inconvenient; la membrana cel·lular és present tant a cèl·lules procariotes com a eucariotes, així que pot afectar a cèl·lules humanes també. La polimixina pertany a aquest grup.

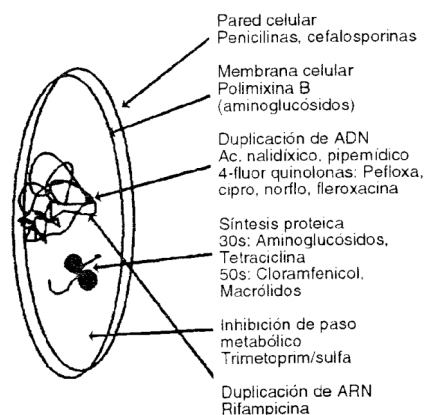


Figura 9. focus d'acció de diferents antimicrobians. Font: *Principales grupos de antibiòtics*, V. seija i R. Vignoli, pàgina 631.

2.3. FAMÍLIES D'ANTIBIÒTICS

2.3.1. β -làctàmics

Els antibiòtics β -làctàmics són d'origen natural o semisintètic. Van ser els primers descoberts, els més diversos i els més usats. Tots tenen en comú una estructura anomenada anell β -làctàmic, la qual cosa els permet inhibir enzims responsables de l'última fase de la síntesi de la capa de peptidoglicà de la paret cel·lular i són normalment bactericides.

Dintre dels β -làctàmics es troben les penicil·lines que són efectives davant de cocs i bacils. Alguns bacteris, per tal de combatre l'efecte de les penicil·lines, sintetitzen un enzim anomenat beta-

lactamasa que es capaç de destruir l'anell β -lactàmic deixant l'antibiòtic inactiu. És per això que algunes penicil·lines són combinades amb inhibidors de la beta-lactamasa. Les cefalosporines són un altre tipus i es divideixen en quatre generacions. Les de la primera generació són molt actives davant de cocs grampositius, les pròximes generacions perden aquesta activitat i la substitueixen amb major afectivitat davant de bacils grampositius, amb algunes excepcions. Un tercer grup és el dels monobactàmics, que només es troba l'aztronam, el qual proseeix una gran efectivitat amb bacteris aerobis gramnegatius, però no és així amb bacteris grampositius i anaerobis. Finalment, els carbapems presenten el major espectre d'activitat conegut dintre del beta-làctamics i disposen d'una activitat bactericida davant de cocs grampositius.

2.3.2. Macròlids

Els macròlids són d'origen semisintètic i es classifiquen segons el nombre de carbonis. Actuen unint-se a la subunitat 50s del ribosoma bacterià.

2.3.3. Quinolones

Les quinolones també són un grup d'antibiòtics d'ampli espectre, les més utilitzades són les fluoroquinolones, que tenen un grup fluorur. Actuen inhibint el DNA girasa, l'enzim que catalitza el superenrotllament del DNA.

2.3.4 Aminoglicòsids

Actuen sobre la subunitat 30s dels ribosomes, provocant una lectura errònia del mRNA, per aquest motiu, és esperat que es consideri un antibiòtic bacteriostàtic, però el seu efecte es bactericida. Es desconeix la raó per la qual l'antibiòtic acaba matant el bacteri si el seu mecanisme d'acció és inhibir la síntesi de proteïnes. Una hipòtesi al respecte és que pot ser el prolongat efecte post antibiòtic podria acabar matant el bacteri.

2.3.5. Glicopèptids

Els glicopèptids tenen múltiples mecanismes d'acció, fent-los un grup amb baix nivell de resistència bacteriana. Aquests inhibeixen la síntesi de la paret cel·lular i a més alteren la permeabilitat de la membrana i la síntesi de RNA.

3. RESISTÈNCIES

Les resistències als antibiòtics són els mecanismes amb els quals un bacteri aconsegueix disminuir l'acció dels agents antimicrobians⁵. A dia d'avui 25.000 persones moren a causa d'infeccions bacterianes de bacteris multi-resistents, xifra que podria pujar fins a 700.000 cap a l'any 2050, és a dir, més persones moririen a causa de bacteris multi-resistents que de càncer. A nivell global, estaríem parlant d'uns 10 milions de morts⁷.

3.1. APARICIÓ DE RESISTÈNCIES

Des de que van aparèixer als antibiòtics per primera vegada han anat sorgint noves resistències degut al fenomen de la selecció natural. Com a conseqüència de l'administració d'antibiòtics desapareixen els que són sensibles i només sobreviuen els que s'adapten a aquests (els que són resistents). Aquest últim grup de microorganismes serà el que es reproduirà i la població de bacteris resistents es farà més amplia.

Les mutacions genètiques, molt freqüents en bacteris, poden produir un gen de resistència o la millora d'un ja existent. Amb els mecanismes de parasexualitat bacteriana els bacteris poden adquirir gens de resistència d'organismes veïns i integrar-los al plasmidi o al cromosoma bacterià.

Un factor també important per l'aparició i propagació de noves resistències és l'ús inadequat, que crea condicions favorables per a que això sigui possible. Per exemple, quantitats insuficients d'antibiòtics o l'ús preventiu o innecessari. Els antibiòtics són utilitzats com a mesura preventiva a la ramaderia. S'afegeixen a l'aliment del bestiar amb l'objectiu de prevenir les infeccions bacterianes. Això es una de les principals causes del constant augment de bacteris multi-resistents, ja que exerceix una pressió selectiva molt alta. A més, quan prenem antibiòtics (nosaltres o el bestiar) expulsem restes d'aquests quan defequem i acaben a les clavegueres on, de nou, el procés de selecció natural acaba amb els bacteris que no són resistents i només queden els que ho són, però aquesta vegada no succeeix a nivell d'un sol organisme, sinó que estem fent que només quedin al medi ambient els bacteris resistents⁷.

7. Rierola, S. (productor) i Regàs, J. (dir.). (2018). *La fi dels antibiòtics* (reportatge). Espanya: TV3

A més de les nombroses resistències als antimicrobians, també hi ha una altra part negativa; els antibiòtics ataquen a tots els tipus de bacteris, tant a patògens com a innocus, fent que els bacteris que es troben en simbiosi amb el nostre organisme siguin afectats igualment. Aquest bacteris inofensius podien haver limitat l'expansió dels patògens, per tant, al eliminar-los, es crea un medi més favorable per al creixement dels últims mencionats.

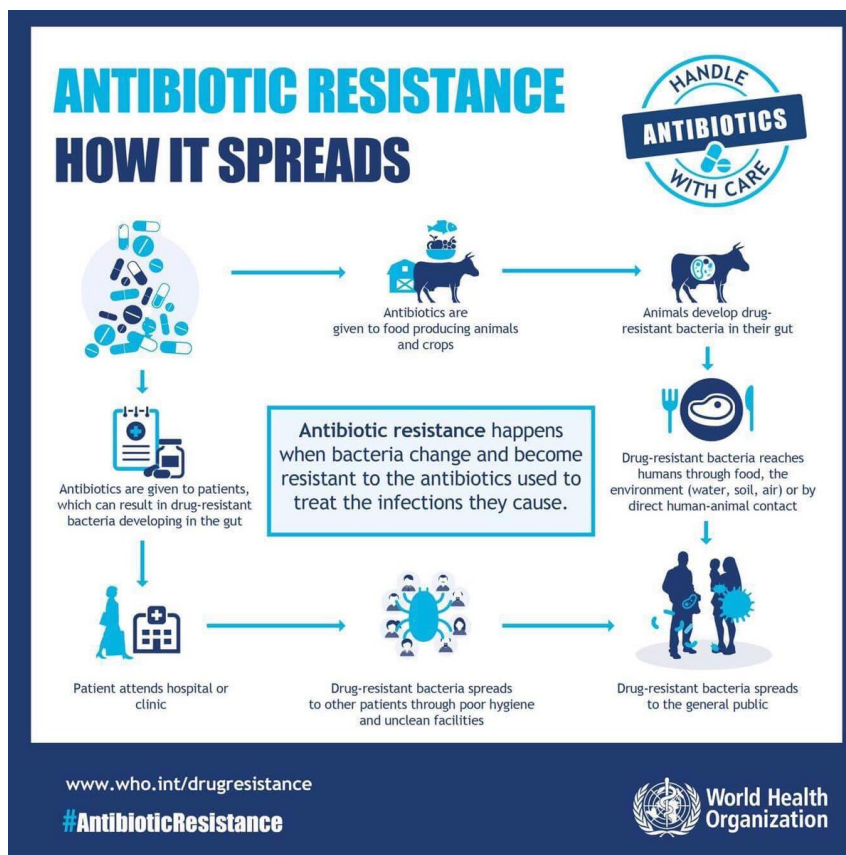


Figura 10. Com les resistències bacterianes s'estenen. Font: OMS, 2018

3.2. CLASSIFICACIÓ DE LES RESISTÈNCIES

Podem classificar els tipus de resistència de la següent manera:

Natural: És una propietat intrínseca del bacteri i no té a veure amb l'exposició d'aquest al fàrmac en qüestió.

Adquirida: És deguda a canvis a la dotació genètica. És cromosòmica si es tracta d'una mutació que beneficia al bacteri de manera que el fa resistent, es dona espontàniament. És extracromosòmica quan

el gen de resistència està codificat a un plasmidi. En aquest cas pot passar d'un bacteri a un altre per transducció o conjugació¹.

També podem classificar-les segons el mecanisme de resistència:

Modificació enzimàtica: En aquest cas, el bacteri produeix uns enzims que són capaços de hidrolitzar o modificar l'estructura química de l'antibiòtic per tal de desactivar-lo. (micro tomo i) Un exemple d'aquest mecanisme seria el cas de les β -lactamases, que són enzims que hidrolitzen l'anell β -lactàmic de les penicil·lines .

Per alteracions de la permeabilitat de la membrana: La membrana regula el pas de substàncies cap a l'exterior i l'interior de la cèl·lula. Una manera de evitar el pas d'antibiòtics és mitjançant la pèrdua o modificació dels canals d'entrada.

Pot ser alterada la membrana externa, mitjançant la modificació de porines, unes proteïnes per les quals passen substàncies hidròfiles que no poden passar per la bicapa lipídica (de caràcter hidrofòbic) i per les quals també accedeixen els antibiòtics a l'interior. Amb aquesta modificació, ja no serà possible que els antibiòtics travessin la membrana.

També és possible l'aparició de bombes d'efluxió que agafen l'antibiòtic quan es troba a l'espai periplasmàtic (espai entre les dues capes de la membrana de bacteris gramnegatius) i l'expulsen cap a l'exterior, evitant que arribi al seu lloc d'acció.

Modificació del lloc diana: Alguns antibiòtics actuen unint-se i desactivant proteïnes essencials de l'organisme. És per això que alguns bacteris modifiquen els enzims diana o en produeixen de diferents. Un exemple és la metilació del RNA ribosòmic, és a dir, l'addició d'un grup metil al rRNA. Els bacteris *S.aureus* i *S.epidermidis* fan servir aquest canvi per ser resistents a antibiòtics com el cloramfenicol i les tetraciclines.

Altres modificacions poden esdevenir-se a la paret bacteriana o a la membrana plasmàtica, que també són llocs diana per a altres antibiòtics.

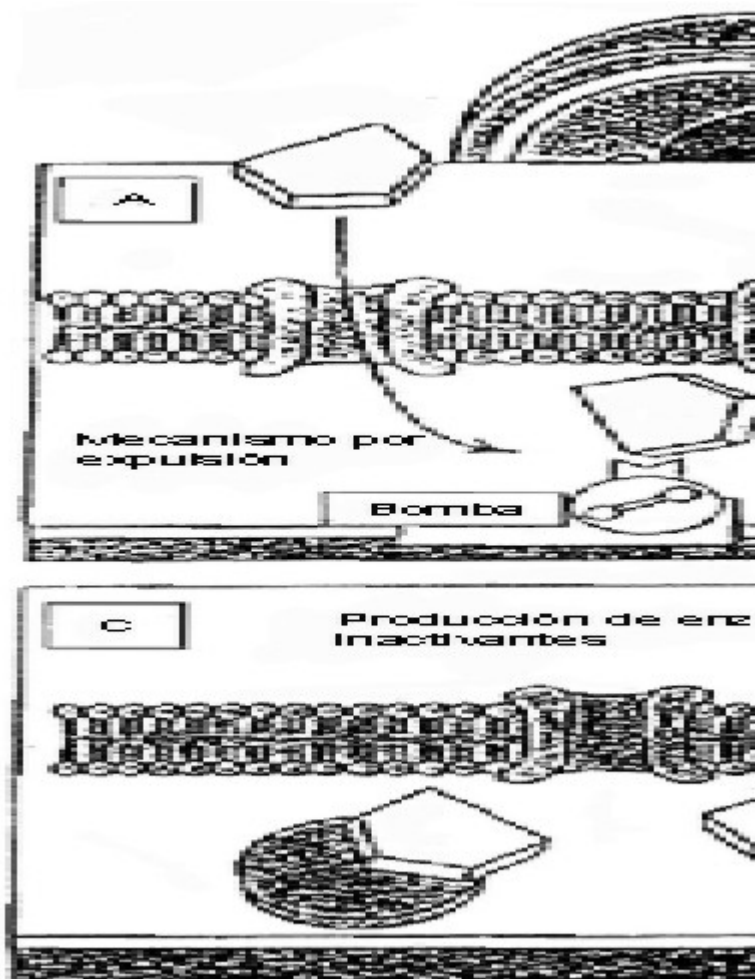


Figura 11. Mecanismos de resistència bacteriana. Font: Rev Cubana Med Milit 2003;32(1):44-8 TRABAJOS DE REVISIÓN Hospital Militar Central "Dr. Luis Díaz Soto" RESISTENCIA BACTERIANA Tte. Cor. Fernando Fernández Riverón,1 My. Jorge López Hernández,2 Dra. Laida María Ponce Martínez,3 y Dra. Caridad Machado Betarte

4. PROBIÒTICS

Els probiòtics són microorganismes vius que, administrats en quantitats adequades, proveeixen beneficis sanitaris a l'hoste (El grup d'experts mixt de Organització l'Alimentació i l'Agricultura de les Nacions Unides i l'Organització Salut Mundial, 2001). La paraula probiòtic prové del grec i té el significat de «a favor de la vida». Per a què un bacteri pugui ser considerat probiòtic ha de complir uns requisits dels quals parlarem més endavant.

Al cos humà hi ha deu vegades més bacteris (uns 100 bilions) que cèl·lules humanes vivint en simbiosi amb nosaltres. Tots aquests microorganismes conformen la microbiota i estan repartits per tot el cos a

tots els individus sans (pell, mucoses...), excepte a teixits interns com el cervell o la sang. No és possible que una persona existeixi sense la microbiota.

El cos humà es completament estèril fins al moment en el que neix, on es troba en contacte amb la flora genital de la mare. Després, el nou-nat es troba en constant exposició amb tots els bacteris presents a l'ambient. La pell es ràpidament colonitzada, així com la bucofaringe i altres mucoses. La llet materna es la font de bacteris que rep l'infant i que comencen a colonitzar el tracte digestiu. Entre aquestes es troben els *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Staphylococcus*. En general, els probiòtics són bacteris «acido-làctics», principalment del gènere *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

No s'han de confondre els prebiòtics amb els probiòtics. Els prebiòtics són la part no digerible dels aliments, la fibra, que quan arriba al colon és fermentada. Aquesta fermentació alimenta els bacteris que conformen la microbiota (incloent els bacteris probiòtics). Tant els probiòtics com els prebiòtics són beneficiosos per la salut però són coses diferents⁹.

La microbiota és beneficiosa de moltes maneres; ajuda en la digestió dels aliments, produeix vitamines i protegeix de la colonització d'altres microorganismes patògens. Aquesta última propietat és la que ens interessa estudiar particularment en aquest treball.

4.1. REQUISITS PER A QUE UN MICROORGANISME SIGUI CONSIDERAT UN PROBIÒTIC

Al 2001 experts pertanyents a la FAO i l'OMS van establir les següents recomanacions per l'avaluació dels probiòtics als aliments⁸:

1. Que el bacteri no produeixi substàncies tòxiques per l'hoste, és a dir, ha de ser segur per l'hoste.
2. Que es mantingui viu per a que pugui fer les funcions de les quals ens podem beneficiar.
3. Que sigui sensible als antibiòtics.
4. La realització de proves *in vitro* per garantir la resistència a l'acidesa gàstrica, adherència a les cèl·lules humanes, activitat antimicrobiana amb microorganismes patògens, habilitat de reduir l'adhesió de microorganismes patògens, etc.

