

ESTUDI DE LES PROPIETATS ANTIBIÒTIQUES D'EXTRACTES DE L'ALL I LA CEBA

Institut Manuel Blancafort
2018-19

PSEUDÒNIM: Ruetsap
2n de Batxillerat
Seminari de ciències

*“Si no conozco algo,
lo investigaré.”*

Louis Pasteur (1822-1895)

AGRAÏMENTS

Abans de començar, m'agradaria agrair a totes aquelles persones que han fet possible la realització del meu treball.

Primer de tot, donar les gràcies a l'IMIM, *Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques*, en especial a en Raul Peña, per haver-me ajudat a realitzar la part pràctica, per aconsellar-me, i per estar allà per resoldre tots els dubtes que he necessitat. No hagués estat possible aquesta recerca sense la seva ajuda, on, per descomptat, he après molt al seu costat.

Gràcies a la meva tutora, M.A. pel seu suport, ajuda, atenció i supervisió en aquests últims moments clau i més difícils del treball.

També agrair a en J.R. la seva dedicació i ajuda a resoldre tots els dubtes durant l'estiu, i, sobretot, durant tot el curs passat.

D'altra banda, vull donar les gràcies a la meva família i als meus amics, per simplement, escoltar-me en aquells moments de més nervis i ajudar-me en tot el que necessitava.

En definitiva, gràcies a tots aquells que feu possible que els joves puguin estar en contacte amb el món de la ciència i gaudir-lo.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
1. LA MICROBIOLOGIA	3
1.1. Antecedents	3
2. ELS BACTERIS	4
2.1. Colònies bacterianes	5
2.2. Tècniques del cultiu bacterià pur	6
2.2.1. Aïllament bacterià	7
2.3. Creixement bacterià	7
2.3.1. Nutrició bacteriana	9
2.4. Reproducció	10
2.4.1. Asexual o bipartició	10
2.5. Estructura i parts	11
2.6. Classificació segons la seva forma	11
3. ANTIBIÒTICS	12
3.1. Antecedents	12
3.2. Classificació segons l'origen	12
3.3. Classificació segons l'efecte	13
3.4. Classificació segons l'espectre	13
3.5. Resistència bacteriana	14
4. ANTIBIÒTICS VEGETALS	15
4.1. Fitoteràpia	15
4.2. L'all	15
4.2.1. Composició de l'all	15
4.3. La ceba	17
4.3.1. Composició de la ceba	17
5. L'AL·LICINA	19
5.1. Formació de l'al·licina	20
5.1.1. Metabòlits de l'al·licina	21
5.2. Capacitat antimicrobiana	22
6. L'ESPECTROFOTÒMETRE	23
7. METODOLOGIA	24
7.1. Elaboració del medi sòlid	26

7.2.	Sembra i aïllament per estriat	26
7.3.	Elaboració dels extractes d'all i ceba.....	27
7.4.	Comprovar l'efecte antibiòtic d'extractes d'all, ceba i combinats.....	29
7.5.	Recollida de mostres, aïllament i caracterització de 12 colònies	31
7.6.	Comprovar l'efecte de l'all en les 12 soques aïllades	32
7.7.	Comprovar si a major concentració, major inhibició.....	33
7.8.	Comprovar si l'extracte d'all podria actuar com a conservant.....	33
8.	ANÀLISI DE RESULTATS	34
8.1.	Comprovar l'efecte antibiòtic d'extractes d'all, ceba i combinats.....	34
8.2.	Comprovar l'espectre de l'all en les 12 soques aïllades.....	39
8.3.	Comprovar si a més concentració d'extracte d'all, major inhibició.....	49
8.4.	Determinar si l'extracte d'all podria ser un bon conservant del tomàquet	50
	CONCLUSIONS	51
	BIBLIOGRAFIA	56
	ANNEX	1
	ANNEX A: PROCEDÈNCIA DE LES SOQUES.....	1
	ANNEX B: CARACTERITZACIÓ DE LES SOQUES AÏLLADES	2
	ANNEX C: FORMA DE LES COLÒNIES I LA MORFOLOGIA MICROSCÒPICA.....	8
	ANNEX D: RECULL DE DADES ESPECTROFOTÒMETRE.....	9
	ANNEX E: RECULL DE FOTOGRAFIES DE LES PRÀCTIQUES.....	10

RESUM

La resistència antibiòtica i, per tant, la necessitat de trobar una solució imminent, fa que, els antibiòtics estiguin presents més que mai a moltes converses, ja que la ciència i la societat es troba davant d'un problema de salut pública que requereix una solució .

L'objectiu d'aquest Treball de Recerca és estudiar les propietats antibacterianes dels extractes que contenen una molècula, l'al·licina, sintetitzada únicament pel gènere de les al·liàcies (*Allium*) entre ells, l'all i la ceba. Llavors, poder comprovar si es podrien utilitzar en algun àmbit de la nostra vida com en la conservació d'aliments o en medicina. Ja que, potser podrien ser un bon mecanisme per lluitar contra la resistència bacteriana.

El que he fet, per tant, ha sigut comprovar l'eficàcia dels extractes en medis de cultiu líquids envers soques bacterianes, la quantificació del creixement bacterià s'ha fet amb l'espectrofotòmetre.

Els termes clau del meu treball són l'al·licina, espectrofotometria, extarcte d'all, extracte de ceba, antibiòtic, antibiòtic vegetal, fitoteràpia, conservació d'aliments.

ABSTRACT

Antibiotic resistance and, so, the need to find out an imminent solution makes that the word "*antibiotic*" instead of helping us to feel safer, concerns us.

The aim of this project is to study the antibacterial properties from onion and garlic extracts that both contain allicin, an antibiòtic molecule only synthesized by the genus *Allium*, so, if they can inhibit bacteria growth, they could be used in some ambits of our lives, such as in medicine or in food preservation. Also I wanted to study if they could be a solution of the bacteria resistance.

Then, I checked the antibacterial efficiency of the extracts in a líquid culture medium towards some bacteria. The quantification of the microorganisms growth was done by the spectrophotometer.

The key words are allicin, spectrophotometry, garlic extract, onion extract, antibiotic, plant antibiotic, phytotherapy, food preservation.

INTRODUCCIÓ

El treball de recerca requereix hores de dedicació i què millor que fer-lo sobre un tema el qual t'atregeix i et motivi. De fet, des del primer moment, vaig voler enfocar el meu treball en l'àmbit de la biologia, en especial, la microbiologia.

Tot i que va costar molt trobar el tema del treball, vaig decidir embarcar-me en l'estudi de possibles antibiòtics vegetals, exactament, la ceba i all, del gènere *Allium*, que contenen una molècula, l'al·licina, amb propietats antimicrobianes.

L'ús indiscriminat i sense cura dels antibiòtics ha generat un gran desenvolupament de resistències bacterianes. S'ha accelerat el procés de selecció natural, on els bacteris de per sí resistents sobreviuen davant els més sensibles, fent que aquests primers s'estenguin amb èxit.

De fet, davant el risc que significa aquesta resistència, a contrarellotge, laboratoris de tot el món estan duent a terme diferents estudis sobre diverses molècules que puguin tenir funcions antibiòtiques. Això és un gran repte, ja que alhora que aquestes han de ser efectives, han de ser fàcils i econòmiques de sintetitzar. Una possible alternativa, no massa explotada i alhora, bona a considerar, és la dels antibiòtics provinents de fonts vegetals.

Per tant, és per això que estudiaré i analitzaré els efectes i propietats dels extractes d'all i de ceba que continguin la molècula d'al·licina sobre cultius axènics.

Les hipòtesis del meu treball són:

Potser els extractes d'all i de ceba tenen un poder antibacterià

Potser l'extracte d'all es pot utilitzar per a la conservació d'aliments

Dit això, les meves preguntes a l'hora de dur a terme el treball són les següents:

- Els agents antimicrobians de l'all i la ceba són eficaços? Podrien arribar a ser un nou possible component en la composició dels antibiòtics?
- Té a veure la morfologia microscòpica dels bacteris amb la forma de la colònia?
- En quines condicions, els extractes de l'all i la ceba, no tindran cap efecte envers la soca?
- De quin bulb, all o ceba, podem extreure més al·licina? O bé, quin dels dos extractes, té més efecte antibiòtic?
- En quines condicions l'al·licina, treballa millor?
- Poden tenir aquests extractes, reaccions adverses, és a dir, en comptes de frenar el creixement bacterià, el potencien?

- Són els extractes d'al·licina, d'ampli o de reduït espectre?
- A més concentració d'extracte, hi ha més inhibició?
- Per tant, es pot realitzar un antibiòtic senzill i econòmic i, alhora, ser efectiu?
- Són efectius en la conservació del tomàquet?

Els objectius plantejats per tal d'arribar a la resolució de les preguntes i hipòtesis són els següents.

- Realitzar medis de cultiu
- Familiaritzar-me amb el laboratori, i diferents tècniques
- Aïllar bacteris
- Analitzar bacteris al microscopi
- Realitzar extractes d'all i ceba preservant l'al·licina
- Comparar l'eficàcia d'extractes d'all amb els de ceba, i, consegüentment, determinar quin dels dos conté més al·licina.
- Poder identificar l'espectre dels extractes per poder determinar el seu ús, més aviat clínic o conservant.
- Determinar quina és la concentració mínima on pot tenir un efecte bactericida fiable, i verificar si, a més concentració, hi ha més eficàcia
- Comprovar si es podrien utilitzar com a conservants

MARC TEÒRIC

Durant la part teòrica s'explicaran diferents conceptes que íntimament em podran ajudar a realitzar la part experimental.

1. LA MICROBIOLOGIA

La microbiologia és una branca de la biologia que s'encarrega de l'estudi de microorganismes, entre ells, els bacteris.

1.1. Antecedents

Aristòtil, al s.IV, va idear que la vida sorgia del no-res, és a dir, podia aparèixer de coses inanimades, matèria en descomposició i/o animals morts. Aquesta teoria va rebre el nom de **generació espontània**.

Aquest principi va costar molt de ser refutat, a causa de la poca informació i els pocs contrastos per part de la societat. És més, hi feien acte de fe i s'aferraren a aquesta teoria com l'única i vertadera.

Al s.XVII, **Antoine van Leeuwenhoek** va ser el primer científic a fer observacions i dibuixos precisos de bacteris i protozous. Aquestes observacions les va dur a terme gràcies al microscopi, ideat per ell després de tallar lents, i posteriorment muntant-les en llautó, un aliatge de coure i zinc, i també amb plata. Aleshores, encara era vigent la **generació espontània**.

A poc a poc, es va poder anar demostrant el contrari, gràcies als experiments de **Redi**, al s.XVII.

Redi va demostrar que, els éssers vius, com larves, no s'originaven de matèria en descomposició ni d'animals morts, sinó que la matèria morta era un substrat d'aquestes.

Paral·lelament, Pasteur (1822-1895) va ser el pioner del desenvolupament de la **teoria de la infecció microbiana**. Aquesta afirmava que les malalties tenien lloc per l'acció dels microorganismes., on aquests no apareixien d'un moment per un altre, sinó que provenien d'haver infectat a altres cossos.

2. ELS BACTERIS

Els bacteris són organismes procariotes i unicel·lulars. Van ser un dels primers éssers vius que van habitar a la Terra.

En ser procariotes, la seva estructura és simple a causa de la inexistència d'òrgans i, nucli. Tenen el material genètic, ADN, en forma circular i lliure pel citoplasma, al nucleòide.

Aquests microorganismes es solen trobar de forma aïllada, però la forma més característica de localitzar-los és formant colònies. **(Figura 1)**

Tot i que és l'organisme més simple de la Terra, el seu metabolisme pot ser molt variat.

Pel que fa a la seva mida, oscil·la entre els 0'5 i 5 μm . Per a fer-nos a una idea, una cèl·lula eucariota, de mitjana, té una mida d'uns 40 μm .

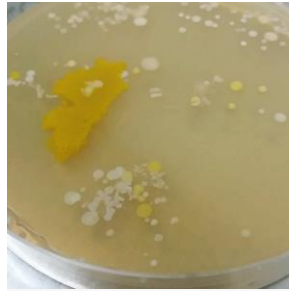


Figura 1. Imatge pròpia d'un cultiu mixt bacterià deixades a incubar 2 dies a 37 graus.

2.1. Colònies bacterianes

Una **colònia** bacteriana és una població de cèl·lules que es pot observar macroscòpicament, és a dir, a simple vista, i creixen en un medi sòlid procedent d'una sola cèl·lula bacteriana.

Quan hi ha un cultiu en agar, placa de Petri, sempre és important detectar la morfologia de les colònies per facilitar la identificació d'aquestes.

Per tal de dur a terme un estudi, a ull nu, de les característiques morfològiques de la colònia ens hem de fixar en: (D. Bilbao, 2010)

- **Morfologia en la superfície (Figura 2):** Poden ser planes, planoconvexes, convexes, acuminades, umbilicades i papilades.

PLANA		ACUMINADA	
PLANOCONVEXA		UMBILICADA	
CONVEXA		PAPILADA	

Figura 2: Tipus de morfologia de les colònies en superfície. (D. Bilbao, 2010)

- **Morfologia de la vora (Figura 3):** Poden ser lobulades, arrodonides, espigolades, rizoides, ondulades i filamentoses.

REDONDEADO		ESPICULADO	
ONDULADO		FILAMENTOSO	
LOBULADO		RIZOIDE	

Figura 3: Tipus de morfologia de la vora de les colònies. (D. Bilbao, 2010)

- **Morfologia de forma (Figura 4).** Poden ser punctiformes, circulars, rizoides, filamentoses, fusiformes i irregulars.

PUNTIFORME		IRREGULAR	
CIRCULAR		RIZOIDE	
FILAMENTOSA		FUSIFORME	

Figura 4: Tipus de morfologia de la forma de les colònies. (D. Bilbao, 2010)

2.2. Tècniques del cultiu bacterià pur

Els bacteris són ubics, per tant, s'ha de mantenir aquest microorganisme aïllat en un ambient artificial que impossibiliti l'accés d'altres microorganismes.

Els bacteris es poden inocular per tal que visquin dins un tub d'assaig o bé dins una placa de petri. El medi de cultiu on creixin i es relacionin ha de ser estèril i cal evitar tota contaminació externa per part de microorganismes provinents de l'atmosfera (R. Y. Stanier, 1991)

És per això que quan es manipulen els estris en microbiologia, anteriorment han de ser autoclavats.

Per a la sembra de cultius purs de bacteris i microorganismes es duu a terme la tècnica de l'estriat (**Figura 5**).

Aquesta consta en repartir l'inòcul, amb una nansa de *Kolle*, de la colònia en una sola secció de la placa de Petri, mitjançant una estria, **a**. Un cop feta, com que la concentració de colònies que es desenvolupen és molt alta, l'inòcul es dilueix fent una estria successiva, **b**, que arrossega part de microorganismes de la **a**. La següent, **c**, s'emporta una petita porció de bacteris de l'estria **b**. Aquest procediment, per dilució de colònies, es duu a terme, normalment, fins a l'estria **d**.

Per tant, si a l'inici ens trobem amb una superpoblació de colònies, a mesura que el nombre d'estries augmenta, s'obtenen colònies pures ben aïllades. (G. Axel, 2013)

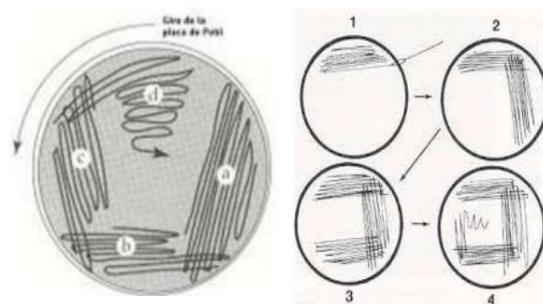


Figura 5: Representació gràfica de l'estriat (G. Axel, 2013)

2.2.1. Aïllament bacterià

Aïllar és separar un tipus de microorganisme a partir d'una població heterogènia de microorganismes. L'objectiu final d'aquest és l'obtenció de colònies ben separades, de les quals s'obtindrà un cultiu axènic. (A. Rojas, 2011)

Aquest procés es duu a terme en un medi sòlid. (A. Rojas, 2011)

Per tant, dins un recull de mostres microbiològiques de l'ambient o de pacients, rarament es troba un únic tipus de bacteri o microorganisme. Així doncs, és indispensable que, per treballar i identificar el bacteri que es vol estudiar, s'hagi d'aïllar, transformant-lo en un cultiu pur.

El mètode es tradueix en extreure, amb una nansa de *Kolle* esterilitzada, aquella colònia que es vol estudiar, i es transfereix a un altre medi apropiat mitjançant l'estriat. Tot i això, és molt possible que aquest cultiu obtingut disti molt de ser pur, ja que poden haver-se afegit microorganismes que no siguin visibles macroscòpicament, però sí ser-hi microscòpicament.

Per tant, mai s'ha de reconèixer una soca de la primera placa aïllada com a pura: s'ha de sembrar per estriat una colònia de la primera placa, de la qual es troba ben separada de les altres, a una segona placa.

De fet, si aquesta segona, no mostra cap colònia diferent, hi ha homogeneïtat, ja es pot catalogar com a cultiu pur. (R. Y., Stanier, 1991).

2.3. Creixement bacterià

El creixement d'una població bacteriana és l'augment del nombre de cèl·lules com a conseqüència d'un creixement individual i posterior divisió. (J. Maricela, 2005)

Quan el bacteri es troba en un medi òptim, pel que fa a pH, temperatura i nutrients, el seu creixement es caracteritzarà per tenir 4 fases diferenciades, (**Figura 6**) corba de creixement. De fet, cal destacar que, el temps de creixement varia molt d'una espècie a una altra. (M. Silva, 2018)

Aquest creixement és fàcilment reconegut en medis de cultius artificials.

- **Fase d'adaptació o de latència:** Representa el període de transició dels microorganismes quan són transferits a una nova condició.

Quan un inòcul de bacteris prové d'un medi ric i es transfereix a un pobre mostrarà aquesta fase, ja que és necessari que abans de reproduir-se, les cèl·lules sintetitzin enzims, RNA i molècules essencials per dividir-se exponencialment al nou medi. (Q. Garcia, 2014)

També s'observa latència quan un inòcul està constituït per cèl·lules que han sigut malmeses però no mortes, ja sigui per la calor o substàncies químiques.

- **Fase de creixement exponencial:** Període caracteritzat per la duplicació cel·lular. Coneixem això com un creixement exponencial. La velocitat de creixement que té aquest bacteri es reconeix com la taxa de creixement **k**, on aquest té disponibilitat òptima de recursos per tal de reproduir-se i nutrir-se. (J. Ramírez, 2014)

Cal tenir en compte que les condicions ambientals (temperatura, composició del medi de cultiu...) influencien en aquest creixement.

- **Fase estacionària:** Període que es produeix com a conseqüència de l'esgotament de nutrients i per l'alliberament de substàncies tòxiques d'aquest. Comencen a utilitzar com a font energètica les proteïnes formades a la primera fase. En resum, és la fase en la qual el creixement cessa. (J. Ramos Franco, 2014)

- **Fase de mort:** Període on té lloc la mort cel·lular. Si la incubació continua després que una població assoleixi la fase estacionària, les cèl·lules poden seguir vives i continuar metabolitzant, però començarà una disminució progressiva en el nombre de cèl·lules viables. (H. Rangel, 2014)

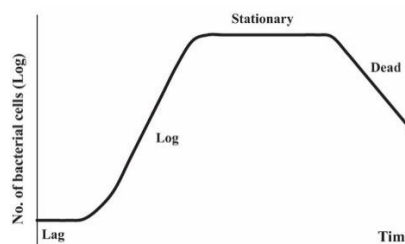


Figura 6: Corva de creixement, es mostren les 4 fases. (L. Wang, 2015)

2.3.1. Nutrició bacteriana

Per tal que els bacteris puguin créixer, han de tenir, entre altres variables, una rica i àmplia font de nutrients. Els medis de cultiu són els encarregats d'aportar totes les substàncies vitals pel creixement de cultius bacterians.

Els bacteris necessiten **aigua**, perquè és on duen a terme totes les reaccions biològiques i és el principal component del protoplasma, nucli i citoplasma bacterià.

D'altra banda, també necessiten una font de **carboni**, ja que és l'element més abundant en les macromolècules que els conformen. Constituïnt el 50% del seu pes sec.

- Els microorganismes autòtrofs necessiten diòxid de carboni, CO_2 , per fabricar les seves pròpies biomolècules, mitjançant l'energia de la llum o bé per reaccions químiques oxidants.
- Els heteròtrofs necessiten també carboni per fabricar nou material cel·lular, i els aprofiten dels aminoàcids, àcids grassos, àcids orgànics, entre altres.

També necessiten **fòsfor** per dur a terme la síntesi dels àcids nucleics i fosfolípids, siguin en forma de fosfats o fosfats orgànics.

El **sofre** i el **nitrogen** també són requerits i són extrets dels aminoàcids amb radical -SH, o bé, dels constituents dels aminoàcids, -NH₂.

Les **sals minerals** són la font d'anions i cations per la cèl·lula. L'ió de **Potassi** (K⁺) permet la síntesi de proteïnes, el **magnesi** (Mg ⁺⁺) estabilitza ribosomes, membranes i àcids nucleics. El **calci** (Ca⁺⁺) és cofactor d'enzims.

A més, el **ferro** també és necessari perquè participa en processos de respiració cel·lular.

Per tant, tots aquests nutrients es necessiten per obtenir energia i dur a terme el procés de biosíntesis. (P. F. Mateos, -)

2.4. Reproducció

Els bacteris són microorganismes asexuals que contenen el mateix material genètic que la cèl·lula que el va formar.

A més, per selecció natural, poden patir mutacions i recombinacions genètiques, reproducció parasexual, i, en conseqüència, patir un canvi en l'ADN. (J. Garcia Calleja, 2009)

2.4.1. Asexual o bipartició

La majoria de bacteris es reproduïxen exponencialment per un mecanisme anomenat bipartició, o bé, **divisió binària**. Aquest procés és asexual, perquè a partir d'una sola cèl·lula original, es formen dos individus genèticament idèntics.

El procés de bipartició té lloc en l'únic cromosoma del bacteri, on es produeix la replicació del DNA. Després de la duplicació, s'obtenen 2 cromosomes, idèntics i circulars, l'original i el replicat.

Els mesosomes col·laboren en la separació i ubicació de l'ADN replicat a cadascun dels extrems oposats del bacteri, i, seguidament, el bacteri s'allarga.

La cèl·lula, gràcies a enzims, sintetitza els components principals de les futures cèl·lules bacterianes. Al centre d'aquesta, es forma una nova paret cel·lular que funciona com a divisió dels dos nucleoides.

Finalment, la paret es divideix pel centre formant dos individus independents. (A. Peña, 2016)

2.5. Estructura i parts

El bacteri (Figura 7) és procariota, unicel·lular, que a diferència de les eucariotes, no compta amb orgànuls amb membrana ni amb nucli, el seu material genètic es troba en forma circular repartit per la cèl·lula. (M. Pérez, 2000). Els principals constituents de la cèl·lula són:

Material genètic:

- **ADN.** Àcid nucleic que conté la informació genètica. Es troba escampat pel citoplasma. Tot i així, està situat al nucleòide.
- **Plasmidis:** Material genètic extracromosòmic, és a dir, aquell que no forma part del cromosoma. Estan formats per seqüències curtes d'ADN circular bicatenari. Aquests plasmidis poden ser transmesos per mecanismes de conjugació, transducció i transformació de gens, un fet important en la resistència bacteriana.