8. JOINT FAO/WHO WORKING GROUP REPORT ON DRAFTING GUIDELINES FOR THE EVALUATION OF PROBIOTICS IN FOOD, 2002, LONDON ONTARIO, CANADA.

9. Jackson GI Medical. (2014), *Prebiotic vs Probioti*. Recuperat de: <https://www.prebiotin.com/prebiotin-academy/what-are-prebiotics/prebiotics-vs-probiotics/>

Si els probiòtics no són sensibles als antibiòtics, es pot donar la transferència de gens de resistència entre els organismes probiòtics i els patògens mitjançant la parasexualitat i llavors seria contraproductiu l'ús dels probiòtics per inhibir el creixement d'un bacteri patògen.

4.2. MECANISMES D'ACCIÓ

Els probiòtics poden ser beneficiosos de diferents maneres les quals anomenem mecanismes d'acció¹⁰:

1. Reforç de la barrera gastrointestinal:

Alguns microorganismes contribueixen a la correcta permeabilitat de la mucosa intestinal. Alguns bacteris patògens alteren la permeabilitat d'aquesta i permeten el pas de bacteris o macromolècules de la dieta a través de la mucosa, cosa que alguns probiòtics poden reparar.

2. Exclusió competitiva:

L'exclusió competitiva permet als microorganismes probiòtics colonitzar ampliament l'intestí, el qual resulta en una competició entre aquests i els bacteris patògens per un lloc de la paret intestinal on adherir-se i pels nutrients. Això dificulta la proliferació de microorganismes patògens.

3. Millora del metabolisme

Els probiòtics beneficien el procés de digestió de l'aliment a l'hoste. L'ajut més significatiu es dona a aquells individus intolerants a la lactosa. Estudis han demostrat que el metabolisme d'aquesta millora quan la inclouen a la seva dieta iogurt en comptes de llet¹⁰. Això es pot explicar de dues maneres. Per una banda, podria ser resultat de el lent buidament gàstric del iogurt que facilita l'acció dels enzims lactasa residuals a l'intestí prim. D'altra banda, podria ser la millora de la flora gràcies als bacteris làctics que conté el iogurt.

10. M. López-Brea i D. Domingo, *Antibioticoterapia con probióticos*, Rev Esp Quimioterap, Junio 2007; Vol. 20 (Nº 2): 170-181.

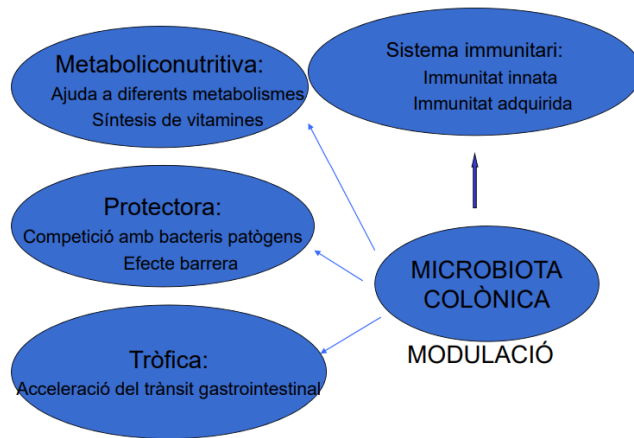


Figura 12. Esquematzació dels mecanismes d'acció bacteris probiòtics present a la microbiota colònica.

Font: Probiòtics i prebiòtics, Gemma Tribó Alcole (2011).

TREBALL PRÀCTIC

1. MATERIALS I MÈTODES

A continuació detallaré què he fet servir per a dur a terme la part experimental del treball així com la metodologia desenvolupada en les diferents etapes. Als annexos podeu trobar imatges dels materials assenyalats amb un asterisc.

1.1. MATERIALS

- ◆ Bec de Bunsen*
- ◆ Vòrtex*
- ◆ micro-pipeta*
- ◆ Estufa a 37°
- ◆ 20 Tubs d'assaig
- ◆ 29 tubs d'Eppendorf*
- ◆ Microscopi
- ◆ Gradeta*
- ◆ Nansa de Kollen*
- ◆ Nansa Digralsky*
- ◆ Pinces
- ◆ Peu de rei
- ◆ Estufa a 37°
- ◆ Dues dissolucions McFarland (0,5 i 1,0)*
- ◆ Tinció de gram
- ◆ Hisops estèrils*

- ◆ Alcohol
- ◆ Oli d'immersió
- ◆ Portaobjectes*
- ◆ 179 Plaques de petri (12 MRS i 167 TSA)*
- ◆ 60 discs estèrils
- ◆ Solució de Ringer
- ◆ Discs d'antibiòtics: Amikacina, ampicilina, tetraciclina, colistina, kanamicina, neomicina, vancomicina i gentamicina. (aquests antibiòtics seran emprats per realitzar totes les experiències on es requereixin antimicrobians).
- ◆ Cultius de els microorganismes patògens: *Pseudomonas sp.*, *Staphiloccucs aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Salmonella*. (aquestes soques seran emprades per realitzar totes les experiències).
- ◆ Soques de bacteris probiòtics: *Lactobacillus plantarum* CA1 (cargols), *Lactobacillus plantarum* 86 (gos) i *Lactobacillus plantarum* Gisela (euga) *Lactobacillus plantarum* 33 (porcs) (aquests probiòtics seran emprats a l'experiment 1). *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus lactis* (Aquestes soques resistents seran emprades solament per realitzar l'experiment 4).
- ◆ 2 iogurts, un amb bífidus i l'altre sense, de mateixa marca, sense sucre ni sabor.

*NOTA: Com que tots els probiòtics emprats en aquest treball són làctics, alternarem entre aquestes dues nomenclatures.

1.2. MÈTODES

1. Esterilització:

Per esterilitzar el material com nanses o pinces, farem servir un bec de bunsen i alcohol. Mullem el material en alcohol i tot seguit l'apropem al foc amb una inclinació d'aproximadament 45º de manera que la mà quedi al punt més elevat i que el foc no ens cremi.

2. Preparació de dilucions a partir d'un cultiu (a una placa):

Per preparar una dilució de bacteris hem de agafar amb un hisop una petita quantitat d'una colònia del bacteri que volem diluir. L'introduïm a un tub d'assaig que conté solució de Ringer i l'agitem una mica. Després, per homogeneïtzar-la, posem el tub al vòrtex i tot seguit comparem la concentració de la dilució que acabem de preparar amb la de l'escala de McFarland (referència en suspensions bacteriològiques per saber el nombre de bacteris per mil·lilitre). Si la concentració queda per sota de la que volem, agafem un altre hisop i repetim aquest procés.

3. Preparació de dilucions a partir d'una dissolució mare:

Per a preparar una dilució a partir d'una altra massa concentrada utilitzem una micro-pipeta, agafem 1 ml de la dissolució mare i la introduïm al tub s'assaig. Després omplim amb Ringer fins a aconseguir la concentració desitjada, homogeneïtzem al vòrtex i comparem amb la dilució de McFarland per valorar si hem obtingut la concentració adequada o no.

4. Sembra:

Per inocular els bacteris agafem amb la micro-pipeta 100 μ l de la dilució i els dipositem al medi de cultiu, tot seguit esterilitzem la nansa Digrafsky mullant-la amb alcohol i apropant-la al foc i repartim els 100 μ l de dilució per tota la placa. Per últim, tornem a esterilitzar la nansa.

5. Mesura dels halos d'inhibició:

Per tal de mesurar els halos d'inhibició, agafem un peu de rei i mesurem el diàmetre d'aquest. En aquesta zona els bacteris sembrats prèviament han estat inhibits per l'antibiòtic i quant més gran sigui l'halo, més sensible és el bacteri a aquest antimicrobià.

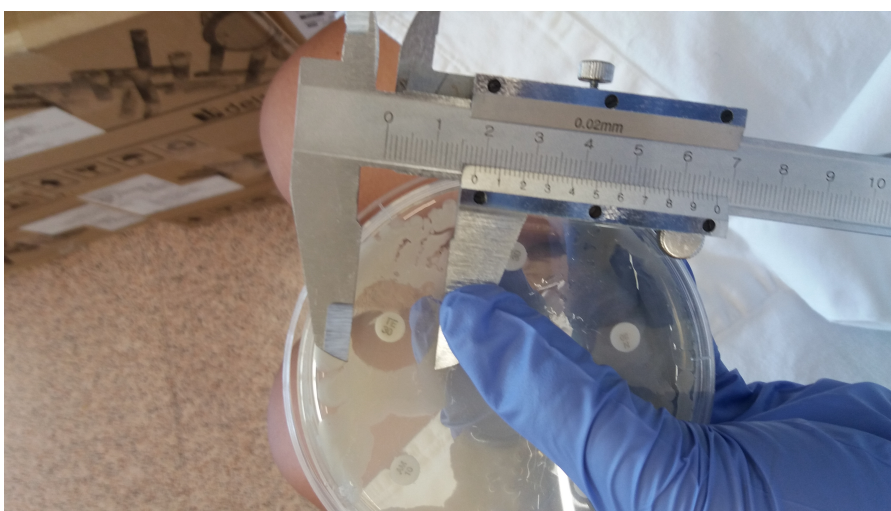


Figura 13. Mesura d'un halo d'inhibició generat per un antibiòtic.

6. Tinció de gram:

Per fer una tinció, primer hem de posar la mostra al porta objectes. Per tal de fer-ho, agafem la nansa de Kolle i l'esterilitzem. A continuació, la mullem amb una mica d'aigua destil·lada i la posem al portaobjectes. La tornem a esterilitzar i agafem una petita quantitat d'una colònia de la placa on tenim el cultiu i la posem al portaobjectes damunt la part prèviament mullada i esterilitzem la nansa de nou. Per últim, apropem el porta objectes al foc, amb cura de no cremar els bacteris, per fixar la mostra fins que l'aigua s'hagi evaporat.

Quan tinguem totes les mostres que volem tenyir als portaobjectes, procedim a fer la tinció. Primer afegim el blau violeta i esperem durant un minut. Després, esbandim la mostra amb aigua destil·lada i hi apliquem el lugol i, de nou, esperem durant un minut. Esbandim un altre cop, afegim alcohol d'acetona i el deixem entre cinc i trenta segons. Esbandim bé la mostra i, per acabar, afegim la safranina i l'esbandim després d'un minut.

7. Preparació de discs:

Per preparar els discs, ja sigui de probiòtics o de iogurt, dipositem una petita quantitat del producte a una placa de petri estèril amb una micro-pipeta i, amb unes pinces esterilitzades, agafem un disc també estèril i l'impregnem a la placa. Repetim aquest procediment tantes vegades com discs vulguem preparar.

2. EXPERIMENTS I RESULTATS

En aquests treball s'han realitzat quatre experiments diferents per complir tots els objectius marcats al principi. Al primer experiment hem fet cultius dels bacteris patògens i el hem enfrontat amb discs de antibiòtics i amb discs de probiòtics per separat, per tal de comprovar si hi havia una diferència entre les mides dels halos generats per l'un i per l'altre. Al segon, hem fet un procediment similar al del primer però hem utilitzat discs de iogurt de dues classes, una amb bífidus i l'altra sense. Al tercer experiment, hem barrejat els patògens amb els iogurts i hem observat el cultiu al microscopi després d'un dia en incubació. Per últim, pel quart experiment hem cosembrat els bacteris patògens amb unes soques de probiòtics resistents i hi hem posat discs d'antibiòtics per comparar la mida dels halos amb

els diàmetres resultants del primer experiment. Els bacteris patògens i antibiòtics utilitzats són els mateixos per a totes les experiències del treball.

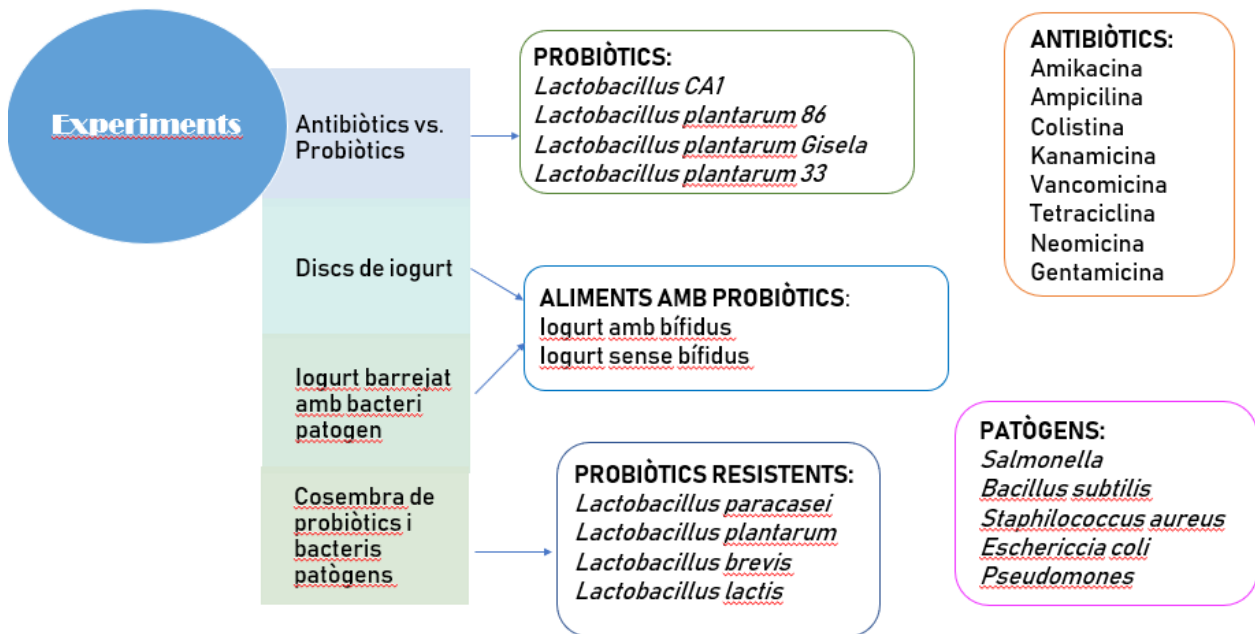


Figura 14. Representació esquemàtica dels experiments realitzats.

2.1. EXPERIMENT 1: ANTIBIÒTICS VS. PROBIÒTICS ENFRONTATS A PATÒGENS

2.1.1. Objectiu relacionat amb l'experiment

Realitzant aquest experiment volem comprovar si els probiòtics tenen un paper inhibidor similar, menor o major al dels antibiòtics:

Esbrinar quin és l'efecte inhibidor de probiòtics front el creixement de diferents espècies bacterianes patògenes i comparar-lo amb la inhibició produïda per antibiòtics.

2.1.2. Disseny experimental

1. Preparació de dilucions (5 microorganismes patògens i 4 probiòtics làctics):

Preparem cinc provetes amb solució de Ringer on farem la dilució dels cinc patògens a una concentració de 0,5 en la escala de McFarland. Repetim aquest procediment pels quatre bacteris làctics (probiòtics) fins a arribar a una concentració d'1,0 en l'escala de McFarland (9 tubs en total).

2. Sembra de bacteris patògens:

Amb una micro-pipeta, agafem 100 µl de una de les dilucions (just abans homogeneïtzada) i els sembrem a una placa de petri amb medi de cultiu TSA. Repetim aquest procés per aconseguir cinc plaques per cada microorganisme patogen.

3. Preparació del discs de els làctics:

La preparació es du a terme tal com s'explica a l'apartat de mètodes. Per a cada làctic hem de preparar deu discs i en total n'hem d'obtenir quaranta.

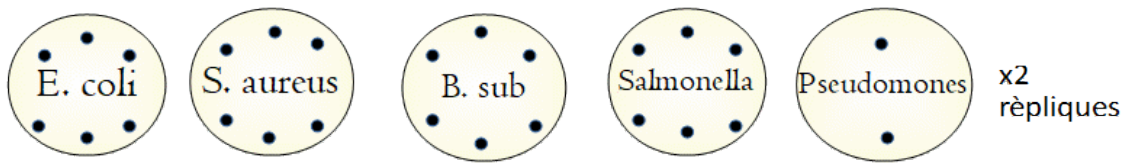
5. Elecció discs d'antibiòtics:

Consultem al *Manual de microbiologia clínica*, Edwin H. Editor-In-chief Lennette, (1980) quins antibiòtics són efectius davant dels nostres microorganismes patògens per decidir quins hi posarem a la placa de cada espècie.