Ribosomes: Orgànul on es sintetitzen les proteïnes.

Cossos d'inclusió: Petits sacs que tenen com a funció principal emmagatzemar diferents compostos energètics.

Membrana cel·lular: Barrera vital per al bacteri, la separa de l'exterior, produint-li aïllament. Aquesta ve constituïda per una bicapa lipídica.

Paret cel·lular. Té lloc al voltant de la membrana plasmàtica, li permet resistir a substàncies tòxiques i li dona forma al bacteri.

2.6. Classificació segons la seva forma

Una de les formes de classificació més evident és la segons la seva forma. No es necessita cap prova ni experiment, només el microscopi òptic i/o electrònic. (M. Zahonero, 2015)

- **Cocs:** Tenen forma esfèrica, on hi ha variants, la unió de dos, són *diplococs*, una cadena de cocs, *streptococs*, l'agrupació irregular de cocs s'anomena *staphylococs*.
- **Bacils:** Tenen forma de barra.
- **Espirils:** Morfologia en espiral.
- **Vibrions:** Morfologia comparable amb una 'coma'.

3. ANTIBIÒTICS

Coneixem com a antibiòtic una substància química produïda per un ésser viu o fabricada per síntesi o semisíntesi química, capaç de paralitzar el desenvolupament de certs bacteris, inhibint el seu creixement o matant-los. (A. Moran, 2014)

Tot i això, sigui un antibiòtic inhibidor o destructiu, ambdós aturen el progrés de la infecció i radiquen la malaltia.

3.1. Antecedents

Alexander Fleming, el 1928, va ser el primer científic que va descobrir el primer antibiòtic. Va observar que en una placa de Petri que contenia un cultiu de bacteris, hi havia una floridura (*Penicillium notatum*) al voltant del qual no hi havia creixement bacterià. Fleming va poder determinar el motiu, la floridura, alliberava una substància nociva per als bacteris, la penicil·lina. Exactament, la funció que duu a terme aquesta substància és inhibir la síntesi dels components de la paret bacteriana. (A. Morgado, 2010)

3.2. Classificació segons l'origen

Els antibiòtics tenen diferents orígens.

- **Biològics:** sintetitzats per organismes vius, com la penicil·lina.

La producció i secreció de les substàncies antibiòtiques no afecten el microorganisme productor. És més, li ofereixen un avantatge des del punt de vista de la supervivència, ja que li permeten colonitzar ambients amb més eficàcia que els seus competidors. (P. F. Mateos, 2015)

- **Semisintètics:** Aquells que són obtinguts a partir de cultius microbians i llavors els modifiquen químicament. Un exemple clar és l'ampicil·lina, derivada de la penicil·lina.
- **Sintètics:** Aquests antibiòtics es produeixen al laboratori a partir de processos químics. Aquests també reben el nom de quimioteràpics. (J. Hans, 2014)

3.3. Classificació segons l'efecte

Es poden classificar segons l'efecte que produeixen als microorganismes tractats:

- **Bacteriostàtics:** Aquells que són inhibidors de la síntesi proteica i actuen unint-s'hi als ribosomes. De totes maneres, aquest enllaç és bastant dèbil, ja que quan la concentració d'antibiòtic baixa, aquest s'allibera del ribosoma. En conseqüència, es reprèn la proliferació del bacteri. De fet l'acció d'un bacteriostàtic pot ser de curta durada, quan té efecte durant 6 hores, de mitja durada, de 12 a 16 hores i de llarga durada, més de 16 hores.

L'objectiu de l'ús dels bacteriostàtics és aturar el creixement dels bacteris, donant temps al propi cos desenvolupar els seus propis mecanismes de defensa per matar els microorganismes nocius. (Euroservhi, 2017)

- **Bactericides:** Tenen la capacitat de matar bacteris, sense la necessitat de destruir-los. Els bactericides es poden trobar en forma d'antibiòtic, però també de desinfectants i antisèptics. Normalment s'uneixen de manera covalent a les molècules diana, ADN o ARN. (Y. Ríos, 2013)
- **Bacteriolítics:** Tenen la capacitat de destruir el bacteri, produir una lisi cel·lular, ja que inhibeix el creixement de la paret cel·lular.

3.4. Classificació segons l'espectre

- **Ampli espectre:** Antibiòtic que actua contra una àmplia gamma de bacteris, tant bacteris grampositius com gramnegatius.

De fet, aquests són utilitzats en medicina per aturar una infecció, ja que evita la proliferació d'aquesta quan està en els primers estadis i encara no s'ha identificat el bacteri causant de la infecció. Aquests salven moltes vides, alhora que són causants d'infeccions post antibiòtiques, perquè al ser d'ampli espectre, no són específics i afecten bacteris mutualistes del cos humà que formen part del nostre sistema immunològic. (M. López, 2016)

- **Espectre reduït:** Antibiòtics que només són eficaços contra famílies específiques de bacteris. Aquests, al ser específics, no afecten en tan gran mesura als bacteris que arriben a ser vitals pel nostre organisme. (M. López, 2016)

3.5. Resistència bacteriana

Tal com diu l'OMS, *“els antibiòtics són medicaments utilitzats per prevenir i tractar infeccions bacterianes. La resistència als antibiòtics es produeix quan els bacteris muten en resposta a l'ús dels fàrmacs.”*. Hi ha dos tipus de resistència:

- **Natural:** Propietat específica d'una mateixa espècie de bacteris resistents per naturalesa als antibiòtics. Normalment aquests no contenen la molècula diana sobre la qual l'antibiòtic actua. En conseqüència, els permet tenir avantatges respecte a altres soques bacterianes sensibles, perquè poden sobreviure a l'antibiòtic i reproduir-se en detriment d'aquelles incapaces. De fet, és una propietat d'adaptació.
- **Adquirida:** Constitueix un problema de salut pública. Té lloc quan un bacteri abans sensible a un antibiòtic, temps més tard, mostra resistència al mateix.

L'aparició de resistència es produeix a través de mutacions i/o per la transmissió de material genètic extracromosòmic procedent d'altres bacteris, per conjugació mitjançant el pili, virus bacteriòfags, transducció, i/o DNA obtingut de cèl·lules mortes per lisi cel·lular, transformació. Tots aquests mecanismes són formes en les quals un bacteri pot obtenir informació genètica externa, de tal manera que aquesta pot codificar per un component que s'incorpora al genoma i el pot fer més resistent i/o sensible a l'antibiòtic.

Aquesta resistència es transmet a la descendència, fent que el nombre de bacteris resistents d'una espècie augmenti només per la mutació d'un sol. (R. Vignoli, 2010)

4. ANTIBIÒTICS VEGETALS

Els estudis sobre l'activitat antimicrobiana d'extractes i olis essencials són molt importants, ja que en la nostra flora hi ha gran varietat que produeix substàncies antimicrobianes.

4.1. Fitoteràpia

Segons l'IEC, la fitoteràpia és una *branca de la medicina que empra les plantes amb propietats terapèutiques per a guarir determinades afeccions*. Es pot afirmar que, és la medicina més antiga i provada del món.

4.2. L'all

L'all és una planta herbàcia, bulb, que forma part de la família de les Al·liàcies, caracteritzada per créixer formant un bulb de 20 dents. El nom de l'all, en especial, és *Allium Sativum*.

Aquest adquireix el nom de **nutricèutic**, una mescla de farmacèutic i nutritiu. (E. Luengo, -)

4.2.1. Composició de l'all

L'all fresc conté diferents components, entre ells, el que més n'abunda és l'aigua, amb un 68% del total. (H. Rubí Ramírez, -)

La **composició química** de l'all, que pot variar, segons el fabricant i les condicions en les quals es troba el sòl, expressades en grams per cada 100 grams d'all fresc són les següents.

Els hidrats de carboni, les cadenes de fructosa, la inulina, tot i així també trobem dins aquest grup, compostos sulfurats i aminoàcids lliures. Aquests conformen uns 25 grams, les proteïnes uns 5'3 grams, lípids, principalment la prostaglandina, 0'3 grams. (EFSA, 2010)

Pel que fa a la **composició mineral**, expressada en mil·ligrams per cada 100 grams d'all fresc, és d'uns 35 mg de sofre, 14 de calci, 1'5 de ferro, 134 de fòsfor, 529 de potassi, 19 de sodi, 94 de iode, entre d'altres. (D. Bender- Bojalil, 2010)

4.2.1.1. Compostos sulfurats

L'all conté, almenys, 33 compostos sulfurats. Entre ells, l'al·liïna i l'al·lil propil disulfur.

Els compostos sulfurats de l'all són aquells que aporten beneficis a la salut. (Alonso J., 2007).

Les que trobem en més quantitat en l'all fresc són les **cisteïnes sulfòxids (Figura 7)**, és a dir, derivats de l'aminoàcid cisteïna (**Figura 8**). Aquestes cisteïnes són aminoàcids no essencials, que contenen un grup tiol (S-H).

Els sulfòxids són compostos que contenen un grup sulfinil enllaçats a dos àtoms de carboni, exactament, la fórmula és $R-S(=O)-R'$, on R i R' són compostos orgànics.

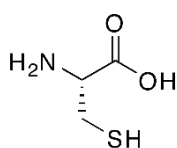


Figura 8: Aminoàcid cisteïna. Aquest pot derivar a cisteïna sulfòxid

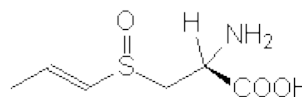


Figura 7: Cisteïna sulfòxid. (Al·liïna) S'observa els grups que conformen un aminoàcid, COOH i NH2. (UV, 1999)

Entre els sulfòxids més presents trobem l'al·liïna.

L'al·liïna (Figura 9), també coneguda com **S-al·lil cisteïna sulfòxid**, $C_6H_{11}NO_3S$, és el sulfòxid i compost organosulfurat més abundant de l'all fresc, derivat de l'aminoàcid cisteïna. (E. Ledezma 2006) S'estima que l'al·liïna constitueix uns 240mg per cada 100g d'all fresc (EAP, 2016).

Aquest és un compost estable quan les condicions li ho permeten, en detriment dels seus metabòlits. (M. De los Ángeles Betancourt, 2010).

L'al·liïna és important per la reacció que té lloc quan les cèl·lules del bulb es trenquen i entra en contacte amb l'enzim alinasa, aquests reaccionen al citoplasma i en un temps molt curt se'n formen derivats. Entre ells, l'al·licina, el principi actiu antibacterià de l'all i la ceba. (J. P. López, 2010)

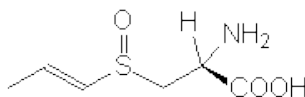


Figura 9: Al·liïna

Els compostos sulfurats de l'all són coneguts pels aspectes beneficiosos que aporten a l'ésser humà, ja que són antiinflamatoris, anticancerosos, hipotensius, descongestionants, antihiperglicèmics, antiasmàtics, diürètics, analgèsics, estimuladors del sistema limfàtic. Una

altra característica molt destacada és la seva propietat antioxidant gràcies als compostos ensofrats, aminoàcids lliures i el seleni. (H. Rubí, 2016)

Tot i això, el tema central, la propietat més important a estudiar és l'antimicrobiana, que és degut al seu principi actiu, l'al·licin, pot causar una gran irritació si es consumeix en excés.

4.3. La ceba

La ceba és el bulb d'una planta herbàcia de la família de les al·liàcies (*Allium*).

El nom científic de la ceba és *Allium Cepa*. Aquesta, com passa amb l'all, és coneguda per les seves propietats nutricionals. També conté el compost antibacterià, l'al·licina.

4.3.1. Composició de la ceba

La ceba està constituïda, com l'all, (**Figura 10**) per diferents components.