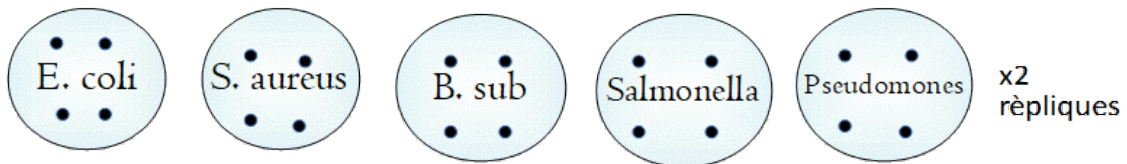
6. Col·locació dels discs:

Posem els discs a les plaques amb ajuda d'unes pinces estèrils que esterilitzarem cada vegada que dipositem un disc a la placa. La distribució es fa segons s'indica a la representació següent:

Patogens amb discs d'antibiòtics



Patogens amb discs de probiòtics



Controls

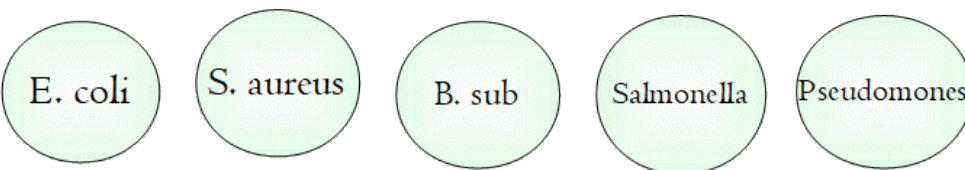


Figura 15. Representació gràfica de la quantitat de plaques emprades al primer experiment amb els seus respectius microorganismes i discs d'antibiòtics o probiòtics.

6. Incubació

Fiquem totes les plaques a una estufa a 37 °C durant 24 hores

7. Presa de resultats

Després de 24h hores a l'estufa, extraïem les plaques i mesurem els diàmetres de l'halo d'inhibició, si n'hi ha, amb un peu de rei tal com s'indica a l'apartat de mètodes.

2.1.3. Resultats

Per fer les lectures d'aquest experiment vam agafar les plaques després d'un dia en incubació i vam mesurar el diàmetre dels halos, si n'hi havia, amb un peu de rei.

	<i>Amikacin</i>	<i>Ampicilin</i>	<i>Tetracyclin</i>	<i>Colistin</i>	<i>Kanamycin</i>	<i>Neomycin</i>	<i>Vancomycin</i>	<i>Gentamicin</i>
<i>Pseudomona</i>	20,5 (S)	---	---	---	---	---	---	14 (I)
<i>E.choli</i>	15(I)	17(S)	19,5(S)	10(R)	14,5(I)	11(R)	---	---
<i>B. Sub</i>	23(S)	20(S)	16(I)	---	20(S)	17(S)	19(S)	---
<i>Salmonella</i>	5(R)	5,3(R)	3,7(R)	9(R)	0(R)	0(R)	---	---
<i>S. Aureus</i>	17(S)	23(S)	23(S)	—	16(I)	13,5(I)	11(R)	---

Taula 1. Mitjana dels diàmetres dels halos d'inhibició dels antibiòtic en mil·límetres. Les lletres entre parenteses signifiquen sensible, per la «S», resistent, per la «R» o intermedi, per la «I». Als annexos podeu trobar l'antibiograma que s'ha fet servir per determinar si els bacteris són resistents a l'antibiòtics als que han estat enfrontats. A algunes cel·les no hi ha cap valor degut a la selecció d'antibiòtics per a cada microorganisme explicada amb més detall a l'apartat de disseny experimental.

	CA1	L. Plant 86	L. Plant Gisela	L. Plant 33
<i>Pseudomona</i>	0	0	0	0
<i>E.choli</i>	4	6,5	7	5
<i>B. Sub</i>	5	5,5	5,5	6
<i>Salmonella</i>	0	8,5	7,5	5
<i>S. Aureus</i>	8	7	4,5	7

Taula 2. Mitjana dels diàmetres dels halos d'inhibició de els làctics en mil·límetre.

En general, els halos trobats a les plaques on hi havia discs d'antibiòtics tenen una mida significativament més gran que els trobats a les plaques on hi havia discs de probiòtics. Tot i això, el fet de trobar halos creats pels discs de probiòtics ens indica que sí que hi ha una competència entre ambdós microorganismes i que el probiòtic acaba inhibint, en cert grau, el creixement del patogen.

Si mirem casos més concrets, com el de la *Salmonella sp.*, els halos trobats a les plaques on l'havíem enfrontat amb els antibiòtics mostren que la *Salmonella sp.* és un dels bacteris que més resistències presenta. En alguns casos, fins i tot, amb aquest bacteri no es genera cap halo, mentre que a les plaques on havíem enfrontat la *Salmonella sp.* amb els discs de probiòtics hem trobat halos que en alguns casos eren majors que els produïts amb antibiòtics. El *Bacillus subtilis*, en canvi, té una alta sensibilitat a tots els antibiòtics testats, però contràriament, quan l'enfrontem amb els discs de probiòtics obtenim halos d'una mida molt més petita.

D'aquests resultats deduïm que, tal i com s'observa en la *Salmonella sp.*, els probiòtics poden ajudar en gran mesura a inhibir la proliferació de bacteris patògens resistents a antibiòtics. Altrament, si es vol inhibir el creixement d'un bacteri sensible als antibiòtics, com és el cas del *Bacillus subtilis*, seria preferible utilitzar l'antibiòtic adequat per combatre'l, atès que el probiòtic en aquests casos sembla que té una efectivitat menor.

2.2. EXPERIMENT 2: DISCS DE IOGURT ENFRONTATS A PATÒGENS

2.2.1. Objectiu relacionat amb l'experiment

Mitjançant la realització d'aquest experiment es vol analitzar el grau d'inhibició de bacteris patògens per part de probiòtics presents a un aliment com el iogurt:

Avaluar l'efecte de productes alimentaris que contenen probiòtics (iogurt) sobre el creixement de bacteris patògens.

2.2.2. Disseny experimental

1. Dilucions i sembra:

De nou, fem dilucions dels cinc microorganismes patògens a una concentració de 0,5 en l'escala de McFarland i sembrem cada microorganisme a dues plaques.

2. Discs amb aliment probiòtic:

Preparem els discs de iogurt amb bífidus i sense. Amb ajut d'unes pinces amarem un disc estèril a l'aliment i el col·loquem a una de les plaques. Hem d'acabar obtenint dues plaques per cada microorganisme, una amb dos discs del iogurt amb bífidus i l'altre amb dos del iogurt sense ells.

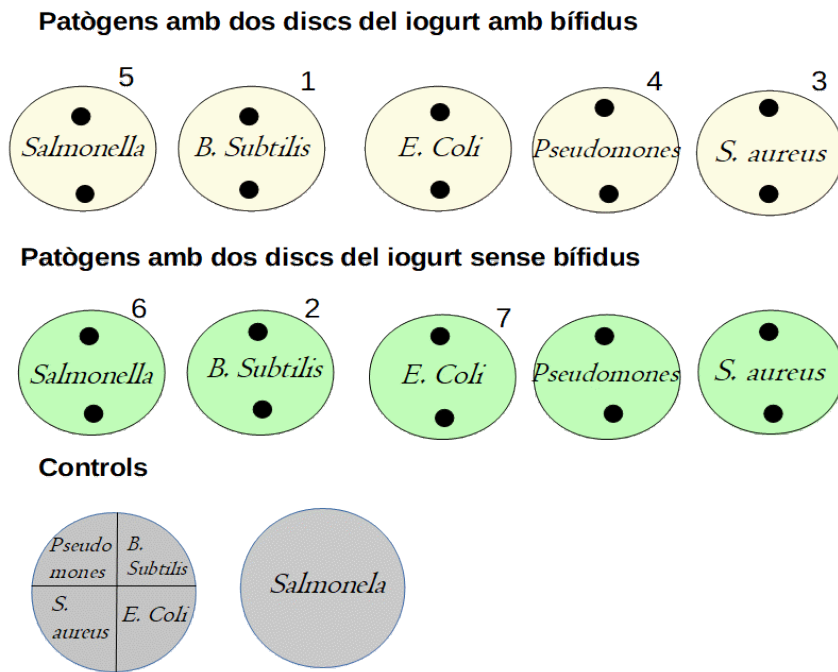


Figura 16. Representació gràfica de les plaques emprades al segon experiment.

3. Incubació

Incubem a l'estufa a 37° durant 24h i quan hagin passat, observem si n'hi ha halo d'inhibició o no.

4. Tinció de gram:

Després de veure l'aspecte de les plaques un cop incubades, fem tincions de gram de la zona propera al disc on es pot observar una «cosa semblant» a un halo d'inhibició i d'alguna zona llunyana a aquest halo. En total, 10 portaobjectes (2 per cada microorganisme, cadascun amb un disc de iogurt diferent), fem la tinció de gram i observem al microscopi.

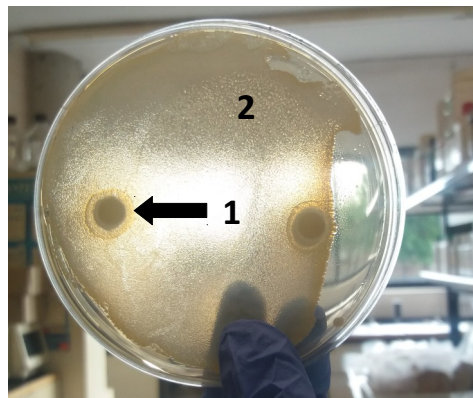


Figura 17. Placa de petri amb un patogen sembrat i dos discs de iogurt sense bífidus els microorganismes del qual han generat aquesta mena d'halos que s'observa a la imatge. El nombre 1 senyala la zona propera a l'halo i el nombre 2, la zona independent de l'halo.

2.2.3. Resultats

Al cap d'un dia a l'estufa, a les plaques on havíem enfrontat el patogen amb el iogurt amb probiòtic podíem observar un halo de mida reduïda i translúcid. En comparació amb els halos creats pels antibiòtics no era un halo net.

Per fer les interpretacions, vam agafar de cada placa una mostra no pertanyent a cap colònia del halo i una altra pertanyent a l'halo i les vam tenyir amb tinció de Gram per mirar-les al microscopi.

A continuació es mostra una selecció d'imatges dels resultats més destacats, que es corresponen a les plaques numerades a la figura 15:

1. *Bacillus subtilis* amb discs de iogurt amb bífidus (corresponent a la placa 1 de la figura 15):

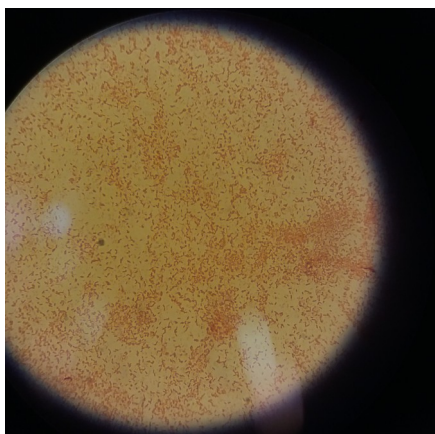


Figura 18. Zona independent de l'halo (1)

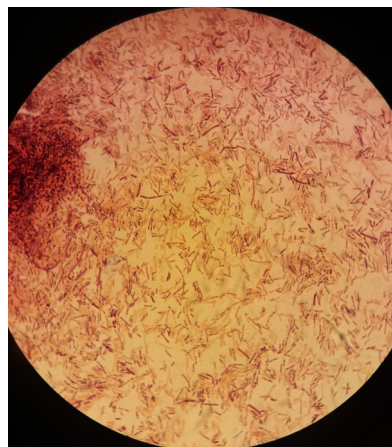


Figura 19. Zona de l'halo (1)

A la figura 18, on es veu una mostra agafada d'una zona de la placa on el patogen no havia estat en contacte amb el disc de iogurt, hi podem observar que només està present el bacteri *Bacillus subtilis*. En canvi, a la figura 19, corresponent a una mostra agafada d'una zona de l'halo, continuem tenint present el bacteri patogen però a més a més observem un altre tipus de microorganisme el qual deu ser propi del iogurt amb bífidus. Així doncs, hem comprovat que a l'halo que vam veure a la placa mare havia presència de dos tipus microorganismes, el patogen i el probiòtic.

2. *Bacillus subtilis* amb discs de iogurt sense bífidus (corresponent a la placa 2 de la figura 16):

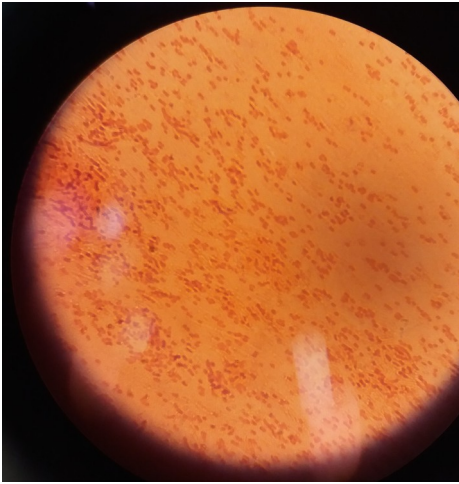


Figura 20. Zona independent de l'halo (2)

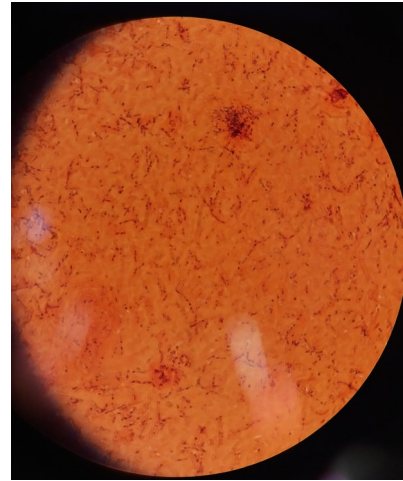


Figura 21. Zona de l'halo (2)

En aquest cas, a les plaques on havíem sembrat el *Bacillus subtilis* i hi havíem col·locat els discs de iogurt sense bífidus, continuem veient que el bacteri patògen és inhibit en gran mesura pels probiòtics presents al iogurt i no sembla haver una gran diferència entre l'efecte inhibidor dels bacteris presents al iogurt amb bífidus amb els presents al iogurt sense ells.

3. *Salmonella* amb discs de iogurt amb bífidus i sense (plaques 5 i 6 de la figura 16 respectivament):

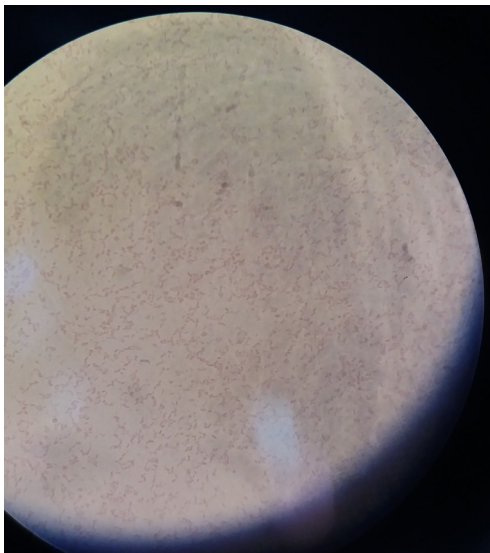


Figura 22. Zona independent de l'halo (5)

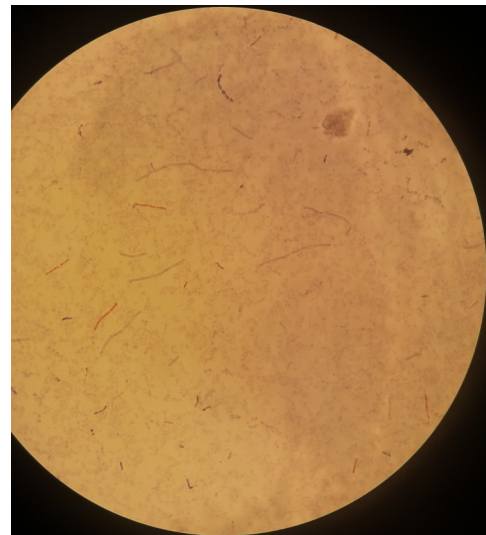


Figura 23. Zona de l'halo (5)

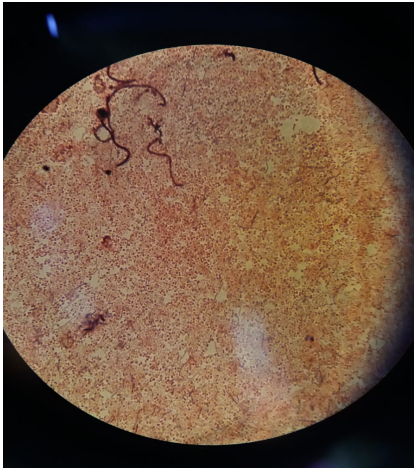


Figura 24. Zona independent de l'halo (6)

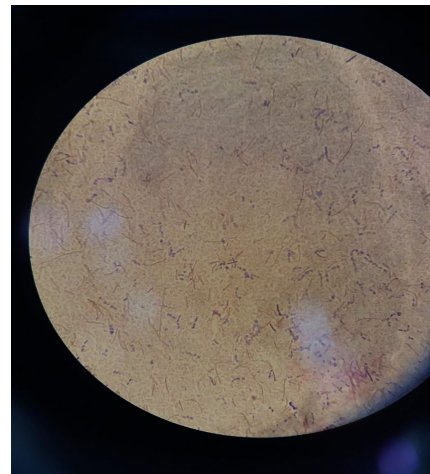


Figura 25. Zona de l'halo (6)

En el cas de la *Salmonella* també hem comprovat que els probiòtics presents als iogurts, tant als que tenen bífidus com els que no, inhibeixen el creixement del bacteri patogen. No sembla haver-hi una diferència molt gran entre l'efecte inhibitor que han generat els microorganismes del iogurt amb bífidus i els que han generat els del iogurt amb bífidus per tant, podem dir que ambdós iogurts tenen un efecte inhibitor semblant front la *Salmonella*.

4. *Escherichia coli* amb discs de iogurt sense bífidus (placa 7 de la figura 16):

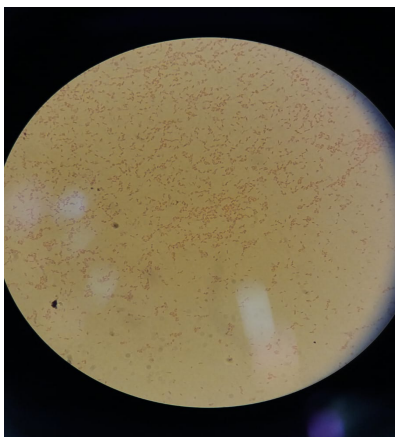


Figura 26. Zona independent de l'halo (7)

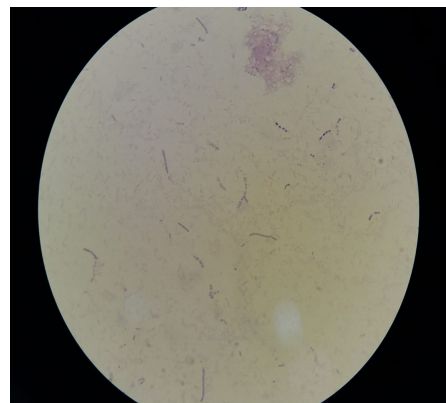


Figura 27. Zona de l'halo (7)

Per últim, a les figures 26 i 27 comprovem novament que els probiòtics present al iogurt sense bífidus inhibeixen exitosament el creixement del bacteri patogen, en aquest cas l'*Escherichia coli*.

5. *Staphilococcus aureus* i *Pseudomonas* amb discs del iogurt amb bífidus (plaques corresponents als nombres 3 i 4 de la figura 16 respectivament):

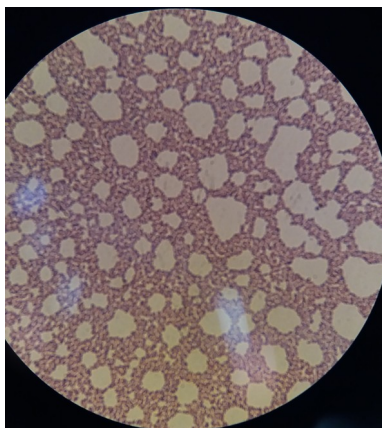


Figura 28. Zona independent de l'halo. (3)

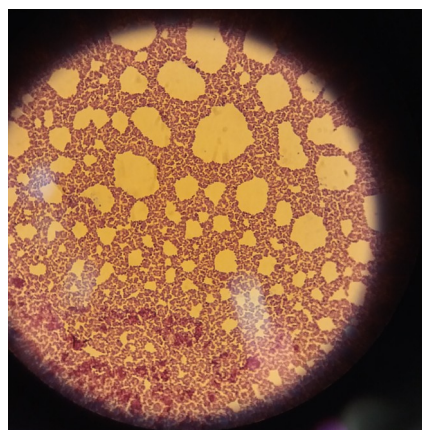


Figura 29. Zona de l'halo. (3)

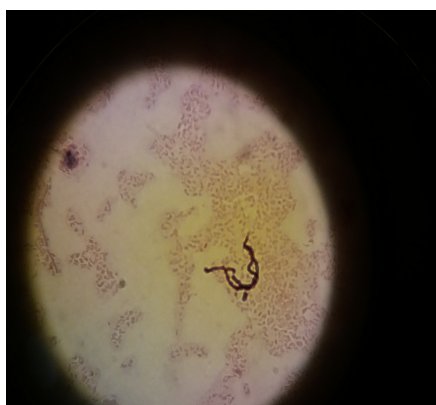


Figura 30. Zona independent de l'halo. (4)

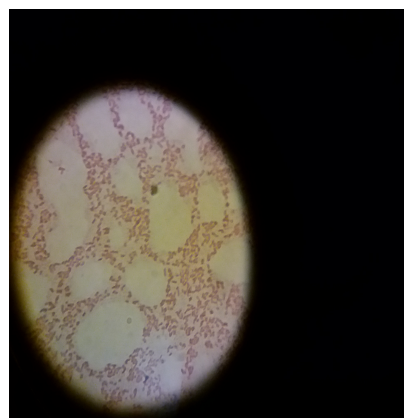


Figura 31. Zona de l'halo. (4)

Tant amb l'*Staphilococcus aureus* com amb les *Pseudomones* no hem obtingut cap indicati d'una competència exitosa per part del probiòtic. A les quatre fotografies prèvies veiem que tenim l'*Staphilococcus aureus* en el cas de les figures 28 i 29, i les *Pseudomones* únicament en el cas de les figures 30 i 31, tant a les mostres llunyanes als halos com les pertanyents a aquests. A l'experiment previ on vam enfrontar les *Pseudomones* amb els discs de probiòtics (taula 2) no vam veure cap halo i això confirma que, efectivament, els probiòtics no tenen un efecte inhibidor contra les *Pseudomones*. En canvi, al resultats de l'*Staphilococcus aureus* amb probiòtics, sí que vam obtenir halos d'inhibició, però sembla ser que aquest bacteri no és inhibit pels probiòtics presents al iogurt.

2.3. EXPERIMENT 3: IOGURT BARREJAT AMB EL BACTERI PATOGEN

2.3.1. Objectiu relacionat amb l'experiment

Mitjançant aquesta experiència volem esbrinar si un bacteri patogen en estar barrejat amb un aliment amb probiòtics és inhibit per aquests:

Avaluar l'efecte de productes alimentaris (iogurt) sobre el creixement d'altres bacteris patògens.

2.3.2. Disseny experimental

1. Preparació de barreges de iogurt amb bacteris patògens:

Primer, introduïm 5ml del iogurt amb bífidus a 5 tubs d'assaig i 5ml del iogurt natural a uns altres 5 tubs d'assaig. En total, 10 tubs d'assaig. Després, afegim a aquests tubs 5ml d'una dilució d'un dels bacteris patògens a una concentració de 0,5 en l'escala de McFarland. Ens han de quedar 2 tubs d'assaig per cada un dels 5 patògens, un barrejat amb iogurt amb bífidus i l'altre amb iogurt sense bífidus.

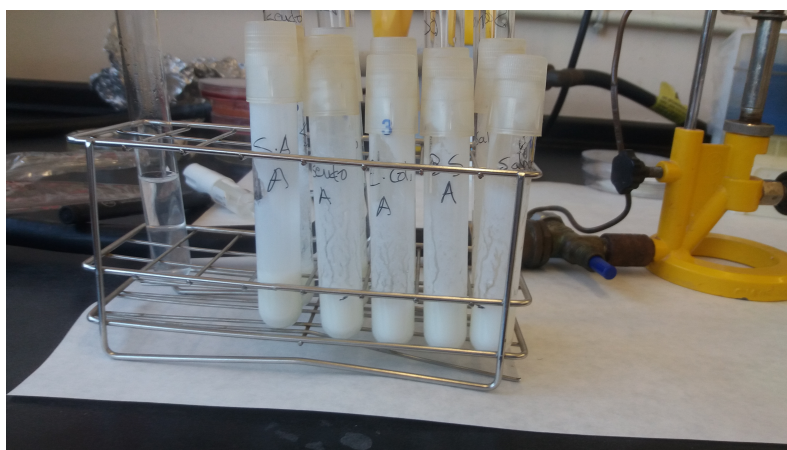
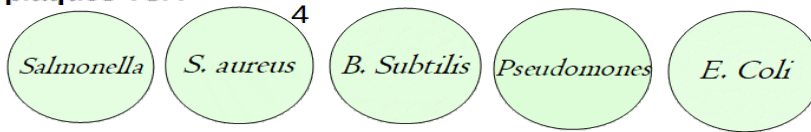


Figura 32. Fotografia dels tubs d'assaig on vam realitzar les barreges del microorganisme patògen amb el iogurt. Es pot observar els cinc tubs on vam barrejar el iogurt amb bífidus (representat amb la lletra A) amb cadascun dels cinc patògens. Els tubs de les barreges de patògens amb iogurt sense bífidus no es pot observar a la imatge.

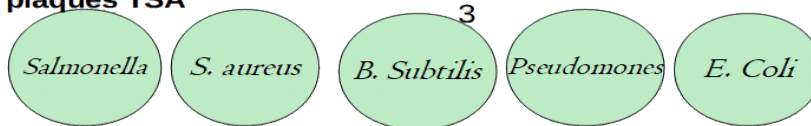
2. Sembra:

Sembrem les dissolucions, cada dilució a dues plaques, una de TSA i l'altre de MRS (20 plaques). Pels controls, sembrem amb un hisop els cinc bacteris patògens tal com es mostra a la figura 31. Vam sembrar les barreges a dos medis diferents per comprovar a quin dels dos es produïa una inhibició major per part dels probiòtics, és a dir, quin medi era més favorable pel seu creixement.

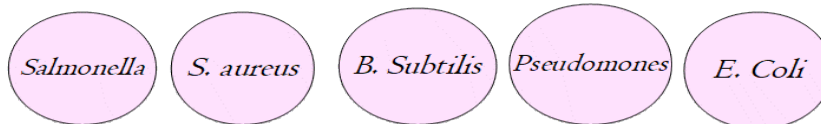
Patògens amb iogurt amb bífidus sembrats a plaques TSA



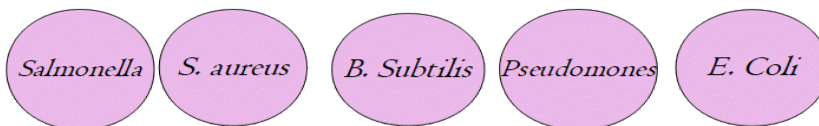
Patògens amb iogurt sense bífidus sembrats a plaques TSA



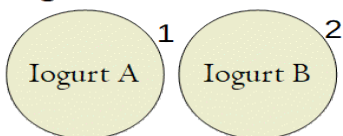
Patògens amb iogurt amb bífidus sembrats a plaques MRS



Patògens amb iogurt sense bífidus sembrats a plaques MRS



Iogurts sembrats a TSA



Iogurts sembrats a MRS

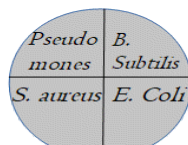


Figura 33. Representació gràfica del tercer experiment. El iogurt amb bífidus es representat amb la lletra A i el iogurt sense bífidus amb la lletra B.

3. Incubació:

Incubem les plaques a l'estufa a 37°C durant 24h i posteriorment les observem.

4. Tinció de gram:

Després de veure l'aspecte de les plaques un cop incubades, decidim quines colònies tenyim i observem al microscopi.

2.3.3. Resultats

Quan vam extreure les plaques de l'estufa, vam veure que totes les que eren provinents de les barreges tenien un aspecte similar, malgrat en el medi MRS el creixement va ser molt menor. Des totes maneres, si comparem l'aspecte d'aquestes amb el de les colònies presents a les plaques control dels patògens observem una clara diferència. D'entre totes les plaques, vam escollir aquelles colònies que semblaven diferents entre elles i vam procedir a fer la tinció de gram per observar-les al microscopi.

A continuació es presenten les imatges de la placa on havíem sembrat el iogurt amb bífidus sense cap patogen (corresponent al número 1 de la figura 33), una altra amb iogurt sense (corresponent al numero 2 de la figura 33):



Figura 34. Iogurt amb bífidus
(sense bacteri patogen)

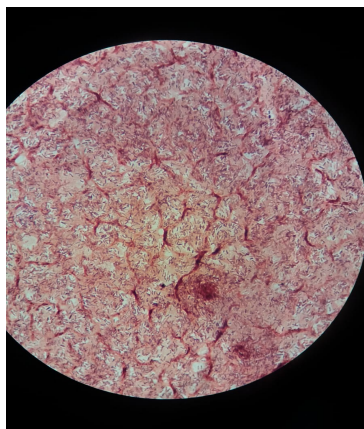


Figura 35. Colònia 1

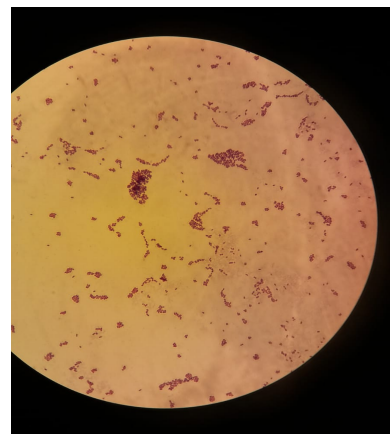


Figura 36. Colònia 2

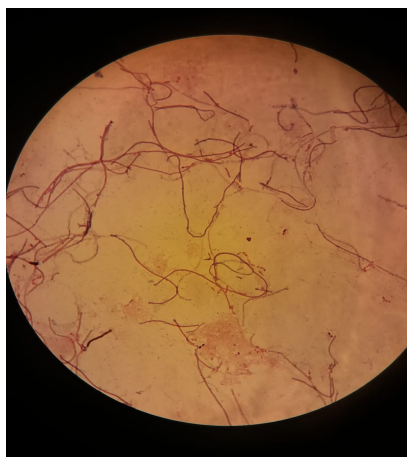


Figura 37. Colònia 3

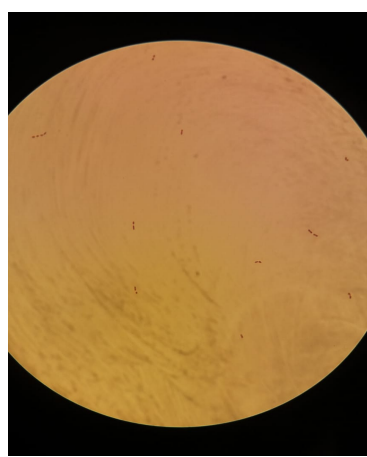


Figura 38. Colònia 4

Aquestes colònies que veiem a les fotografies pertanyen a la placa de la figura 34. Tots aquests microorganismes són presents al iogurt amb bífidus.

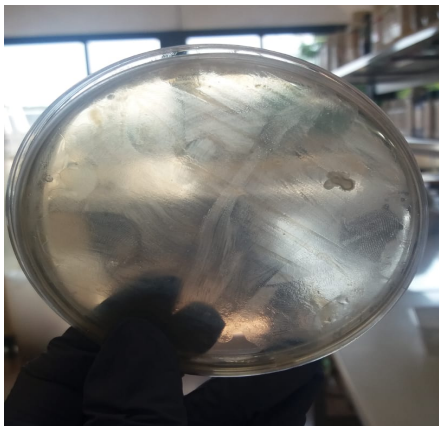


Figura 39. logurt sense bífidus

(sense bacteri patogen)

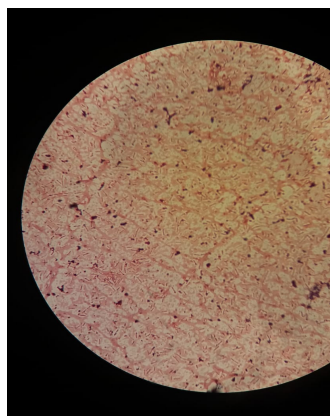


Figura 40. Colònia 1

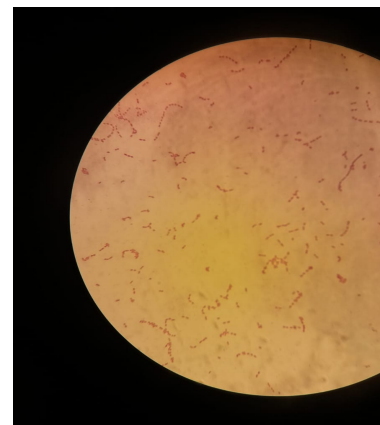


Figura 41. Colònia 2

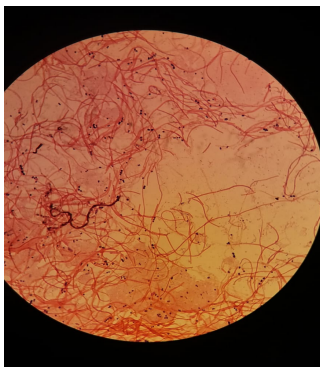


Figura 42. Colònia 3

Aquestes colònies pertanyen a la placa de la figura 39.