La major part del pes fresc de la ceba és aigua, un 94%. (S. Olguín, 2011)

La seva **composició química**, expressada en grams per cada 100 grams de ceba fresca és de 1'4 grams de proteïnes, 0'2 grams de lípids, 4'4 grams d'hidrats de carboni, on ens trobem amb aminoàcids lliures com l'àcid glutamínic. (Abjayawich et al., 2002)

Pel que fa a la seva composició mineral, expressada en mg/ 100g de ceba, és de 114mg de calci, 220mg de sodi, 392mg de potassi, 46 mg de fòsfor i 1'5mg de ferro. (EFSA, 2010)

A més, conté una gran quantitat de compostos sulfurats com l'al·lina, tot i això, en menor quantitat que l'all. (Alimentación Sana, Mèxic)

Composició química (mg o g/ 100 g fresc)		
	ALL	CEBA
Aigua	70'3g	94g
Hidrats de Carboni	23g	4'4g
Proteïnes	5'3g	1'4g
Lípids	0'3g	0'2g
Calci	14mg	114mg
Ferro	1'5mg	1'5mg
Fòsfor	134mg	46mg
Potassi	529mg	392mg
Sodi	19mg	220mg

Figura 10: Taula comparativa dels components de l'all i la ceba per cada 100 grams d'aquests. Elaboració pròpia.

5. L'AL·LICINA

L'al·licina (**Figura 11**) és el metabòlit de l'al·liïna i el principi actiu tant de l'all com de la ceba que els fa antibacterians.

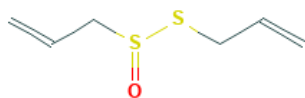


Figura 11: Al·licina. (PubChem)

L'al·licina, $C_6H_{10}OS_2$, de nom segons la normativa de la IUPAC, S-Al·lil-2-propentiosulfinat té un pes molecular de 162'27g/mol i una densitat d'1'112 g/ml.

El seu punt de fusió és de 25 °C. El seu pH està a prop de 6'5.

L'al·licina és molt inestable perquè és altament reactiva, alhora que termolàbil. Això fa que es degradi i les seves característiques químiques costin molt de ser determinades. (M. De los Ángeles Betancourt, 2010) De fet, és molt volàtil a temperatura ambient, alhora que es pot descompondre en molts tipus de tiosulfats, com les sals de l'àcid tiosulfúric, $H_2S_2O_3$, trobat en forma d'anió 2-. Aquests tiosulfats, a través d'altres degradacions no enzimàtiques, es transformen en compostos sulfurats com mono, di, tri i tetra sulfurs. (Harris et al., 2001).

Quan l'al·licina deriva a aquests compostos sulfurats, l'extracte en el que es troba, i/o ella mateixa, perd totalment la funció antibacteriana, passa a no tenir cap mena d'interès farmacològic (L. Diaz et al., 2008). És per això que s'ha de mantenir en unes condicions en les quals trigui més a degradar-se, és a dir, a una temperatura inferior als 10 °C. Tot i així, quan la sotmetem a l'ultra congelació, -70°C a -80°C, la quantitat d'al·licina que es perd és encara més ínfima. (J. Agric, 2008)

L'estabilitat de l'al·licina té lloc en dissolucions etàniques o bé aquoses, on es conserven òptimament, fins als 11 i 7 dies respectivament a una temperatura aproximada de 10°C. (Fujisawa et al., 2008)

L'al·licina és un component que no es troba en l'all fresc, sinó que es desprèn de l'all i la ceba a partir de l'al·liïna. És a dir, a través de reaccions enzimàtiques fruit de la lisi cel·lular, l'al·liïna dóna lloc a l'al·licina. Aquesta última es coneix com el principal principi actiu del gènere **Allium**. (B. Bojalil, 2013)

Un 80% del producte de tiosulfats provinents de la reacció de l'al·liïna està format per al·licina. (Palani S., 2014)

De totes les espècies del gènere *Allium*, és estimat que l'all és el que conté major concentració de compostos ensofrats. (Alimentación Sana, Mèxic)

5.1. Formació de l'al·licina

L'al·licina no la trobem en l'all fresc, sinó que ha de reaccionar l'al·liïna per tal de formar-se.

Posant en situació, l'al·licina només es forma quan l'alinasa, enzim, i al·liïna, substrat, que es troben en compartiments diferents, es posen en contacte i reaccionen. Per tant, per donar lloc l'al·licina es requereix una lisi cel·lular prèvia. (D.P. Ilic, 2011)

Per tant, durant la formació d'aquesta, tenim de substrat l'al·liïna, que es troba al citoplasma.

D'altra banda, tenim l'enzim alinasa, que es localitza a l'interior del vacúol. (L. Díaz, 2008)

Quan el bulb és triturat o tallat, es produeix una lisi cel·lular. Arran d'això, i amb la necessitat d'existència d'aigua, l'enzim alinasa amb l'ajut de la sintasa lacrimògena (LFS) s'alliberen al citoplasma i es troben amb l'al·liïna. (M. Egbobor, 2007)

L'alinasa comprèn el 10% del material proteic soluble de l'all. Aquest enzim s'activa a un pH de 4'5 a 9, sent el seu punt òptim de 7, tot i que s'inactiva irreversiblement a un pH de 3 o inferior. La temperatura a la qual l'enzim alinasa treballa millor és dels 25 a 40 °C. (S. Chhabria et al., 2016)

Un cop l'**al·liïna**, S-al·lil-L-cisteïna sulfòxid, entra en contacte amb l'enzim alinasa, té lloc una deshidratació, pèrdua d'aigua, i, alhora, una reacció d'oxidació. Quan l'alinasa, que conté fosfat piridoxal (grup prostètic que es troba lligat a alguns enzims) entra en contacte amb l'al·liïna, és transformada en àcid al·lil sulfènic, àcid pirúvic i amoníac. (Figura 12)

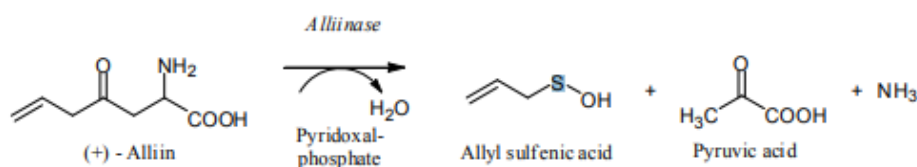


Figura 12: Primera fase de la reacció. (D.P. Ilic et al., 2011)

L'àcid al·lil sulfènic és molt inestable i molt reactiu a temperatura ambient. Arrel de la deshidratació, dues molècules d'àcid al·lil sulfènic es condensen, i, per dimerització, s'uneixen formant l'al·licina. (Figura 13) (D.P. Ilic et al., 2011)

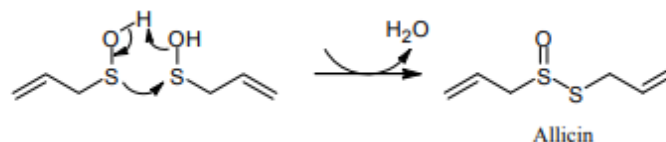


Figura 13: Segona fase de la reacció, formació de l'al·licina. (D.P. Ilic et al., 2011)

De fet, l'al·licina comprèn el 80% dels tiosulfats formats, perquè, a part d'ella, es forma l'al·lil-SS(o)-metil, 6-16%, metil-SS(O=al·lil, 3-9%, trans-1-propenil-SS(O)-al·lil, 1-7%.

Un cop té lloc aquesta reacció, que és molt curta, en menys de 2 minuts es metabolitza el 80 % de l'al·licina (B. Bojalil, 2013), es forma l'al·licina, tiosulfat d'al·lil, i també, en petites quantitats elementals de la primera fase de la reacció, amoníac i àcid pirúvic.

Un cop l'al·licina es forma, per culpa de la seva inestabilitat, es transforma i deriva en diferents compostos sulfurats que, segons Hughes i Lawson, al 1991, la manca d'al·licina en un extracte de qualsevol bulb, fa que aquest es torni ineficaç davant soques bacterianes.

5.1.1. Metabòlits de l'al·licina

L'al·licina, alhora que és inestable i volàtil, pot derivar i transformar-se en altres compostos sulfurats. Els tiosulfats, oxoanions de sofre (S_2O_3), entre ells l'al·licina, són compostos molt reactius i experimenten un gran nombre de variacions que depenen de les variables de pH, temperatura i les condicions d'extracció.

Els al·lil-S-tiosulfats, com l'al·licina són considerats els menys estables de l'all perquè tendeixen a formar tioacroleïna i al·lil mercaptà, com a intermediaris de les transformacions posteriors.

De fet, l'al·licina es transforma en altres compostos ensofrats com el sulfur, disulfur i trisulfur dial·lilic, tiols i anhídrids sulfurosos. (Harris et al., 2001)

D'altra banda, els tiosulfats, destacant-hi l'al·licina, quan es barregen amb aigua, com el solvent de la meua part experimental, es transformen, a través d'una reacció més aviat lenta, en trisulfur de dial·lil, disulfur de dial·lil i al·lil metil, és a dir, en polisulfurs. Aquests són ja més estables. (M. De los Angeles Betancourt, 2010)

Per tant, la degradació de l'al·licina (Figura 14) deriva a compostos com disulfur de dial·lil, polisulfurs de dial·lil, trisulfurs de dial·lil.

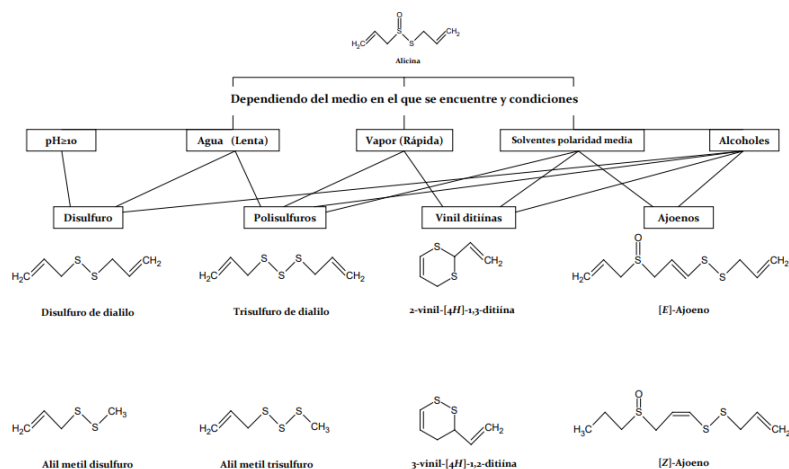


Figura 14: Taula que mostra les principals transformacions de l'al·licina. (L.D. Dawson, 1983)

5.2. Capacitat antimicrobiana

L'al·licina té un fort efecte antimicrobià, aquesta té com a molècula diana l'RNA del bacteri, on és capaç d'inhibir la seva total síntesi, conseqüentment, és capaç d'inhibir la síntesi de proteïnes, el procés de traducció no s'arriba a esdevenir. A més, en menor mesura, també inhibeix la del DNA. També és capaç de modificar la biosíntesi de lípids. (D. Bender, 2013).

De fet, la susceptibilitat bacteriana depèn de les diferències estructurals entre bacteris, ja que els polisacàrids i lípids situats a la paret cel·lular tenen un efecte sobre la permeabilitat envers l'al·licina. Aquests dos constituents varien en els bacteris gramnegatius i els grampositius, on aquests primers mostren un 15-20% de polisacàrids i 10- 20% lípids, en canvi, aquests últims contenen un 45% de polisacàrids i 2% de lípids. Per tant, poden ser responsables de la divergència de la susceptibilitat a l'al·licina entre soques gram-positives i soques gram-negatives. (M. Egbobor, 2013).

A més, actua contra els grups tiol (aquells que el seu grup funcional ve constituït per un àtom d'hidrogen i un de sofre) lliures, que influeixen en la biosíntesi del colesterol dels enzims, com l'alcohol deshidrogenasa, la tioredoxina reductasa i l'RNA polimerasa. (Rahman, 2007)

6. L'ESPECTREFOTÒMETRE

El creixement de microorganismes unicel·lulars en un cultiu es pot determinar mitjançant mesures de terbolesa o dispersió de la llum.