A continuació es mostren imatges de la placa on vam sembrar el *Bacillus subtilis* barrejat amb el iogurt sense bífidus (placa corresponent a la número 3 de la figura 33):

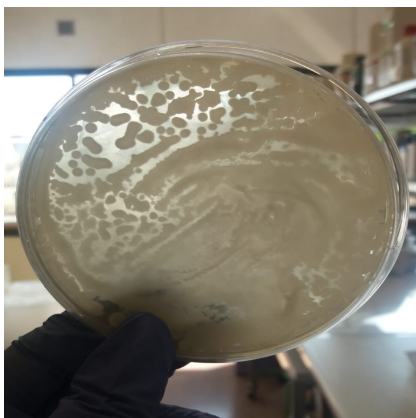


Figura 43. *Bacillus Subtilis* + logurt sense bífidus

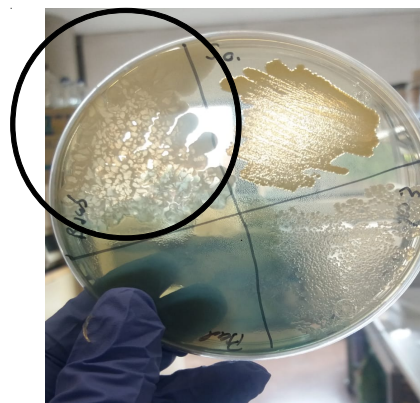


Figura 44. *Bacillus subtilis* (encerclat)

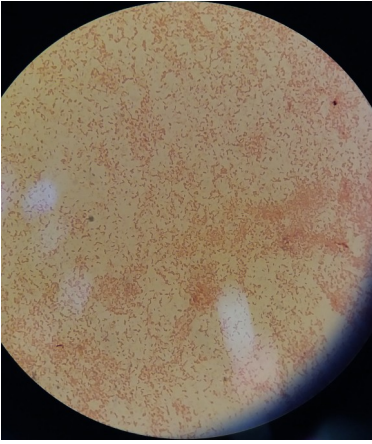


Figura 45. *Bacillus subtilis* al microscopi

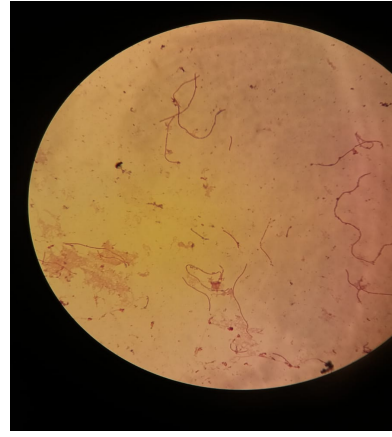


Figura 46. *Bacillus subtilis* + iogurt sense bifidus al microscopi

A la figura 43 veiem l'aspecte de la placa on vam cosembrar el *Bacillus subtilis* amb el iogurt sense bífidus i a la figura 44 veiem l'aspecte del *Bacillus subtilis* quan creix sense un altre microorganisme competint. A les següents dues imatges podem comparar el creixement del *Bacillus subtilis* al microscopi quan creix aïllat i quan competeix amb un altre microorganisme. En aquests cas veiem que quasi no hi ha presència del bacteri patogen a la figura 44, el que vol dir que la inhibició per part dels bacteris probiòtics ha estat efectiva.

A continuació es mostren imatges de la placa on vam sembrar el *Staphylococcus aureus* barrejat amb el iogurt amb bífidus (placa corresponent a la número 4 de la figura 33):

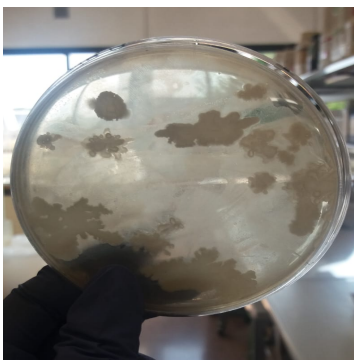


Figura 47. *S. aureus* + iogurt amb bífidus

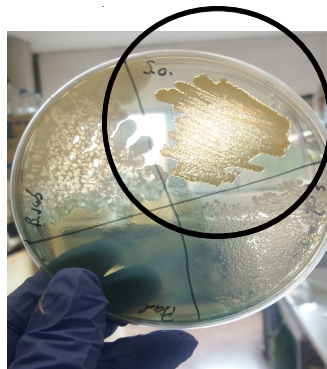


Figura 48. *S. aureus* (encerclat)

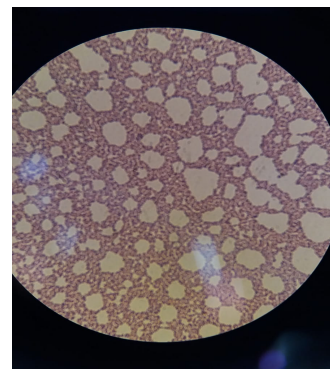


Figura 49. *S. aureus* al microscopi

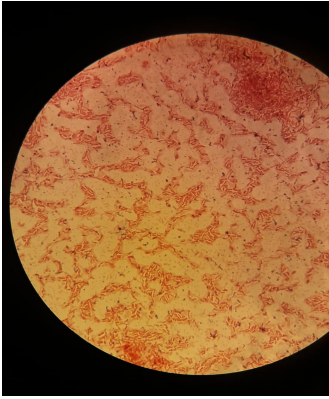


Figura 50. *S. aureus* + iogurt amb *bifidus* al microscopi

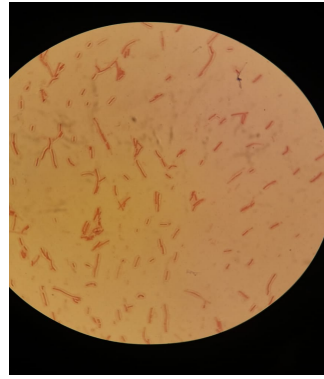


Figura 51. *S. aureus* + iogurt amb *bifidus* al microscopi

Per últim, una altra vegada veiem que els microorganismes probiòtics han inhibit el creixement del bacteri patògen. A la figura 48 veiem l'*Staphylococcus aureus* observat al microscopi i a les figures 50 i 51 veiem dues colònies trobades a la placa numero de la figura 46.

En aquest experiment hem comprovat que en estar barrejats, la inhibició per part dels probiòtics presents als iogurts, tant amb *bifidus* com sense, és més probable (es dona a totes les plaques) i major que quan només els enfontavem posant el iogurt en un disc.

2.4. COSEMBRA DE PROBIÒTICS I BACTERIS PATÒGENS

2.4.1. Objectiu relacionat amb l'experiment

Amb aquest experiment volem comprovar si els bacteris patògens en conviure amb soques de probiòtics, són inhibits més pels antibiòtics que quan no ho estan o si, al haver utilitzat soques de bacteris làctics (probiòtics) resistents, la inhibició és menor degut a la transmissió de gens de resistència per parasexualitat (conjugació):

Analitzar una possible relació entre els probiòtics i la resistència bacteriana als antibiòtics.

2.4.2. Disseny experimental

1. Preparació de dilucions:

Agafem 1 ml de la solució mare del microorganisme i els dipositem a un tub d'assaig. Després hi afegim solució de Ringer fins a aconseguir una concentració d'1 en l'escala McFarland. Aquest procediment

s'ha de repetir pels patògens i pels probiòtics (bacteris làctics). En total, ens han de quedar 5 tubs per cada patògen i uns altres 4 per cada làctic.

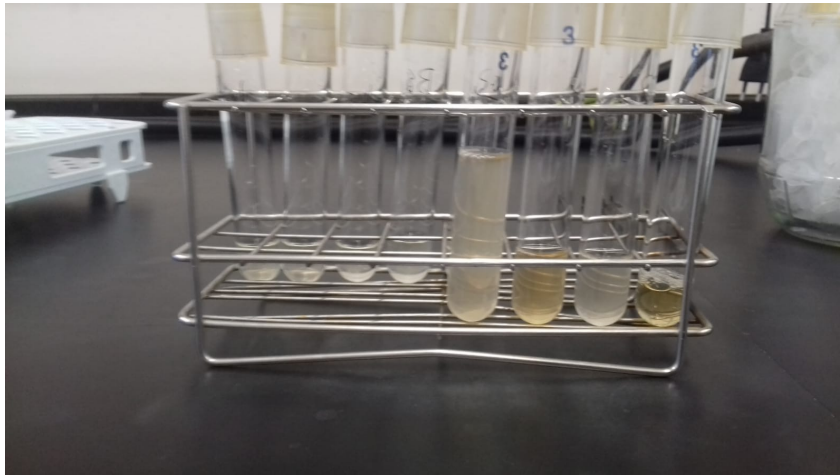


Figura 52. Dilucions a tubs d'assaig de els quatre bacteris patògens i els quatre bacteris làctics (probiòtics).

2. Barreja de microorganismes:

Agafem 29 tubs d'Eppendorf estèrils a on col·locarem 1 ml de cadascun dels microorganismes amb una micro-pipeta. Primer passem 1 ml de cada microorganisme patògen a un tub, després fem el mateix pels quatre probiòtics (cinc tubs pels cinc patògens i quatre tubs pels quatre làctics). Per últim, hem de diluir tots els patògens amb totes els làctics; als vint tubs restants, dipositem cada bacteri patògen quatre vegades, és a dir, hem de tenir 4 tubs per a cada patògen i, a aquests mateixos tubs hi dipositem els quatre làctics a cada patògen (i.e. si tenim quatre tubs amb el patògen X, afegim a cadascun d'aquests tubs els làctics 1, 2 3 i 4).

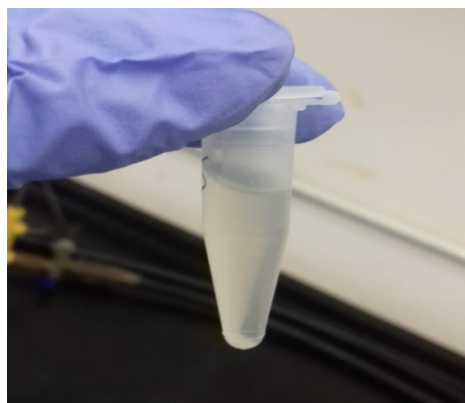


Figura 53. Dilució a un tub d'Eppendorf.

3. Sembra de barreges.

Un cop ja tenim totes les barreges las tubs d'Eppendorf, sembrem 100 μ l de les dilucions de cada tub a quatre plaques amb un medi TSA. Com emparem els vuit antibiòtics especificats als materials,

utilitzarem dues plaques, amb la mateixa dilució sembrada, i hi posarem uns quatre antibiòtics a la primera placa i a l'altra, els quatre antibiòtics restants. Farem dues rèpliques, així doncs sembrarem el contingut d'un mateix tub a quatre plaques. Aquest procediment es repetirà per les 29 dilucions preparades prèviament.

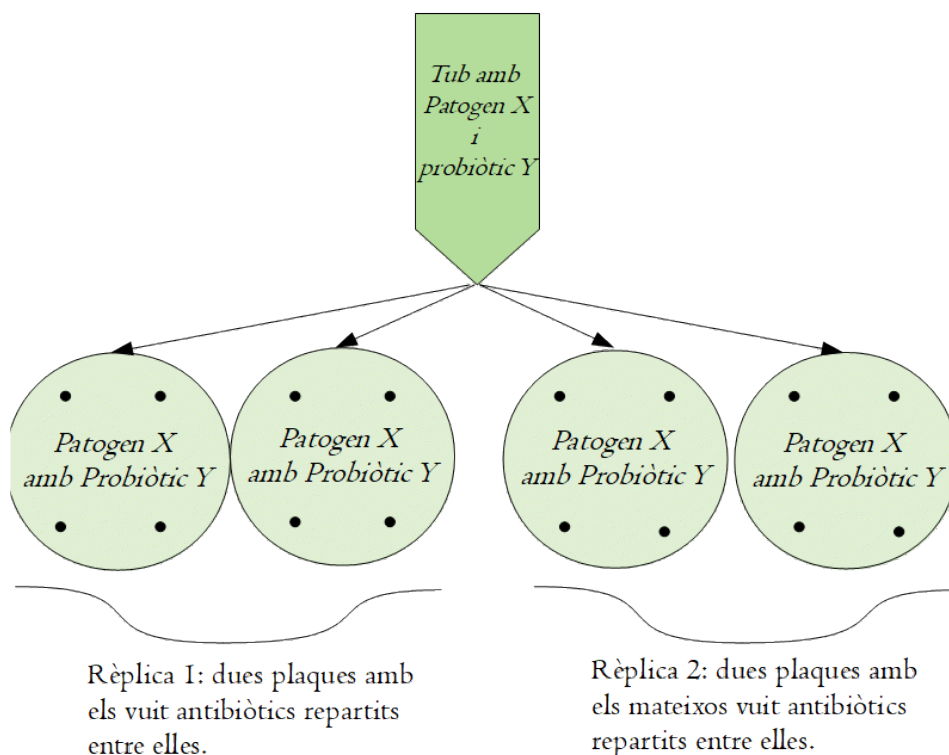


Figura 54. Representació de la realització de la sembra de l'experiment 4. Vam repetir aquest procés pels 29 tubs d'Eppendorf cada tub. S'ha emprat com a exemple un tub amb dos microorganismes, però aquest mateix procediment es va realitzar igual per a cadascun dels tubs.

3. Col·locació de discs d'antibiòtics:

Els discs d'antibiòtics emprats en aquest quart experiment són els mateixos que vam emprar a l'experiment 1. Quan ja hem sembrat totes les plaques, amb l'ajut d'unes pinces estèrils, agafem el primer disc d'antibiòtic i el col·loquem a una de les plaques fins a haver-ne col·locat tots. Hem de recordar esterilitzar les pinces sempre que col·loquem un disc, abans i després.

Patògens cosembrats amb les làctiques i enfrontats amb antibiòtics (dues rèpliques i dues plaques cada rèplica)

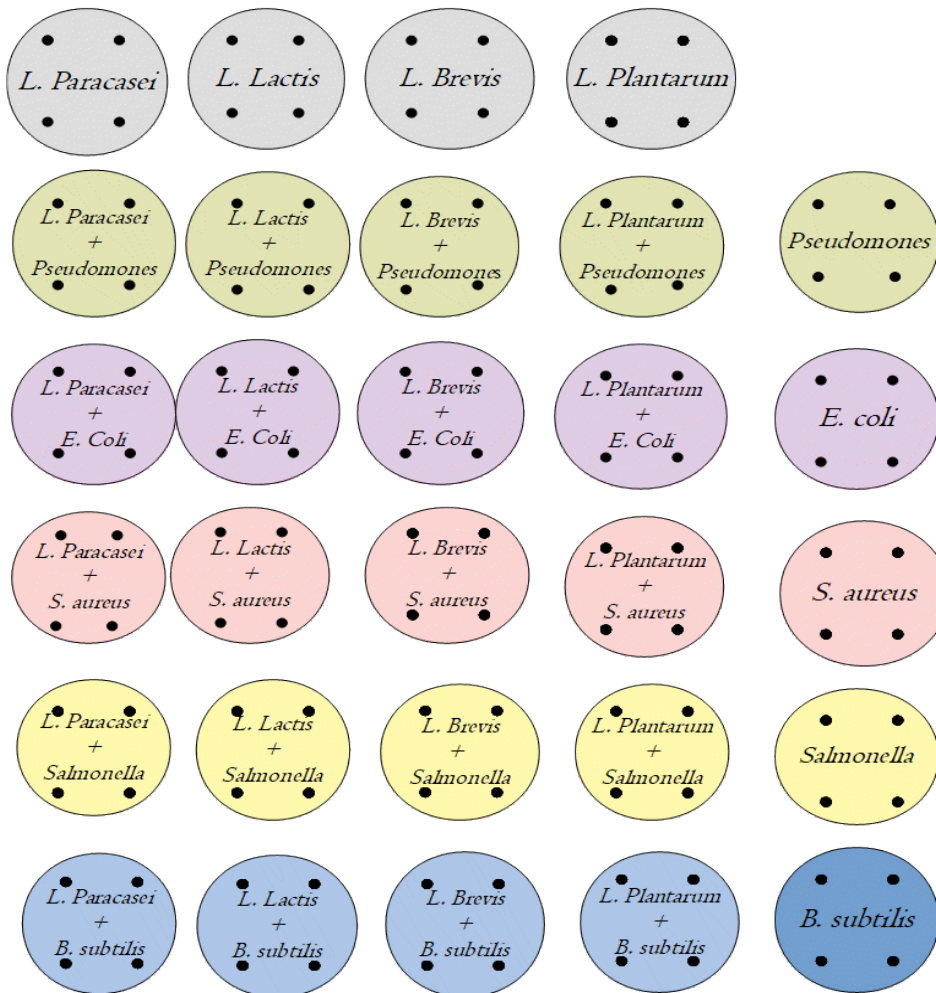


Figura 55. Representació gràfica de les plaques emprades per realitzar l'experiment 4 amb els seus respectius microorganismes.

2.4.3. Resultats

Al veure les plaques després d'un dia en incubació, el primer del que ens vam adonar va ser que a les plaques on havíem sembrat exclusivament probiòtics, no vam trobar cap halo a excepció de dos casos. A més, en algunes plaques on hi havia dos microorganismes cosembrats (patogen + probiòtic), a vegades trobàvem dos halos produïts per un mateix antibiòtic. L'halo més gran indica el límit del creixement del bacteri patogen, perquè sabem que és menys resistent que el probiòtic i per tant, l'halo més petit marcaria el límit del creixement del probiòtic. Així doncs, en aquest cas, i a diferència de les

plaques on només hi ha probiòtic, sí que trobem un petit halo d'inhibició pels bacteris làctics. Això ho atribuïm al fet d'estar cosembrats amb el microorganismes patògens, la qual cosa els pot fer més sensibles a l'antibiòtic.

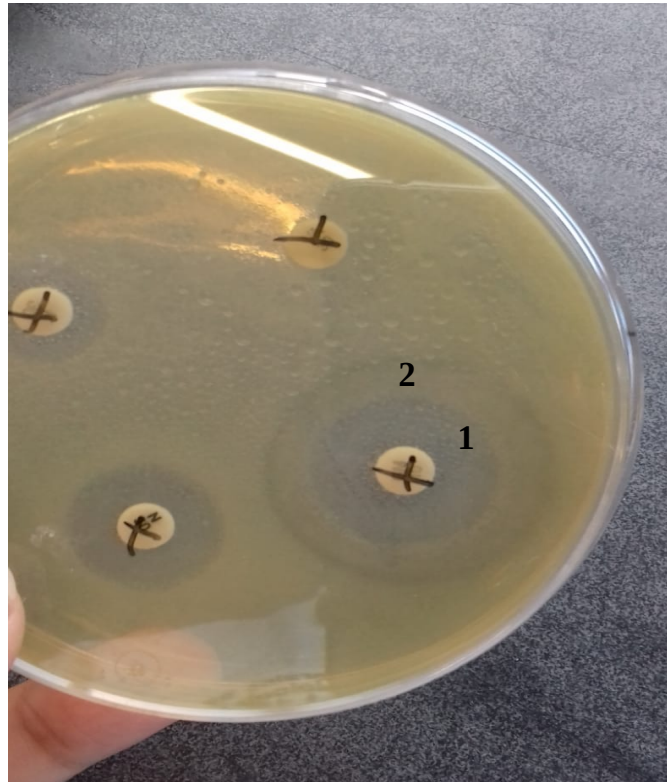


Figura 56. Placa on hi ha un bacteri patogen amb un probiòtic cosembrats i exposats a quatre discs d'antibiòtics. El disc col·locat a l'esquina inferior dreta a generat dos halos d'inhibició els quals podem diferenciar en zona més neta i de mida més reduïda assenyalada amb el número 1 i un altra de diferent aspecte a la primera assenyalada amb el número 2.

A continuació es presenten les taules i els seus gràfics respectius amb les mitjanes dels halos de les dues rèpliques del bacteri patogen i els bacteris làctics (probiòtics) aïllats:

	Amikacina	Ampicilina	Tetraciclina	Colistina	Kanamicina	Neomicina	Vancomicina	Gentamicina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20,75	12	12	7,5	9,5	10	8,5	9,5
<i>Escherichia coli</i>	15	20,5	20	11,5	15	14	0	18
<i>Bacillus subtilis</i>	22,5	20	14,5	9,5	18	15	17	0
<i>Salmonella sp.</i>	10,5	11	6,5	9,5	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,5	24,5	22	8	17	16,5	15	0

Taula 3. Mitjana de les dues rèpliques dels halos produïts per cada antibiòtic respecte cada barreja del patogen sembrat aïllat.

Patògens amb discs antibiòtics

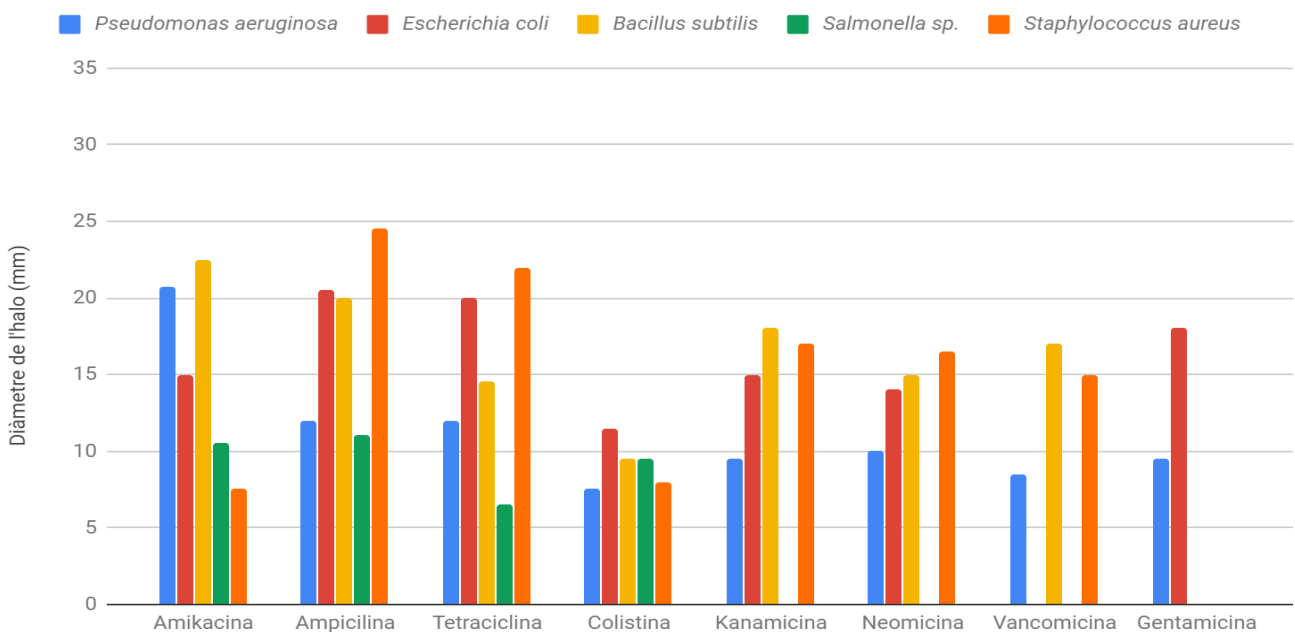


Figura 57. Representació gràfica dels valors dels halos de la taula 3 produïts pels vuit antibiòtics respecte de cada bacteri patogen.

En el diagrama de barres observem que els primers quatre antibiòtics (amikacina, ampicilina, tetraciclina i colistina) tots els patògens son inhibits pels antibiòtics en major o menor grau. Contràriament, pel que fa a la resta d'antibiòtics trobem certes resistències, sobretot en el cas de la vancomicina i la gentamicina i especialment per part de la *Salmonella*.

	Amikacina	Ampicilina	Tetraciclina	Colistina	Kanamicina	Neomicina	Vancomicina	Gentamicina
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	0	0	0	0	0	17	11
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus lactis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

Taula 4. Mitjana de les dues rèpliques dels halos produïts pels antibiòtics respecte cada bacteri probiòtic sembrat aïllat.

Probiòtics amb discs d'antibiòtics

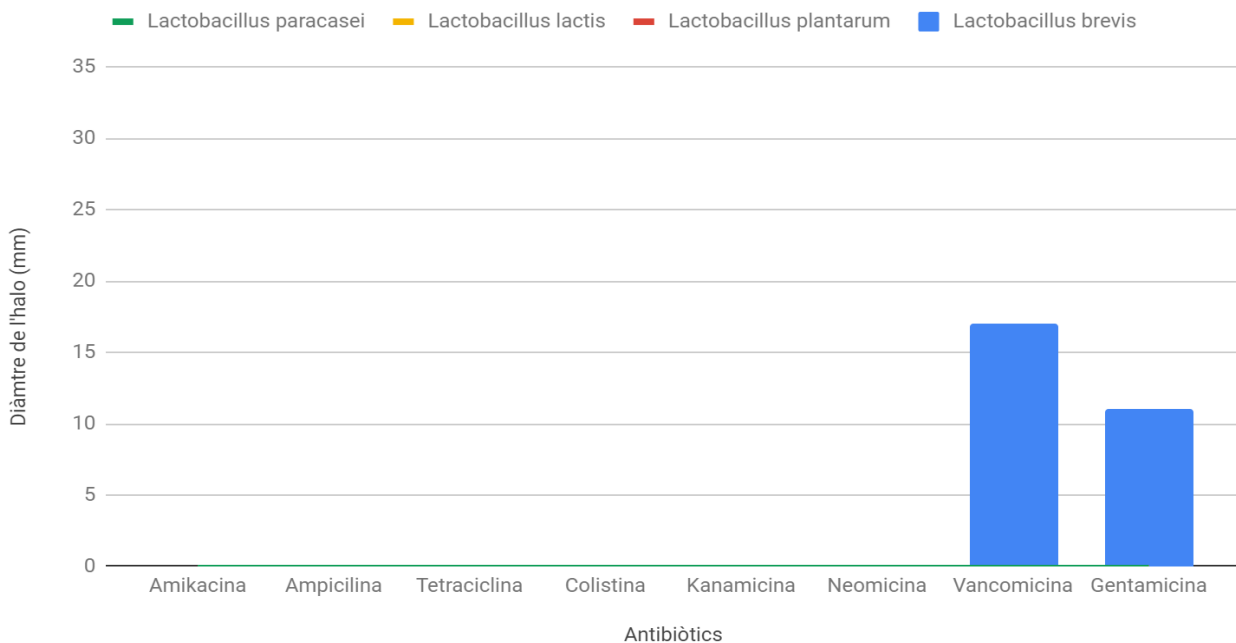


Figura 58. Representació gràfica dels valors dels halos de la taula 4 produïts pels vuit antibiòtics respecte de cada bacteri probiòtic-

En el gràfic podem observar que gairebé totes les soques probiòtiques presenten resistència als antibiòtics emprats exceptuant dos casos: la vancomicina i la gentamicina en el cas del *Lactobacillus brevis*.

A continuació es mostren les taules amb les mitjanes de les rèpliques dels halos trobats a les plaques on havíem cosembrat ambdós microorganismes, patògen i probiòtic:

<i>Lactobacillus paracasei</i>	Amikacina	Ampicilina	Tetraciclina	Colistina	Kanamicina	Neomicina	Vancomicina	Gentamicina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	15	11	11	11	12	14	24/16
<i>Escherichia coli</i>	16	22	21	10	17	8 /17	0	16/13
<i>Bacillus subtilis</i>	29/13	19	17	0	21	28/14	29/14	28/16
<i>Salmonella sp.</i>	12	13	9	12	13	8	7	8,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	13	24	0	16	15	15	16

Taula 5. Mitjana dels halos produïts pels antibiòtics respecte cada bacteri patògen cosembrat amb el *Lactobacillus paracasei*.

Patògens + *Lactobacillus paracasei* amb discs d'antibiòtics

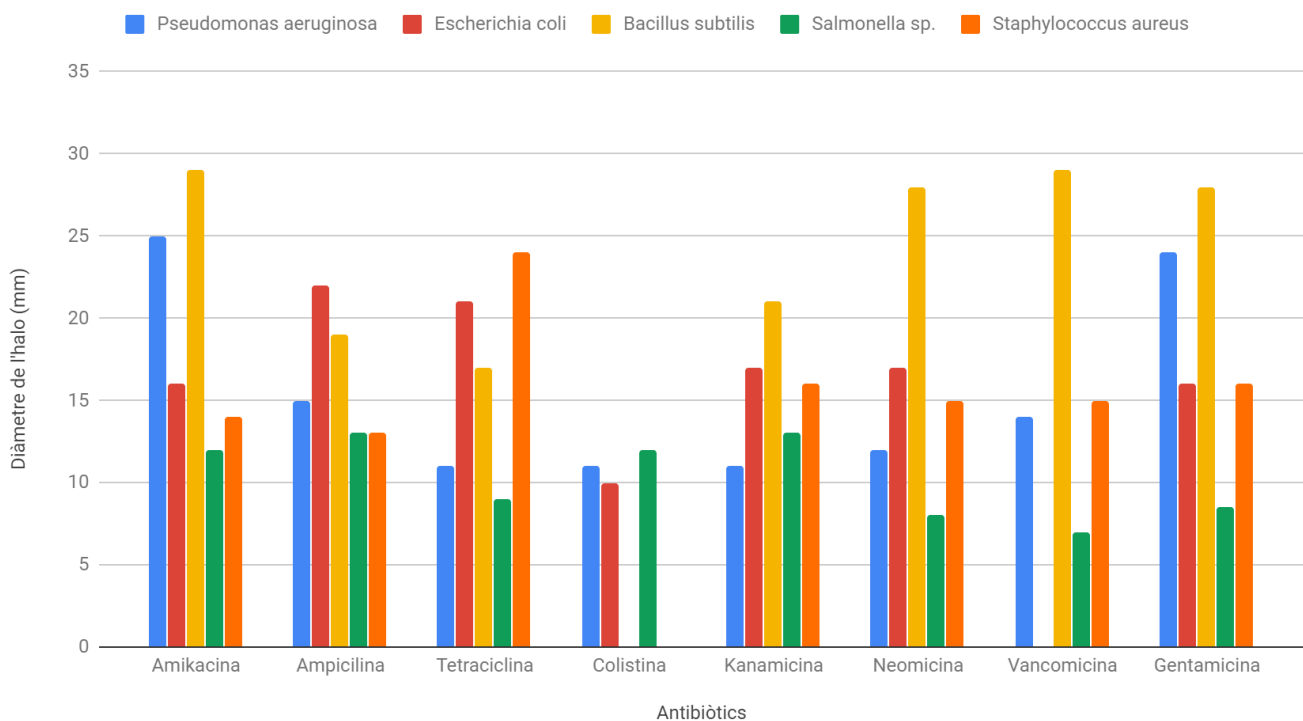


Figura 59. Representació gràfica de les mitjanes dels valors dels halos de la taula 5 produïts pels vuit antibiòtics respecte de cada bacteri patògen barrejat amb el *Lactobacillus paracasei*.

En aquest cas es mostra la gran majoria dels antibiòtics generen halos amb els cinc patògens i que només a la colistina i a la vancomicina s'observen resistències, concretament pel *Bacillus subtilis*, l'*Staphylococcus aureus* i l'*Escherichia coli*.

<i>Lactobacillus lactis</i>	Amikacina	Ampicilina	Tetraciclina	Colistina	Kanamicina	Neomicina	Vancomicina	Gentamicina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	13	12	11	11	12	14	25/17
<i>Escherichia coli</i>	18	22	19	10	17	9/16	0	16/13
<i>Bacillus subtilis</i>	24	19	11	0	21	28/14	29/14	28/16
<i>Salmonella sp.</i>	16	10	8	12	13	8	7	8,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	7	24	0	16	15	15	16

Taula 6. Mitjana dels halos produïts pels antibiòtics respecte cada bacteri patògen cosembrat amb el *Lactobacillus lactis*.