L'espectrofotòmetre és l'instrument que he utilitzat durant la part pràctica per quantificar el creixement bacterià en un medi líquid.

Aquest procés, d'anàlisi físico-químic, s'utilitza per determinar la quantitat d'energia radiant que emet un sistema, substància/microorganisme, donada una longitud d'ona predeterminada.

L'espectrofotòmetre ens proporciona una dada, la taxa d'absorbància (**Figura 14**), és a dir, la quantitat de llum absorbida pel sistema subjecte a l'anàlisi.

L'absorbància és directament proporcional a la quantitat de cèl·lules que es troba dins el cultiu, quan més n'hi ha, major és el grau de terbolesa, fent que la dada que ens proporciona l'espectrofotòmetre, fixant-nos en la fórmula, sigui major.

Per tant, a partir d'aquest mètode, s'ha pogut determinar la concentració de bacteris dins un medi de cultiu, al llarg del temps.

$$A_{T,\lambda} = \log \frac{P_0}{P}$$

Figura 14: Fórmula de l'absorbància:

A és l'absorbància total

P_0 : és la intensitat de llum abans de travessar la mostra

P: és la intensitat de llum després de travessar-la

MARC PRÀCTIC

7. METODOLOGIA

Per tal de poder analitzar l'eficàcia d'extractes d'all i ceba envers soques bacterianes, i, per tant, poder verificar o desmentir les propietats d'aquests, s'ha realitzat una part pràctica.

Per poder dur a terme els experiments, ***l'IMIM de Barcelona***, Institut de l'Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, em va concedir el seu laboratori un total de 5 dies sota la supervisió, tutoratge i ajuda d'en Raul Peña.

Tot i que la meua idea principal era provar l'eficàcia dels extractes amb al·licina davant de soques de l'E. Coli, finalment, vaig decidir enfocar-ho d'una altra manera diferent, ja que per internet es citava que l'al·licina era bactericida davant l'E. Coli. Però, d'altra banda, l'aplicació d'aquests extractes en algun àmbit, medicina o conservació d'aliments, no era molt concreta. És per això que en comptes de corroborar la informació trobada, vaig anar mig pas més enllà i vaig seleccionar soques aleatòries.

Paral·lelament, en un inici, tenia pensat fer antibiogrames, amb els disquets difusors, de manera que, depenent de l'halo que es formés davant el creixement del bacteri, determinaria l'eficàcia de l'extracte. Tot i així, informant-me millor, em vaig adonar que el que realment m'interessava, entre d'altres coses, era estudiar l'al·licina, el principi actiu dels extractes. En altres paraules, poder analitzar i estudiar el creixement bacterià sotmès a l'extracte al llarg del temps.

De tal manera que, la opció més interessant i efectiva era la de l'espectrofotòmetre. És a dir, la quantificació dels microorganismes cada 1'5 hores, al llarg del temps.

Seguidament, el disseny experimental:

OBJECTIUS • Aïllar microorganismes i caracteritzar els bacteris mitjançant la microscopia òptica • Elaborar extractes d'all i ceba • Estudiar les propietats antibiòtiques d'extracte d'all i ceba, bullits i sense • En cas que sigui positiu, comprovar de quin espectre són, amb 12 soques més • Determinar les propietats químiques de l'al·licina • Determinar un ús específic per aquest extracte
PREGUNTES: • Els agents microbians de l'all i la ceba són eficaços? • Són els extractes d'al·licina, d'ampli o de reduït espectre? • Són efectius en la conservació del tomàquet?
HIPÒTESI • Potser els extractes d'all i de ceba tenen un poder bactericida • Potser l'extracte d'all es pot utilitzar per a la conservació d'aliments
VARIABLE INDEPENDENT • Les diferents concentracions d'extracte d'all i de ceba al medi líquid • Diferents tipus de soca
VARIABLE DEPENDENT • Creixement o inhibició bacteriana al llarg del temps.
CONTROL DE VARIABLES • El mateix medi de cultiu, procediment, intervals de temps en el recapte de dades, la temperatura, llum.
LIMITACIONS • No disposar de materials per fer la tinció de gram, i, per tant, no poder caracteritzar millor les soques. Alhora que no s'ha pogut relacionar els resultats finals amb els de les tincions. • No poder quantificar l'al·licina, ni haver fet una extracció més pura d'aquesta.

Abans de començar, he afegit poques imatges a la metodologia però, n'hi ha més a l'**ANNEX E**.

7.1. Elaboració del medi sòlid

Per començar la part pràctica, es necessitaven preparar els medis per recollir les mostres bacterianes.

El material necessari per fer medi de cultiu sòlid.

- Un envàs de pyrex de capacitat de 75cl
- 10 g de peptona 5 g d'extracte de carn soluble
- 5 g de clorur de sodi
- 1 l d'aigua

S'esterilitza el preparat, s'aboca a les plaques i es deixa solidificar.

7.2. Sembra i aïllament per estriat

Aquesta pràctica consistia en sembrar mostres a 4 plaques de petri i, posteriorment, aïllar-les per estriat.

La procedència de les mostres és la següent:

- La mostra 1, empremtes dactilars.
- La 2, del fregall de la cuina.
- La 3, de la pell d'un tomàquet.
- La 4, de l'aixeta d'un bany públic.

S'incuben durant 48 hores a 37 graus.

Transcorregut el temps, s'aïllen colònies del cultiu mixtes i es sembren per estriat. **(Figura 15)**

Es deixen a incubar 48 hores.

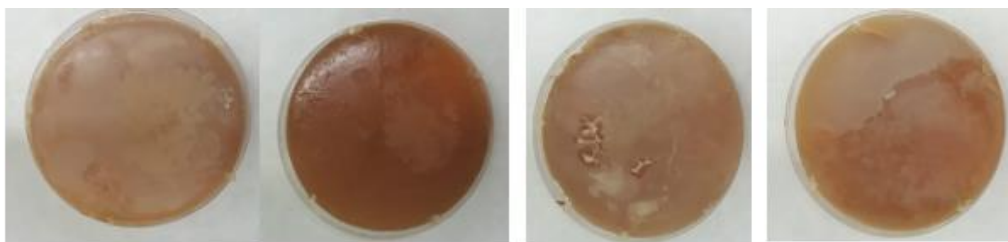


Figura 15: Mostres de l'1 a la 4 al cap de 24 hores incubades, encara mostren poc creixement

7.3. Elaboració dels extractes d'all i ceba

L'extracció d'al·licina, validada pel *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de Monterrey* (L. Díaz, 2008), es realitza amb màquina HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*. Aquesta separa aquells compostos químics d'alt pes molecular que presenten alta volatilitat i no poden separar-se mitjançant una cromatografia de gasos. És un important mètode analític que separa i quantifica components de mostres líquides.

Tot i això, no comptàvem amb màquina HPLC i en fer recerca, vaig trobar un mètode que també utilitzava l'HPLC, però en l'últim estadi de l'extracció, de tal manera que, vaig seguir el un procediment semblant (S. Santoyo, 2006). No va ser calcat, ja que es van anar fent variacions en la concentració de solvent en la qual dissoldre els compostos de l'all i la ceba. Malauradament, l'al·licina quedaria molt diluïda, però tot i això, es seguiria conservant i mantenint, adquirint el nom d'extracte, perquè és una substància concentrada en un solvent, aigua, i aquesta és provinent d'una planta, all i/o ceba.

Pel que fa a l'extracte es va seguir el següent procés.

Es pela un bulb d'all i es parteix en dos, 0'75g cada un. Es duu a terme el mateix amb la ceba.

Fet això, s'esmicolen els trossos amb un bisturí, perquè quan s'afegeixin a l'homogeneïtzador (**Figura 16**), ofereixin la menor resistència possible.

Un cop es tenen tallades les 4 porcions, una a una es posen a l'homogeneïtzador amb 3ml de solvent, l'aigua.

La funció de la homogeneïtzador, compost per l'èmbol i un tub semblant al d'assaig, és trencar els teixits durs cel·lulars, i, per tant, produir la seva lisi cel·lular. Això farà entrar en contacte l'alinasa, del vacúol, amb l'al·liïna, del citoplasma, per formar l'al·licina.



Figura 16: Homogeneïtzació

Seguidament, es fan 10 tongades d'aixafament amb l'èmbol. Passades aquestes, es posa el tub al *Vortex*, un agitador mecànic que facilita la descompactació.

Un cop l'extracte compost pels 3 ml de solvent i els 0'75 g de bulb lisat agafa un color groguenc, a causa del trencament de cèl·lules, la mescla es diposita dins un tub de centrifugació.

Reposen 20 minuts a temperatura ambient.

Tot seguit, els 2 tubs es deixen a la centrífuga a 3500 rpm durant 10 minuts, per poder extreure el sobrenedant del sòlid, bulb, precipitat.

Es separa el sobrenedant del precipitat amb un pipetejador, i cadascun l'afegim en un altre tub d'Eppendorf.

Dels 2 extractes, all més aigua i ceba més aigua, es separa cada un en 2 tubs amb la mateixa quantitat d'extracte, un es bullirà i l'altre no (Figura 17), amb l'objectiu de determinar si l'al·licina a temperatures altes es volatilitza i si l'extracte perd funció antibacteriana.

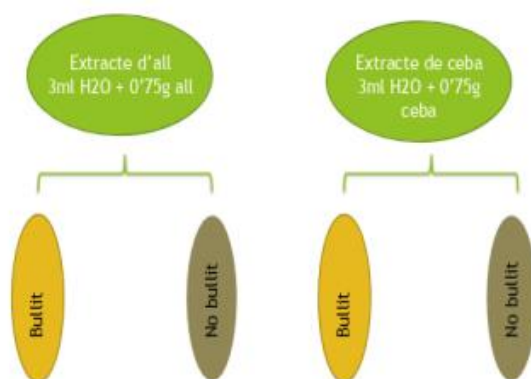


Figura 17: Esquema simplificat dels extractes. 1'5ml cada un

Després, es reserven a la nevera, perquè no es degradi al·licina.

El resultat final dels extractes conté compostos organosulfurats, el 80% d'aquests, al·licina. (M. Esperanza, 2013, p.34) i compostos que per si mateixos tenen els bulbs, carbohidrats, ferro, calci, aigua, entre altres.

7.4. Comprovar l'efecte antibiòtic d'extractes d'all, ceba i combinats.

En aquest experiment, es comprova la propietat antibiòtica dels extractes preparats anteriorment.

De les mostres agafades, es van aïllar 1 soca (**Figura 18**) (**ANNEX A I B**) duent a terme dues vegades l'estriat per tal d'obtenir un cultiu pur.



Figura 18: Soca seleccionada per l'experiment

Es sembla una colònia de la soca dins un medi líquid i es deixa incubar 5 hores, fins que s'observa creixement visualment, per terbolesa.

El medi de cultiu utilitzat és lleugerament diferent al del sòlid. És el mateix que s'utilitzarà a tots els experiments posteriors. Compost per un 66% d'LB i 34% de *Terrific*.

Medi LB per cada litre d'aigua	Medi <i>Terrific</i> per cada litre d'aigua
10 g peptona	11'8 g de peptona
5g d'extracte	23'6 g d'extracte de llevat
5 g de Clorur de sodi	9'4 g de dipotassi hidrogen fosfat
	2'2 g de potassi dihidrogen fosfat

Un total de 190 ml de medi líquid es reparteixen mitjançant una pipeta de 10ml a 19 tubs, cada un rep 10ml. (**Figura 19**)

A cada un d'aquests, menys a un, s'inoculen 100µl de bacteris (que s'havien incubat durant 5h), és a dir un 1%. A partir d'aquí tenim:

CONTROL POSITIU

- Un dels tubs serà el **control positiu**, aquell on es deixa el medi junt amb l'inòcul de bacteri creixent lliurement.

EXPERIMENTS EXTRACTES NO-BULLITS

- Tres tubs de medi, inòcul de bacteris i dissolucions de 100, 50 i 25 µl d'extracte d'all, de fet fa referència a 1, 0'5 i 0'25% respectivament.
- Tres tubs de medi, inòcul de bacteris i dissolucions de 100, 50 i 25 µl d'extracte de ceba, de fet fa referència a un 1, 0'5 i 0'25%.
- Tres tubs de medi, inòcul de bacteris i dissolucions de 100, 50 i 25 µl, de cada un dels extractes d'all i ceba mesclats.

EXPERIMENTS EXTRACTES BULLITS

- Tres tubs de medi, inòcul de bacteris i dissolucions de 100, 50 i 25 µl d'extracte d'all bullit, de fet fa referència a un 1, 0'5 i 0'25% respectivament.
- Tres tubs de medi, inòcul de bacteris i dissolucions de 100, 50 i 25 µl d'extracte de ceba bullida, de fet fa referència a un 5%, 2'5% i 1'25%.
- Tres tubs de medi, inòcul de bacteris i dissolucions de 100, 50 i 25 µl, de cada un dels extractes d'all i ceba bullits mesclats.

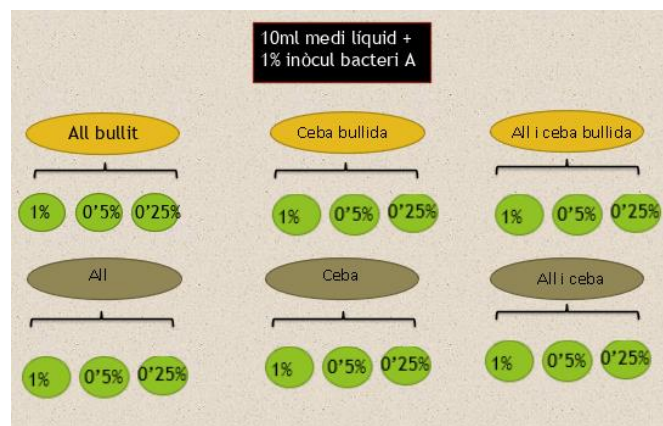


Figura 19: Representació gràfica de l'experiment

Un cop tots els tubs contenen l'antibiòtic, es deixen incubar a l'agitadora, a 37 °C.

Cada 1'5 hores, de cada tub s'extreuen 100 µl del contingut amb un pipetejador i es diposita a una microplaca (**Figura 20**), i així, successivament amb els 19.



Figura 20: Microplaca

Un cop es tenen els 19 forats de la microplaca omplerts, aquesta s'introdueix a l'espectrofotòmetre, on ens proporcionaran les dades d'absorbància.

La longitud d'ona amb la que es configura l'espectrofotòmetre és de 600 nm, aquesta forma part de l'espectre groc ataronjat de llum visible, és la més usual a l'hora de quantificar microorganismes.

Aquestes dades (**ANNEX D**) s'agafen a les 1'5h, 3h, 4'5h, 6h 22h i 24'5 h. La diferència abismal entre les 6 hores i les 22 hores és que l'horari de la concessió era limitat, perquè no ho podia fer fora d'horari establert.

7.5. Recollida de mostres, aïllament i caracterització de 12 colònies

Un cop feta la primera pràctica i havent analitzat les dades, ens centrem en l'all, l'únic que havia mostrat certa inhibició del creixement. I, d'aquest, es vol determinar l'espectre el seu espectre.

Es tornen a cultivar mostres domèstiques (**ANNEX A i B**) de microorganismes, als dos dies, incubades a 37°C, s'observen colònies molt diverses. (**Figura 21**)

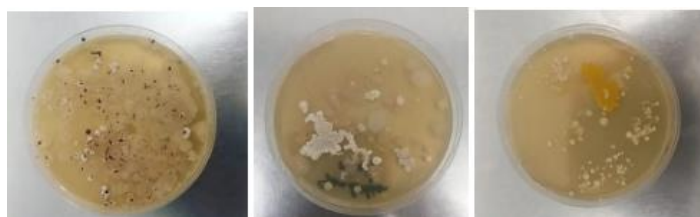


Figura 21: Algunes de les mostres preses.

S'aïllen un total de 12 soques, on un cop aïllades per estriat, cal assegurar-se per microscopia òptica de 100x que els microorganismes aïllats siguin bacteris.

7.6. Comprovar l'efecte de l'all en les 12 soques aïllades

Havent observat que l'extracte d'all sí mostrava efectes antibiòtics, vaig decidir comprovar el seu efecte sobre 12 diferents soques bacterianes. D'aquesta manera, podria saber si és d'ampli o reduït espectre, i, per tant, limitar el seu ús, sigui en àmbit clínic, o bé, en altres alternatives com en la conservació d'aliments.

L'experiment manté les variables de l'anterior experiment.

S'inoculen 10 ml de medi de cultiu en un total de 12 pots. **(Figura 22)** En aquests, a cada un sel's sembra una colònia d'1 soca, repetint-se el procés fins a les 12. Es deixen incubant 5 hores.

D'altra banda, s'agafen 24 pots, s'inoculen 10 ml de medi a cada un. Aquesta vegada, en comptes de cultivar 100 µl (1%), se'n sembren 150 (1'5%) a cadascun, ja que el creixement que s'havia produït en 5 hores a l'experiment anterior, no era igual que en aquest.

Els tubs s'organitzaran de la següent forma.

- **2 tubs per colònia**, de tal manera que, un d'aquests conté 10 ml de medi de cultiu més l'inòcul de bacteris al 1'5%, creixent lliurement, **la control**, i l'altre tub contindria **els 10 ml de medi, 150 µl d'inòcul de bacteri (1'5%) i 100 µl d'extracte d'all (1%)**, és a dir, igual que la concentració més alta del primer experiment.

Fet això, es deixen incubar, i a les 1'5h, 3h, 4'5h, 6h, 22h i 24'5h, es prendran les dades a l'espectrofotòmetre. **(ANNEX D)**



Figura 22: Sembrar el medi als 24 pots

7.7. Comprovar si a major concentració, major inhibició

L'últim dia de pràctiques a l'IMIM, després d'haver observat els resultats de l'anterior pràctica, em vaig adonar que, les propietats antibiòtiques de l'extracte d'all es seguien repetint en algunes soques.

De tal manera que, amb el poc extracte que quedava, vaig decidir observar si, en augmentar les concentracions d'extracte all, aquest mostrava més inhibició.

La soca escollida per fer-ho va ser la del primer experiment, doncs era de la que disposàvem més dades.

Va consistir en el següent:

- 1 tub control amb l'inòcul de bacteris, 100 µl.
- 4 tubs amb concentracions diferents d'extracte de 0'5, 1, 3 i 6% .

Un cop preparats es deixen incubant-se i a les 1'5, 3, 4'5, 6, 22 i 24'5 h, es prenen les dades amb l'espectrofotòmetre.

7.8. Comprovar si l'extracte d'all podria actuar com a conservant

Un cop redactant tota la part pràctica i analitzant extensament els resultats vaig pensar que l'extracte d'all podria funcionar millor com a conservant d'aliments que no pas un altre ús.

En conseqüència, vaig idear un petit i senzill experiment que va constar del següent:

S'agafa un tomàquet i es talla en 5 llesques. (Figura 22)

- 3 llesques s'impregnen d'extracte d'all cada 6 hores
- 2 llesques s'impregnen d'aigua, i ens serveix com la control

L'experiment té lloc a temperatura ambient, 25 graus.



Figura 22: Les 5 llesques de tomàquet

8. ANÀLISI DE RESULTATS

Totes les dades recollides a l'espectrofotòmetre s'han representat mitjançant gràfics.

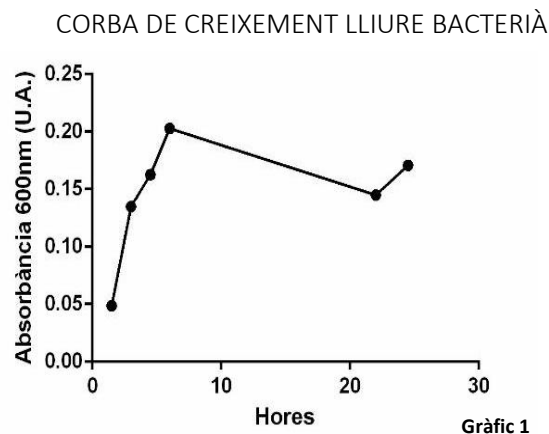
Per dur a terme l'anàlisi de resultats, he fet subapartats on cadascun d'aquests pertany a cada un dels experiments que he fet.

Al llarg dels gràfic, a les llegendes apareix LB, aquest fa referència al medi de cultiu, i, la B fa referència a l'inòcul de bacteris de 100 µl (1%) a l'apartat 8.1, i 150 µl a 8.2

8.1. Comprovar l'efecte antibiòtic d'extractes d'all, ceba i combinats.

✓ SOCA CONTROL

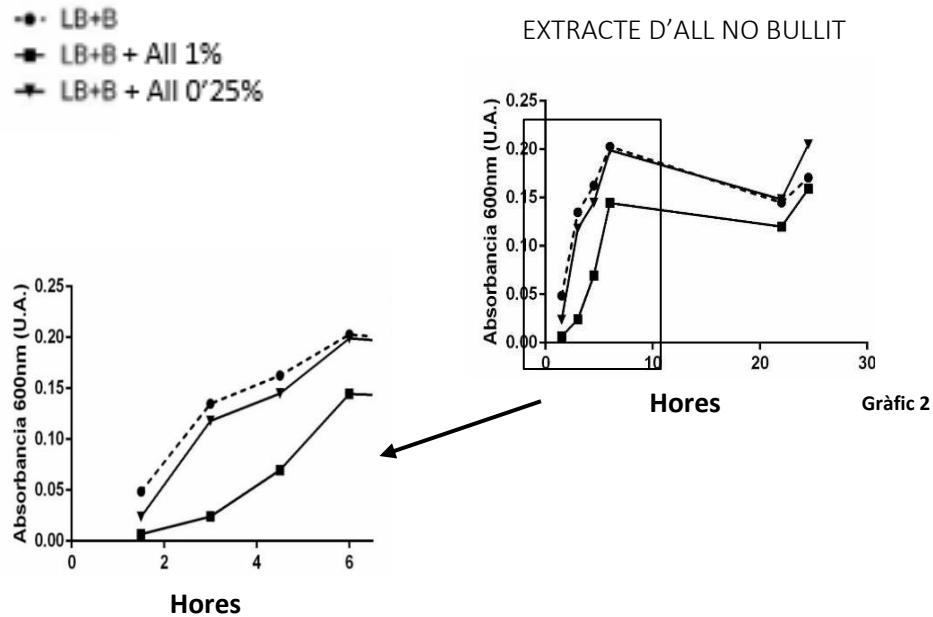
Aquest gràfic fa referència al creixement lliure dels bacteris.



El bacteri no mostra la fase de latència, ja que prèviament venia d'un medi igual, i a l'inocular-lo dins aquest últim, no li ha suposat cap estrès, ja que disposa dels mateixos nutrients, i per tant, de les molècules necessàries per iniciar directament la fase de creixement exponencial.

El creixement exponencial es mostra clar de les 1'5 a les 7 hores, seguidament, entra en fase estacionària fins on tenim dades.

✓ **EXTRACTE D'ALL NO BULLIT**



En aquest gràfic, manca la concentració de 0'5%, sí es va fer però no la vam seleccionar bé, i, malauradament, m'he adonat un cop fent l'anàlisi de resultats. No l'he pogut recuperar.