Patògens + *Lactobacillus lactis* amb antibiòtics

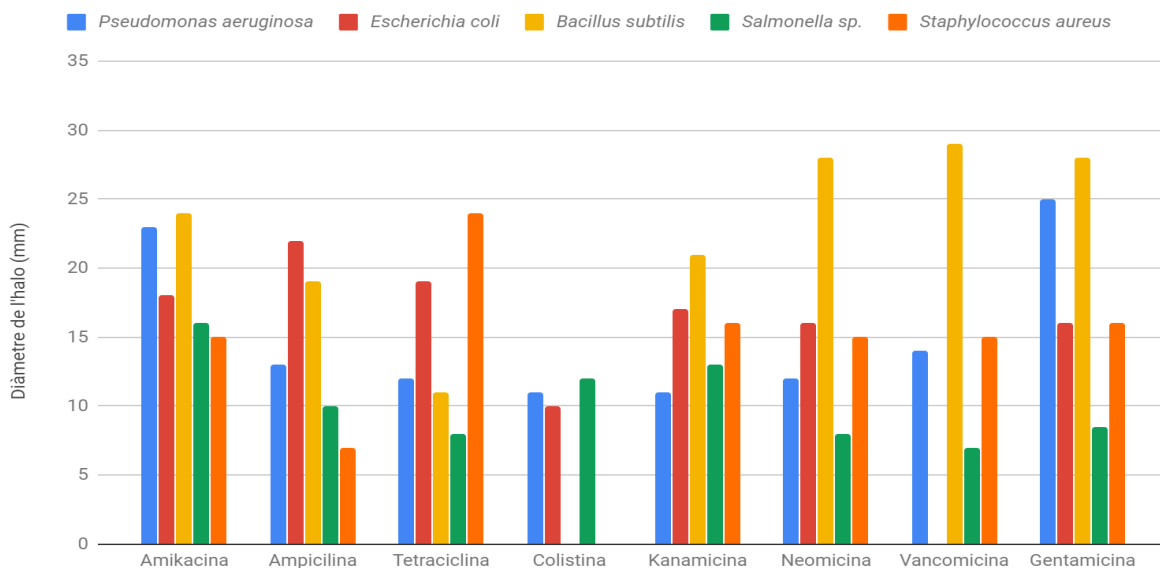


Figura 60. Representació gràfica de les mitjanes dels valors dels halos de la taula 6 produïts pels vuit antibiòtics respecte de cada bacteri patògen barrejat amb el *Lactobacillus lactis*.

Aquí es reproduïx pràcticament el mateix resultat mostrat a la figura 59, quan barrejàvem amb *Lactobacillus paracasei*, atès que tornen a aparèixer resistències front la colistina i la vancomicina per part dels mateixos bacteris patògens.

<i>Lactobacillus brevis</i>	Amikacina	Ampicilina	Tetraciclina	Colistina	Kanamicina	Neomicina	Vancomicina	Gentamicina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	12	16	11	8	21	0	23 /15
<i>Escherichia coli</i>	22	20	21	10	15,5	14	0	14/10
<i>Bacillus subtilis</i>	21 29	17	14	0	16/24	17/22	16/14	24/12
<i>Salmonella sp.</i>	14	8	9	9	13	21	0	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	7	24	0	18,5	14	14	14

Taula 7. Mitjana dels halos produïts pels antibiòtics respecte cada bacteri patògen cosembrat amb el *Lactobacillus brevis*.

Patògens + *Lactobacillus brevis* amb antibiòtics

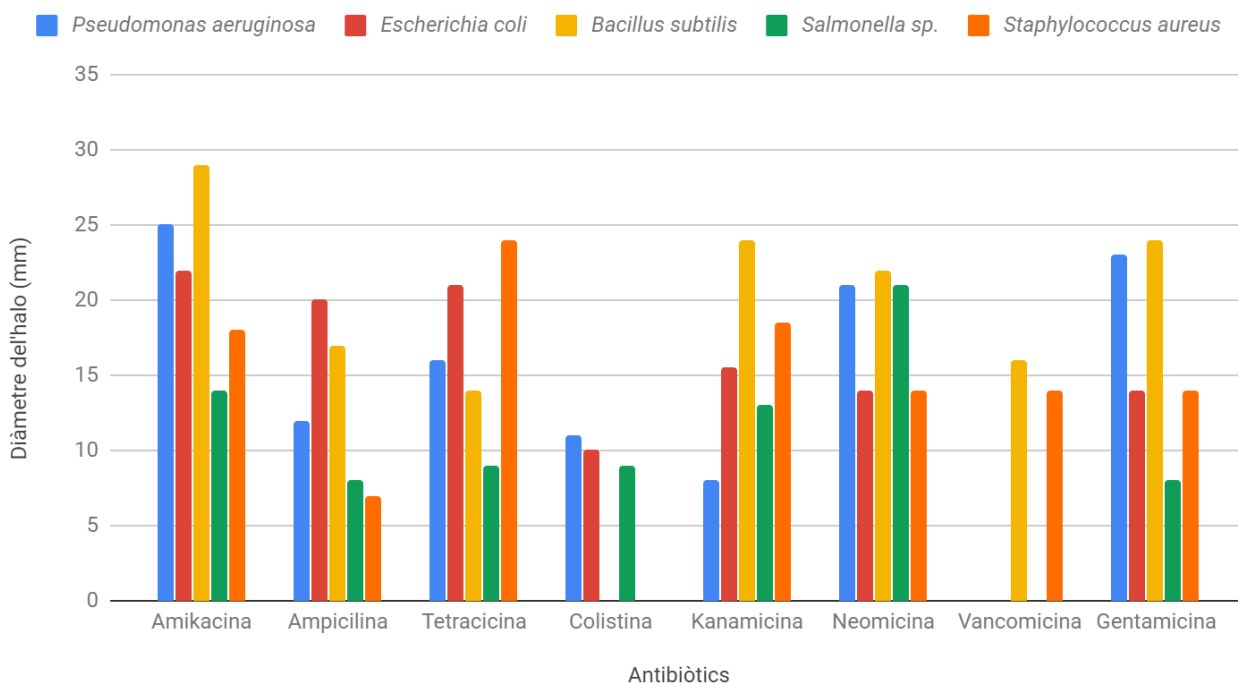


Figura 61. Representació gràfica de les mitjanes dels valors dels halos de la taula 7 produïts pels vuit antibiòtics respecte de cada bacteri patògen barrejat amb el *Lactobacillus brevis*.

En el diagrama ara observem que novament els antibiòtics als quals es presenta resistència son la colistina i la vancomicina. De totes maneres, en aquest cas els bacteris resistents han augmentat, atès que ara també presenten resistència a la vancomicina les *Pseudomonas aeruginosa* i la *Salmonella sp.*

<i>Lactobacillus plantarum</i>	Amikacina	Ampicilina	Tetraciclina	Colistina	Kanamicina	Neomicina	Vancomicina	Gentamicina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	14	14	12	10	16	0	23/ 14
<i>Escherichia coli</i>	18	21	10	10	12,5	13	0	15 /12
<i>Bacillus subtilis</i>	31 /18	16	15	6	24,5	13 /24,5	18 /24	22 /10
<i>Salmonella sp.</i>	14	12	9	11	13 /17	9,5 /14	0	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	11	22,5	0	16,5	14	15	6

Taula 8. Mitjana dels halos produïts pels antibiòtics respecte cada bacteri patògen cosembrat amb el *Lactobacillus plantarum*.

Patògens + *Lactobacillus plantarum* amb antibiòtics

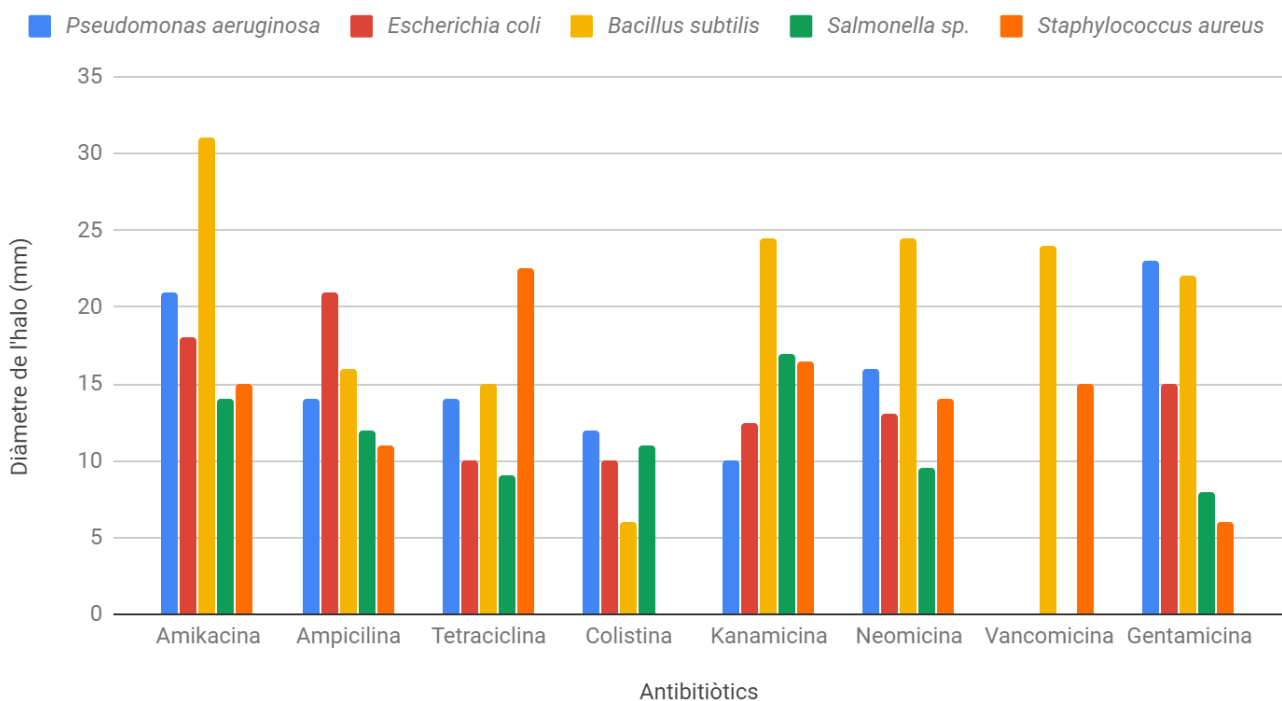


Figura 62. Representació gràfica de les mitjanes dels valors dels halos de la taula 8 produïts pels vuit antibiòtics respecte de cada bacteri patògen barrejat amb el *Lactobacillus plantarum*.

El gràfic mostra novament el mateix patró de les figures anteriors (59, 60 i 61) donat que els els antibiòtics als quals es presenta resistència tornen a ser la colistina i la vancomicina, tot i que ara el *Bacillus subtilis* ha passat a tenir certa sensibilitat a la colistina.

Com a discussió general d'aquest últim experiment, en primer lloc podem dir que es demostra que els probiòtics emprats presenten més resistències als antibiòtics que els patògens.

En segon lloc, els resultats front l'ampicil·lina, la tetraciclina i la colistina no han variat respecte l'experiment on els patògens estaven sols (sense cosembra amb probiòtic). Un altre cas en que no hem pogut comprovar diferències és el de l'*Escherichia coli* ja que no és inhibida per la vancomicina quan està aïllada i en estar cosembrada amb els probiòtics tampoc no és més sensible a aquest antibiòtic; és a dir, continua sent igual de resistent.

En tercer lloc, en les plaques cosembrades amb probiòtics s'observa que la resistència d'alguns patògens front alguns antibiòtics ha disminuït en alguns casos mentre que en d'altres ha augmentat. Això concretament s'observa amb la gentamicina, que té més efecte inhibidor per les *Pseudomonas*, el *Bacillus subtilis*, la *Salmonella*, i l'*Staphylococcus aureus* quan estan cosembrats amb els probiòtics amb la kanamicina, amikacina i neomicina on sempre es genera un halo de mesura considerablement major quan hi ha presència d'ambdós microorganismes. Contràriament, l'ampicil·lina té menys efecte contra l'*Staphylococcus aureus* i la colistina i la vancomicina deixen d'inhibir totalment certs patògens quan els probiòtics eren presents.

Amb tot això podem dir que el fet de que el probiòtic estigui present pot beneficiar (reduint la resistència del patogen) o perjudicar (augmentant la resistència del patogen) depenent de l'antibiòtic que s'estigui fent servir i del patogen que es vulgui combatre. Potser als casos on hem vist una reducció de l'halo hi hagi hagut intercanvi de gens de resistència (assumint que els probiòtics emprats ho eren) i, per algun motiu, no s'hagi donat aquest fenomen a aquells casos on hem vist un increment de la mida d'aquest. En els casos on s'ha reduït la resistència ho podem atribuir a la competència entre ambdós tipus de bacteris (patògens i làctics).

DISCUSSIÓ

Hem pogut comprovar que la major part dels probiòtics -en concret els bacteris làctics presents a determinats aliments, medicaments o suplementes dietètics-, són capaços de reduir la proliferació d'altres bacteris patògens, però que de totes maneres la inhibició produïda pels antibiòtics és sempre molt més efectiva i fiable. Cal destacar que també s'ha evidenciat que els aliments enriquits amb bífidus no tenen perquè donar una major protecció front el control del creixement de patògens.

Tot això ha quedat demostrat perquè quan hem enfrontat bacteris patògens i discs de bacteris làctics (probiòtics) es generen petits halos que, a la majoria de casos, són significativament menors que els produïts pels discs d'antibiòtics. A més a més, els halos generats a partir de discs de iogurt no són tan transparents com els de bacteris làctics o els d'antibiòtics, sinó que es mostren com una zona translúcida diferenciada de la resta de la placa que conté petites quantitats de patògen més altres bacteris propis del iogurt. La poca quantitat de patògen en aquesta zona propera al disc sembla indicar que el seu creixement es troba inhibit per la presència dels bacteris làctics propis del iogurt. Per altra banda, la diferència en mida dels halos del iogurt amb bífidus i del iogurt sense bífidus és inapreciable, per tant podem dir que, de cara a minimitzar el creixement de bacteris patògens, ambdós tipus de iogurt tindrien un efecte semblant, malgrat es vinguin diferències comercials entre ells.

En les observacions al microscopi de les sembres i tincions dels iogurts barrejats amb bacteris patògens, es torna a corroborar la presència d'abundants bacteris làctics del iogurt front només una petita proporció del bacteri patògen. Novament això demostra que els probiòtics presents al iogurt han estat capaços d'inhibir el creixement dels bacteris patògens. Altrament, excepte en algun cas particular, aquests resultats no han mostrat diferències significatives entre el iogurt enriquit amb bífidus i el iogurt sense bífidus, la qual cosa indica de nou que no podem dir que tots els aliments que continguin probiòtics del gènere *Bifidobacterium* siguin més efectius per evitar el creixement de bacteris patògens, sinó que aquesta efectivitat dependrà del bacteri que vulguem inhibir.

Respecte al risc del pas de gens de resistència a antibiòtics des de determinats bacteris probiòtics a bacteris patògens els resultats obtinguts també són interessants. En comparar els halos de les plaques on només havíem sembrat bacteris patògens amb els halos de les plaques on els havíem cosembrat amb probiòtics hem comprovat que, malgrat que aquests probiòtics concrets presentaven resistència

als antibiòtics, el diàmetre dels halos generats a les plaques on es trobaven ambdues espècies de bacteris tendia a augmentar; és a dir, el bacteri patògen creixia amb més dificultat (Swidsinski, A. 2016). Potser el fet de que aquests probiòtics siguin resistents fa que, com que no són inhibits pels antibiòtics, en competir amb els patògens, els quals el seu creixement sí que és inhibit per l'antibiòtic, sigui molt més fàcil pel probiòtic sobreviure i inhibir encara més el creixement del patògen. Tot i això, cal mencionar que és possible que, deixant conviure els microorganismes durant més temps podria haver-hi transmissió de gens per mecanismes de parasexualitat i els patògens podrien haver acabat sent resistents també als antibiòtics (Rolain JM, 2013) (Sharma P, 2014). Sabent que aquestes soques emprades en aquest experiment es venen com a probiòtics s'hauria d'anar amb compte a l'hora de consumir-les. Un altre factor que hauríem de tenir present és que tal com emprant probiòtics resistents el seu gens de resistència poden ser transmesos als probiòtics, si prenem molt probiòtic també augmentem el risc de pas de resistències (de patògens a probiòtics en aquest cas) i que al final els probiòtics no resistents als antibiòtics també s'acabaran exhaustint, la qual cosa és un nou risc per a la salut.

Així doncs, atès que hem vist com el patògen en convivència amb probiòtics tendeixen a créixer menys en la majoria de casos, podem arribar a la conclusió que prendre probiòtics pot ajudar a combatre o disminuir el risc d'infecció bacteriana i frenar el creixement del patògen sempre i quan aquest últim es trobi en poca quantitat. Cal tenir en compte que a les experiències realitzades en aquest treball, la concentració dels bacteris patògens era més aviat reduïda i similar a la dels probiòtics. Si haguéssim realitzat els experiments amb concentracions més altes de patògens probablement la inhibició per part dels probiòtics hauria estat molt menor. Així doncs, en casos greus d'infecció el probiòtic pot no ser de gran ajuda, però en cas de prevenció o infecció lleu sí que poden resultar molt efectius. Malgrat d'això, segons els resultats, també cal tenir present que si es decideix prendre un probiòtic mentre s'està rebent un tractament antimicrobià no és adequat qualsevol probiòtic, sinó que ha de ser un que s'hagi demostrat que inhibeix el patògen en qüestió.