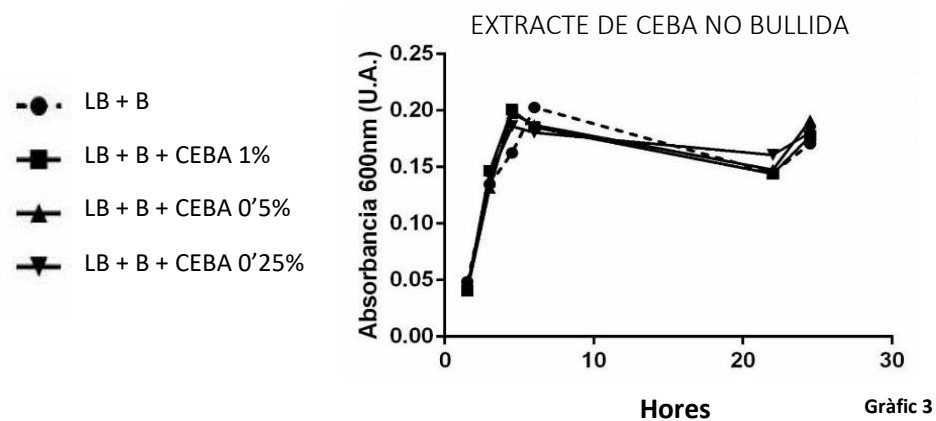
L'all mostra una capacitat antibacteriana, on la concentració mínima inhibidora, tal com es veu representada, ronda l'1%.

Sembla ser que l'extracte d'all sigui un retardador de l'adaptació i/o creixement, és a dir, és un bacteriostàtic que, un cop el bacteri es torna a adaptar, o bé, quan la concentració d'al·licina baixa per la seva degradació, torna a créixer gairebé com la control.

A més, és un indicador del que venim explicant fins ara a la part teòrica, i és que l'al·licina és bastant reactiva i inestable, de manera que, arriba un moment on s'acaba transformant en altres compostos sulfurats que no són tòxics per als bacteris.

Per tant, l'extracte deixa de tenir efecte, alhora que els bacteris podrien arribar a metabolitzar aquests derivats sulfurats, ja que no són antibiòtics.

✓ **EXTRACTE DE CEBA NO BULLIDA**

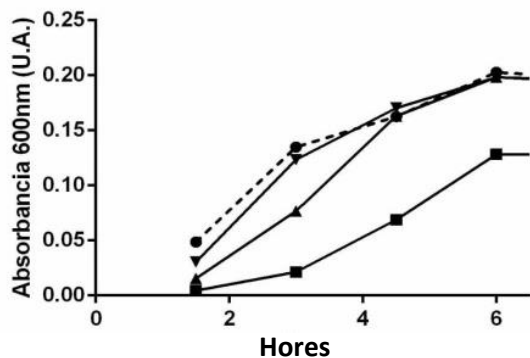


En aquest gràfic es mostra que l'extracte de ceba no té poder antibiòtic, ja que en els medis amb extracte els bacteris mostren un creixement igual que la control, és a dir, tots creixen solapats amb la control sigui quin sigui la concentració de la ceba. Aquest fet es pot deure a que, la quantitat d'al·licina que conté per gram la ceba és molt baixa.

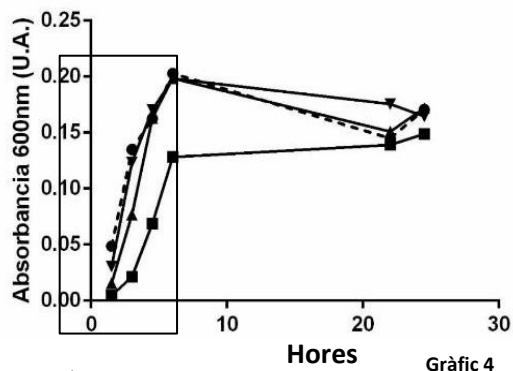
Això vol dir que, mentres amb la realització d'extracte d'all, l'al·licina s'ha pogut obtenir, i per tant, ha pogut inhibir el creixement bacterià, a l'extracte de ceba l'al·licina obtinguda ha sigut menor, més diluïda.

✓ **EXTRACTE D'ALL I DE CEBA NO BULLITS**

- LB + B
- LB + B + ALL + CEBA (1% CADA UN)
- ▲ LB + B + ALL + CEBA (0'5% CADA UN)
- ▼ LB + B + ALL + CEBA (0'25% CADA UN)

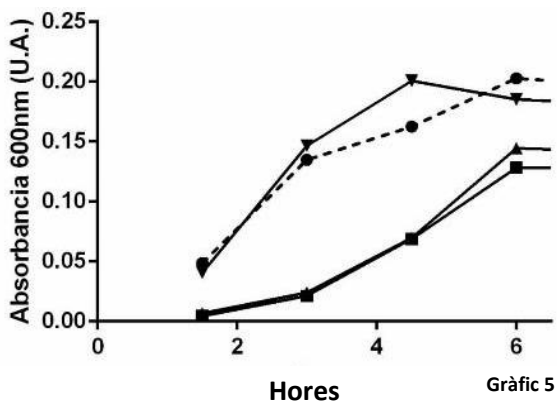


EXTRACTE D'ALL I DE CEBA NO BULLIDA



EXTRACTE D'ALL, DE CEBA I AMBDÓS NO BULLITS
A 1%

- LB + B
- ▲ LB + B + ALL 1%
- ▼ LB + B + CEBA 1%
- LB + B + ALL + CEBA (1% CADA UN)



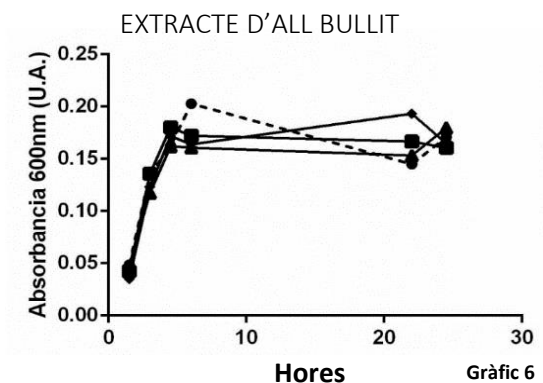
Al gràfic superior, es mostren els resultats dels extractes mesclats, d'all i de ceba, a 1% cadascú, a 0'5% cada un i a 0'25.

Al gràfic inferior es mostra una comparativa de tres línies de creixement sotmesos a 1% d'extracte de diferents gràfics. S'inclou el de l'all, el de ceba i els d'ambdós.

Es pot observar que, tant l'all com l'all i ceba junts, fan el mateix efecte bacteriostàtic, ja que en el segon gràfic les dos línies es solapen. Per tant, assumim que la ceba no té propietat antibiòtica, i qui ha retingut el creixement ha sigut únicament l'all.

✓ EXTRACTE D'ALL BULLIT

- LB + B
- ▲ LB + B + ALL BULLIT 1%
- ▼ LB + B + ALL BULLIT 0'5%
- LB + B + ALL BULLIT 0'25%

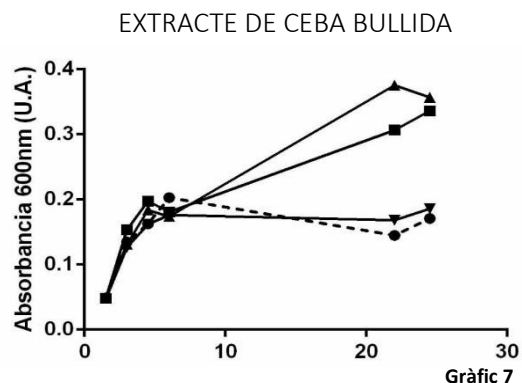


En aquest gràfic, es mostra que l'all bullit no és antibiòtic en cap de les 3 concentracions.

S'interpreta que a temperatures altes, l'al·licina es volatilitza, és termolàbil, de manera que l'extracte perd aquesta propietat antibiòtica que li aporta l'al·licina.

✓ EXTRACTE DE CEBA BULLIDA

- LB + B
- ▲ LB + B + CEBA BULLIDA 1%
- ▼ LB + B + CEBA BULLIDA 0'5%
- LB + B + CEBA BULLIDA 0'25%



En aquest gràfic no es mostra cap activitat antibiòtica.

Tot i això, les dades de l'1 i el 0'5% són curioses perquè té lloc el potenciament del creixement bacterià, creixen per sobre de la línia de creixement de la control. Tenint en compte que la ceba no té poder antibiòtic tan si utilitzem l'extracte bullit com el que no, una possible explicació és que els bacteris s'aprofitin dels nutrients com dels glúcids que aquest extracte conté, per poder créixer quan els recursos del medi s'estan esgotant.

Tot i així, en el cas de l'extracte de l'all, no s'ha observat aquest potenciament un cop l'al·licina s'havia volatilitzat, potser perquè, tot i les altes temperatures, encara quedava al·licina a l'extracte, és a dir, el suficient per tal de no inhibir, però tampoc potenciar.

Aquesta última premissa ha pogut tenir lloc amb l'extracte de ceba no bullit, on la quantitat d'al·licina era la necessària per tal que no es produïssin cap dels dos processos.

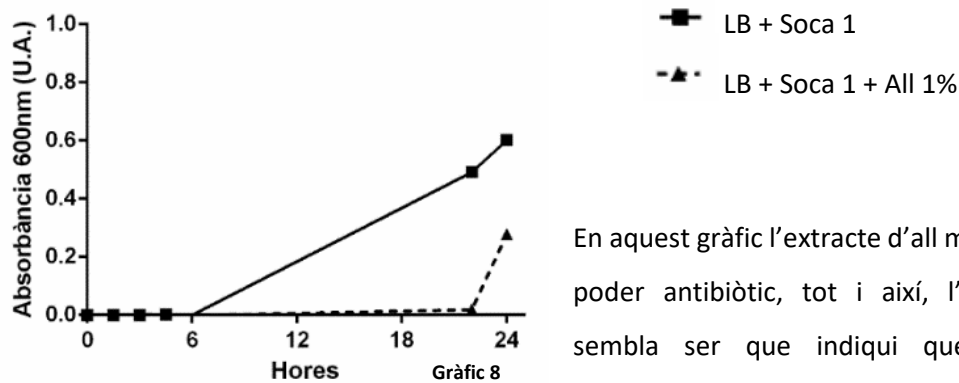
8.2. Comprovar l'espectre de l'all en les 12 soques aïllades

Un cop em vaig adonar que l'extracte d'all era el veritable antibiòtic de la família **Allium**, em vaig centrar única i exclusivament en aquest.

De fet, cal destacar que aquest extracte és el del primer experiment, tot i així, on en l'anterior feia un dia que s'havia fet. En canvi, en aquest experiment, és el mateix extracte, però després d'haver estat conservat, a 10 °C, la seva temperatura òptima de conservació, durant 5 dies.

Pot ser que el fred ajudi o perjudiqui l'extracte i guanyi, o bé, perdi poder antibiòtic.

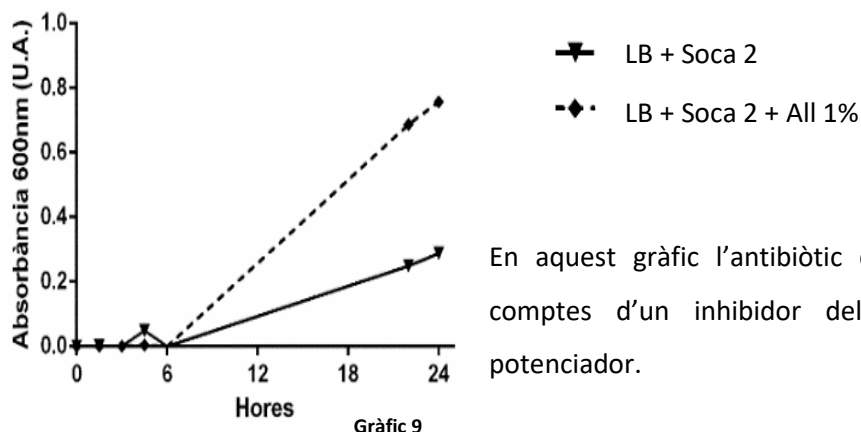
✓ SOCA 1 **Caracterització** Circular, petita, groga i cocs



En aquest gràfic l'extracte d'all mostra un fort poder antibiòtic, tot i així, l'última dada, sembla ser que indiqui que el bacteri començava el creixement exponencial. Tot i

així, pot haver sigut fruit d'un error experimental, o d'una contaminació per part d'un bacteri extern resistent. S'hauria d'haver fet, per comprovar-ho, una sembra d'aquest medi a un medi sòlid i observar quines colònies hi creixien.