A banda de l'ajut que ens ofereixen els probiòtics (en medicaments, suplementos dietètics o formant part d'alguns aliments) per lluitar contra bacteris patògens, queda demostrat que els antibiòtics són la manera més efectiva de combatre les infeccions bacterianes i que no són substituïbles per cap probiòtic. És per aquest motiu que és tan important que fem un ús responsable d'aquests

antimicrobians, atès que ara mateix són l'únic mitjà fiable per tractar aquestes infeccions i estem en risc de perdre la seva funcionalitat per l'aparició de multitud de noves resistències.

CONCLUSIONS

1. Els probiòtics inhibeixen, mitjançant competència, el creixement dels bacteris patògens encara que d'una manera menys efectiva que els antibiòtics.
2. Els productes alimentaris que contenen probiòtics poden tenir un efecte preventiu o antimicrobià en el cas de que la infecció bacteriana es trobi en un estat inicial.
3. Els iogurts enriquits amb probiòtics del gènere *Bifidobacterium* no inhibeixen més el creixement de bacteris patògens que els iogurts que no en tenen, malgrat que ens poden afavorir en altres aspectes.
4. Prendre probiòtics a la vegada que s'està rebent un tractament antimicrobià amb antibiòtics pot ajudar a combatre el bacteri causant de la infecció i a la vegada repoblar la microbiota malmesa per l'efecte del fàrmac.
5. S'ha de tenir en compte que a la llarga poden donar-se transferències de gens de resistència als patògens si el probiòtic que s'està consumint és resistent als antibiòtics, malgrat que en períodes curts de convivència no sembla que hi hagi cap risc en aquest sentit.
6. Malgrat el seu efecte inhibidor, no tots els probiòtics redueixen el creixement bacterià de qualsevol patògen de manera que el seu ús no pot ser indiscriminat front totes les infeccions bacterianes.
7. La població que consumeix probiòtics en forma de medicament, complement dietètic o bé afegits artificialment a determinats aliments, hauria de tenir en compte que aquests no sempre són efectius per ajudar a combatre infeccions bacterianes i que inclús poden arribar a ser contraproductius si aquests contenen gens de resistència als antibiòtics.

AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull agrair la meva tutora, Lluïsa de Yebra, per la seva dedicació des que vam començar el treball fins al seu final, per haver estat una guia diligent i haver-me donat tot el seu suport i esforç per tal de fer possible la realització d'aquest treball. Però sobretot, el que més li agraeixo és haver estat una professora excel·lent que m'ha transmès la seva passió per la biologia.

En segon lloc vull expressar el meu agraïment a la Dra. Maria Àngels Calvo per haver-me obert les portes del laboratori de la Facultat de Veterinària de la UAB i haver ajudat amb el disseny experimental, i al Dr. Leo Arosemena per haver-me guiat al laboratori ensenyant-me totes les tècniques necessàries.

Per últim, gràcies als meus pares per haver-me donat suport i haver estat comprensius quan havia de dedicar-hi moltes hores a aquest treball.

BIBLIOGRAFIA

1. Schaechter, M., Ingraham, J.I., Neidhardt, F.C., (2005), *Microorganismes*, Wachington DC; Estats Units, Editorial Reverté.
2. Fernández, A.J., Vázquez, M.B., (2016), *Biología. Sèrie observa*, Barcelona; Espanya, Santillana.
3. Jimeno, A., Ballesteros, M., (2016), *Biología 2. Sèrie observa*, Barcelona; Espanya, Santillana
4. Pérez, R. G., Villaverde, M.C., (1997), *Microbiologia I*, Madrid; Espanya, Paraninfo.
5. Tte. Cor. Fernando Fernández Riverón, My. Jorge López Hernández, Dra. Laida María Ponce Martínez, I Dra. Caridad Machado Betarte, *Resistencia bacteriana, Rev Cubana Med Milit 2003;32(1):44-8.*
6. Prentis, S., (1993), *Biothecnology: a new industrial revolution*, Londres; Gran Bretanya, Orbis Publishing Limited
7. Rierola, S. (productor) i Regàs, J. (dir.). (2018). *La fi dels antibiòtics* (reportatge). Espanya: TV3
8. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002, London Ontario, Canada.
9. Jackson GI Medical. (2014), *Prebiotic vs Probioti. Rrecuperat de:*
<https://www.prebiotin.com/prebiotin-academy/what-are-prebiotics/prebiotics-vs-probiotics/>
10. M. López-Brea i D. Domingo, *Antibioticoterapia con probióticos*, Rev Esp Quimioterap, Junio 2007; Vol. 20 (Nº 2): 170-181.
11. Cabrera, C. E.; Gómez, R. F.; Zúñiga, A. E. *La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación*, vol. 38, núm. 2, pp. 149-158
12. Ingraham, J.I., Ingraham, C.A., Prentiss, H., (1998), *Introducción a la Microbiología*, Barcelona; Espanya, Editorial Reverté.
13. P. SCHAEFFER, *Sporulation and the Production of Antibiotics, Exoenzymes, and Exotoxins*, BACTERIOLOGICAL REVIEWS, Vol. 33, No. 1, p. 48-71.
14. R. P. Elander, *Industrial production of b-lactam antibiotics*, Appl Microbiol Biotechnol (2003) 61:385–392.

15. Edwin H. Editor-In-chief Lennette, *Manual of clinical microbiology*, American Society for Microbiology; 3rd edition (1980)

16. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Schulz S, Manowsky J, Verstraelen H, Swidsinski S. *Functional anatomy of the colonic bioreactor: Impact of antibiotics and Saccharomyces boulardii on bacterial composition in human fecal cylinders*. Syst Appl Microbiol. 2016; 39(1): 67-75.

17. Rolain JM. *Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes*. Front Microbiol. 2013; 4: 173.

18. Sharma P, Kumar Tomar S., Goswami P., Sangwan V., Singh R,. *Antibiotic resistance among commercially available probiotics*. Food Research International. 2014; 57: 176-95.

ANNEXOS

1. Vòrtex



Font: Cole-partner

2. Nansa Digralsky



Font: Detlab

3. micro-pipeta



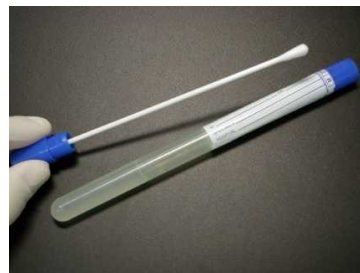
Font: Quimi-lab

4. Bec de Bunsen



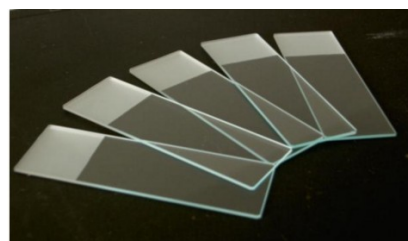
Font: Tecnylab

5. Hisòps



Font: Raovet

6. Portaobjectes



Font: Besience

7. Provetes a una gradeta



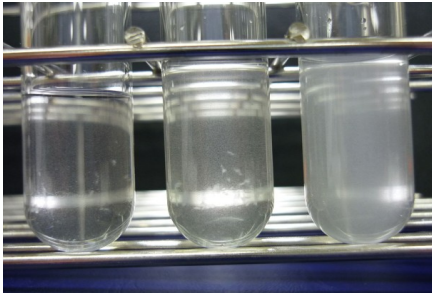
Font: Wikipedia

8. Placa de petri:



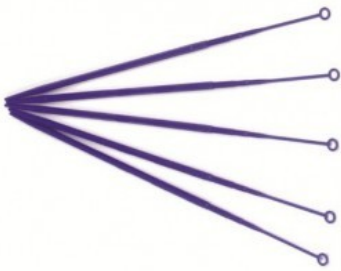
Font: Mercado libre

9. escala de McFarland



Font: Vikipèdia

10. Nansa de Kolle



Font: Mercalab

11. Antibiograma emprat per l'experiment 1:

			S.Z	I.	R.S
9021	Cefuroxime				
	Cefuroxime axetil (oral)	CXM 30 µg	23	15-22	14
	Cefuroxime sodium (parenteral)		18	15-17	14
9011	Cephalexin	CL 30 µg	18	15-17	14
9013	Cephalothin	KF 30 µg	18	15-17	14
9055	Cephadrine	CE 30 µg	18	15-17	14
	Chloramphenicol				
9022	Streptococci	C 30 µg	21	18-20	17
	Enterobacteriaceae, Non Enterobacteriaceae, Enterococci		18	13-17	12
9057	Cinoxacin	CIN 100 µg	19	15-18	14
9056	Ciprofloxacina	CIP 5 µg	21	18-20	15
9098	Clarithromycin	CLR 15 µg	18	14-17	13
9047	Clindamycin	CD 2 µg	19	16-18	15
9058	Cloxacillin	CX 5 µg	13	11-12	10
9023	Collatin sulfate	CS 10 µg	11	9-10	8
	Co-Trimoxazole (Trimethoprim + sulfamethoxazole)	SXT 25 µg			
9042	Gram negative bacteria		16	11-15	10
	Streptococcus pneumoniae	(1,25 µg+23,75 µg)	19	16/18	15
9093	Dicloxacillin	DCX 1 µg	13	11-12	10
9059	Doxycycline	DXT 30 µg	16	13-15	12
9024	Erythromycin	E 15 µg	23	14-22	13
9109	Fosfomicin	FOS 200 µg	16	13-15	12
9099	Furazolidon	FR 50 µg	17	15-16	14
9049	Fusidic acid	FC 10 µg	23	15-22	14
9026	Gentamicin	CN((N)) 10 µg	15	13-14	12
9079	Imipenem	IMI 10 µg	16	14-15	13
9027	Kanamycin	K 30 µg	18	14-17	13
9102	Levofloxacina	LEV 5 µg	17	14-16	13
9028	Lincocmycin	MY 2 µg	21	15-20	14
9113	Lomefloxacina	LOM 10 µg	22	19-21	18
9068	Meropenem	MRP 10 µg	16	14-15	13
	Methicillin	MET 5 µg		10-13	9
	Staphylococci				
	Mezlocillin	MEZ 75 µg	16	-	15
9062	Pseudomonas aeruginosa		21	18-20	17
	Other Gram negative bacteria				
9030	Minocycline	MN 30 µg	19	15-18	14
9001	Nalidixic acid	NA 30 µg	19	14-18	13
9032	Neomycin	N 30 µg	17	13-16	12
9033	Netilmicin	NET 30 µg	15	13-14	12
9034	Nitrofurantoin	F 300 µg	17	15-16	14
9035	Norfloxacina	NOR 10 µg	17	13-16	12
9063	Novoblocin	NO 30 µg	22	18-21	17
9080	Ofoxacin	OFX 5 µg	16	13-15	12
	Oxacillin				
9036	Staphylococcus aureus	OX 1 µg	13	11-12	10
	Staphylococcus coagulase-negative		18	-	-
	Pneumococci		20	-	-
9002	Oxolinic acid	OA 2 µg	11	-	10

2

			S.Z	I.	R.S
9021	Cefuroxime				
	Cefuroxime axetil (oral)	CXM 30 µg	23	15-22	14
	Cefuroxime sodium (parenteral)		18	15-17	14
9011	Cephalexin	CL 30 µg	18	15-17	14
9013	Cephalothin	KF 30 µg	18	15-17	14
9055	Cephadrine	CE 30 µg	18	15-17	14
	Chloramphenicol				
9022	Streptococci	C 30 µg	21	18-20	17
	Enterobacteriaceae, Non Enterobacteriaceae, Enterococci		18	13-17	12
9057	Cinoxacin	CIN 100 µg	19	15-18	14
9056	Ciprofloxacina	CIP 5 µg	21	18-20	15
9098	Clarithromycin	CLR 15 µg	18	14-17	13
9047	Clindamycin	CD 2 µg	19	16-18	15
9058	Cloxacillin	CX 5 µg	13	11-12	10
9023	Collatin sulfate	CS 10 µg	11	9-10	8
	Co-Trimoxazole (Trimethoprim + sulfamethoxazole)	SXT 25 µg			
9042	Gram negative bacteria		16	11-15	10
	Streptococcus pneumoniae	(1,25 µg+23,75 µg)	19	16/18	15
9093	Dicloxacillin	DCX 1 µg	13	11-12	10
9059	Doxycycline	DXT 30 µg	16	13-15	12
9024	Erythromycin	E 15 µg	23	14-22	13
9109	Fosfomicin	FOS 200 µg	16	13-15	12
9099	Furazolidon	FR 50 µg	17	15-16	14
9049	Fusidic acid	FC 10 µg	23	15-22	14
9026	Gentamicin	CN((N)) 10 µg	15	13-14	12
9079	Imipenem	IMI 10 µg	16	14-15	13
9027	Kanamycin	K 30 µg	18	14-17	13
9102	Levofloxacina	LEV 5 µg	17	14-16	13
9028	Lincocmycin	MY 2 µg	21	15-20	14
9113	Lomefloxacina	LOM 10 µg	22	19-21	18
9068	Meropenem	MRP 10 µg	16	14-15	13
	Methicillin	MET 5 µg	14	10-13	9
	Staphylococci				
	Mezlocillin	MEZ 75 µg	16	-	15
9062	Pseudomonas aeruginosa		21	18-20	17
	Other Gram negative bacteria				
9030	Minocycline	MN 30 µg	19	15-18	14
9001	Nalidixic acid	NA 30 µg	19	14-18	13
9032	Neomycin	N 30 µg	17	13-16	12
9033	Netilmicin	NET 30 µg	15	13-14	12
9034	Nitrofurantoin	F 300 µg	17	15-16	14
9035	Norfloxacina	NOR 10 µg	17	13-16	12
9063	Novoblocin	NO 30 µg	22	18-21	17
9080	Ofoxacin	OFX 5 µg	16	13-15	12
	Oxacillin				
9036	Staphylococcus aureus	OX 1 µg	13	11-12	10
	Staphylococcus coagulase-negative		18	-	-
	Pneumococci		20	-	-
9002	Oxolinic acid	OA 2 µg	11	-	10

2

			S.	I.	R.
9065	Oxytetracycline	OT 30 µg	19	15-18	14
9091	Pefloxacina	PEF 5 µg	22	16-21	15
	Penicillin G		29	-	28
	Staphylococci				
9037	Enterococci	P 10 IU	15	-	14
	Listeria monocytogenes		20	-	19
9003	Piperacillin / Tazobactam	PI 20 µg	28	20-27	19
	Non-enterococcal streptococci		19	14-18	13
	Piperamic acid				
9100	Piperacillin / Tazobactam	TZP 110 µg	21	18-20	17
	Enterobacteriaceae	(100 µg + 10 µg)	18	-	17
	Staphylococci				
	Pseudomonas aeruginosa		18	-	17
	Piperacillin				
9038	Pseudomonas aeruginosa	PRL 100 µg	18	-	17
	Other Gram negative bacteria		21	18-20	17
9120	Polymyxin B	PB 300 IU	20	9-11	8
9039	Rifampicin	RD 30 µg	20	17-19	16
9060	Roxitromycin	RXT 15 µg	18	14-17	13
9046	Sisomicin	SIS 30 µg	15	-	14
9067	Spectinomycin	SPC 100 µg	18	15-17	14
9088	Spiramycin	SP 100 µg	22	18-21	15
9040	Streptomycin	S 10 µg	15	12-14	11
9041	Sulfafurazole	SF 300 µg	17	13-16	12
9084	Sulfamethoxazole	SMX 50 µg	16	12-15	11
9050	Telcoplanin	TEC 30 µg	14	11-13	10
9043	Tetracycline	TE 30 µg	18	15-18	14
	Ticarcillin + clavulanic acid				
9098	Staphylococci	TT 85 µg	23	-	22
	Pseudomonas aeruginosa	(75 µg + 10 µg)	15	-	14
	Other Gram negative bacteria		20	15-19	14
	Ticarcillin				
9070	Pseudomonas aeruginosa	TC 75 µg	15	-	14
	Other Gram negative bacteria		20	15-19	14
9044	Tobramycin	TOB 10 µg	15	13-14	12
9110	Trimethoprim	TM 5 µg	16	11-15	10
9082	Tylosin	TY 30 µg	20	11-15	10
	Vancomycin				
9045	Enterococci	VA 30 µg	17	15-16	14
	Other Gram positive bacteria		12	10-11	9
	Staphylococci		17	-	-