✓ SOCA 2 **Caracterització** Circular, petita, crema, cocs.

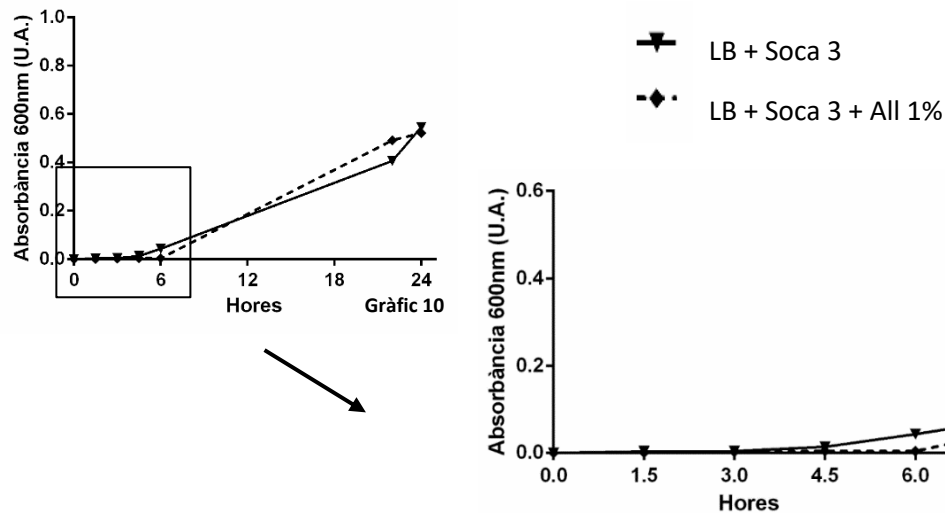


En aquest gràfic l'antibiòtic d'all ha sigut, en comptes d'un inhibidor del creixement, un potenciador.

✓ SOCA 3

Caracterització

Irregular, crema, bacils



En aquest gràfic, a les primeres hores el creixement bacterià és quasi nul, cal tenir en compte que la taxa de creixement i adaptació dels bacteris pot variar, entre les diferents famílies i sometent-los a variables (medi cultiu) no òptimes, o bé, diferents a les habituals. Tot i això, si augmentem el gràfic, la línia de creixement de la soca que conté extracte comença a augmentar a les 6 hores, en canvi, la de la control comença a créixer a les 4 hores.

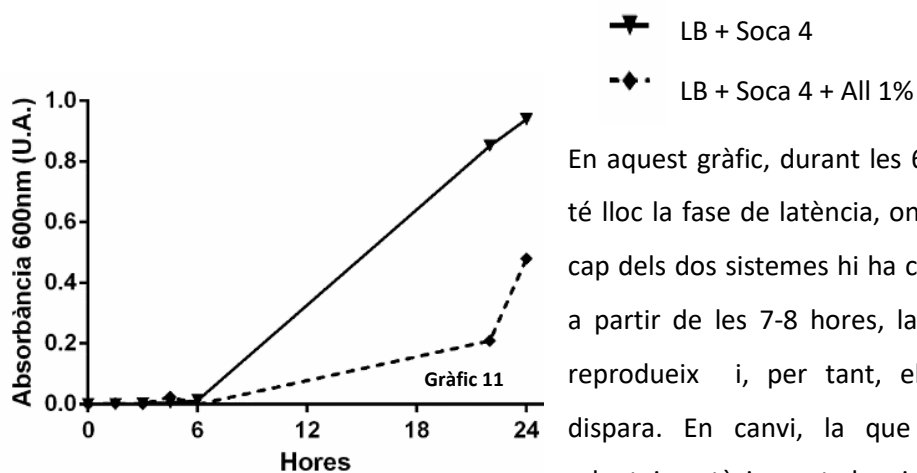
Tot i això, després, la soca creix amb un pendent superior a la soca control fins a igualar-la.

El que ha passat és que l'al·licina ha inhibït el creixement a l'inici, fins aproximadament les 6 hores, i després ha començat a perdre efecte.

✓ SOCA 4

Caracterització

Circular, petita, cocs.

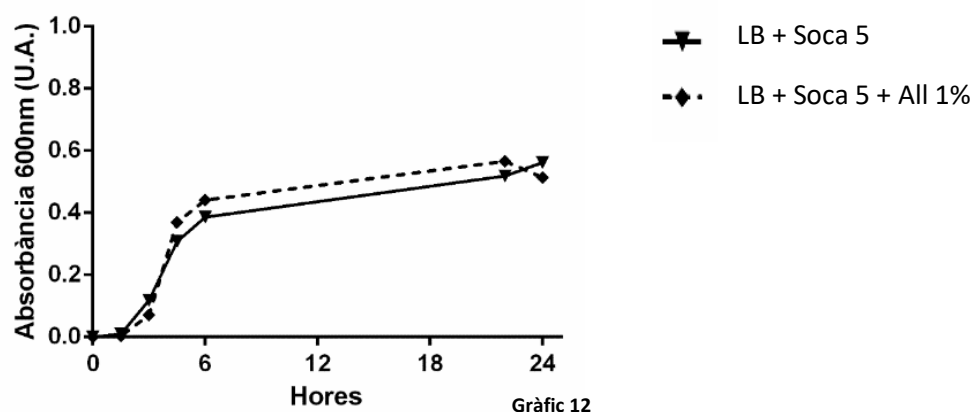


En aquest gràfic, durant les 6 primeres hores té lloc la fase de latència, on pràcticament, a cap dels dos sistemes hi ha creixement, però, a partir de les 7-8 hores, la soca control es reproduïx i, per tant, el creixement es dispara. En canvi, la que conté extracte ralentix notòriament el creixement.

✓ SOCA 5

Caracterització

Puntiforme, gran, bacils



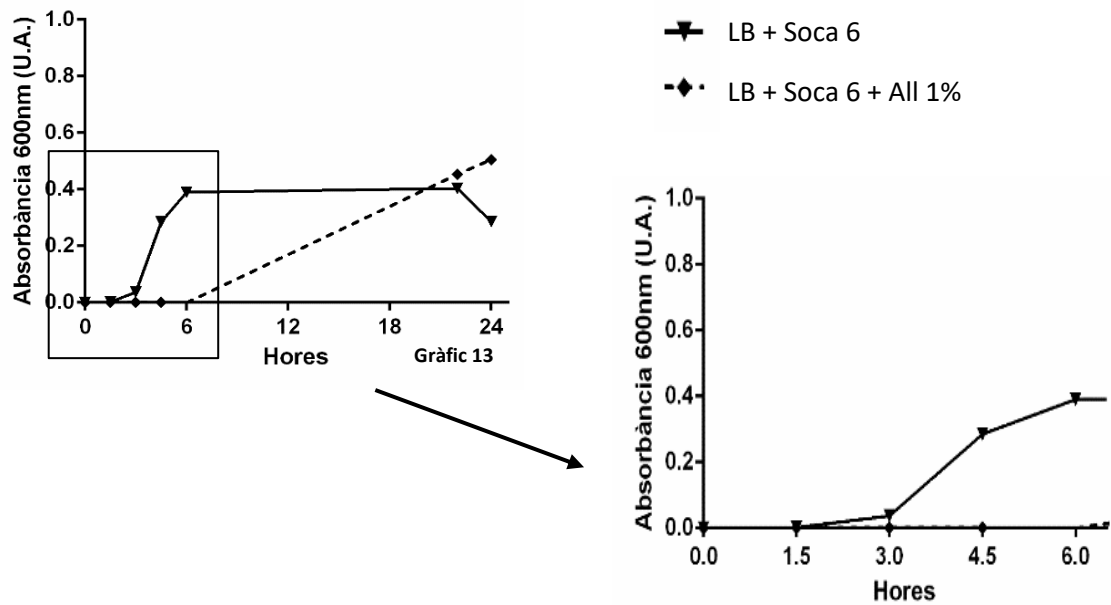
En aquest gràfic, les dues línies de creixement, avancen pràcticament solapades. Per tant, l'extracte d'all no provoca ni reteniment ni potenciament del creixement d'aquesta soca. És a dir, és una soca resistent.

Cal destacar d'aquest gràfic la corba de creixement de la colònia, ja que s'identifiquen ràpidament les 3 primeres fases, de les 0 a les 2 hores, latència, de les 2 a les 6 hores el creixement exponencial, i, per últim, la fase estacionària.

✓ SOCA 6

Caracterització

Filamentosa, gran, bacils



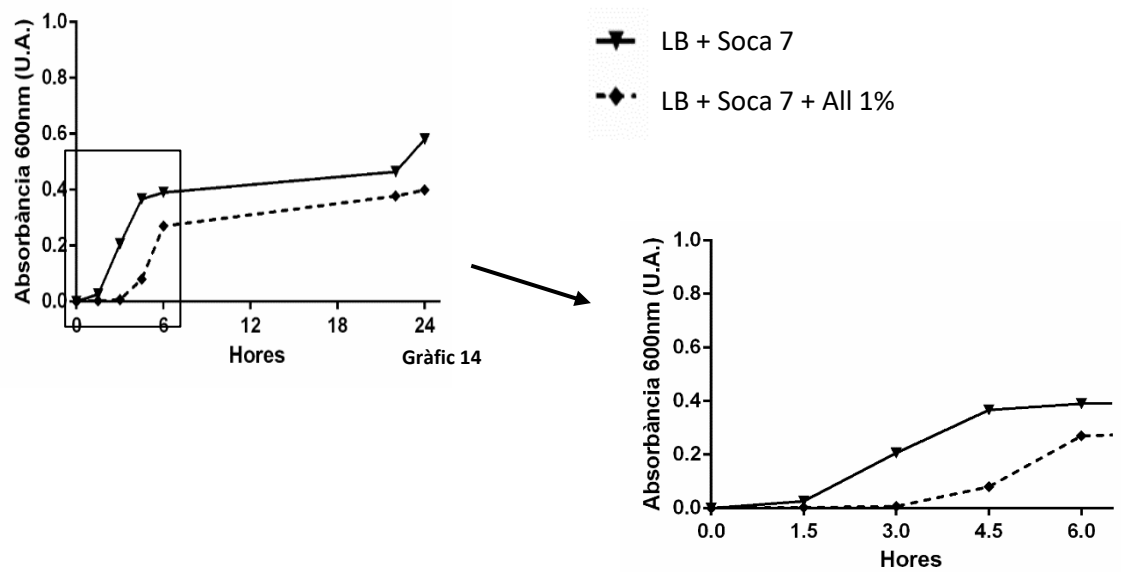
En aquest gràfic, al principi l'extracte d'all té un efecte antibacterià sobre la soca, inhibeix la seva reproducció, però, amb el pas del temps, a partir de les 6 hores, la soca sotmesa a l'extracte, emprèn un creixement, arribant, fins i tot, a sobrepassar la control a les 24 hores.

Cal tenir en compte, també, l'activitat de la soca control, doncs, a les 4 hores sembla entrar a la fase estacionària derivant, a les 24 hores, a l'etapa de mort.

Per tant, es pot dir que, els bacteris de la control, davant un medi poc favorable per ells, o bé, donat un medi on ja han esgotat els nutrients que aquest els hi aportava, han aturat el seu creixement fins arribar a disminuir la seva població.

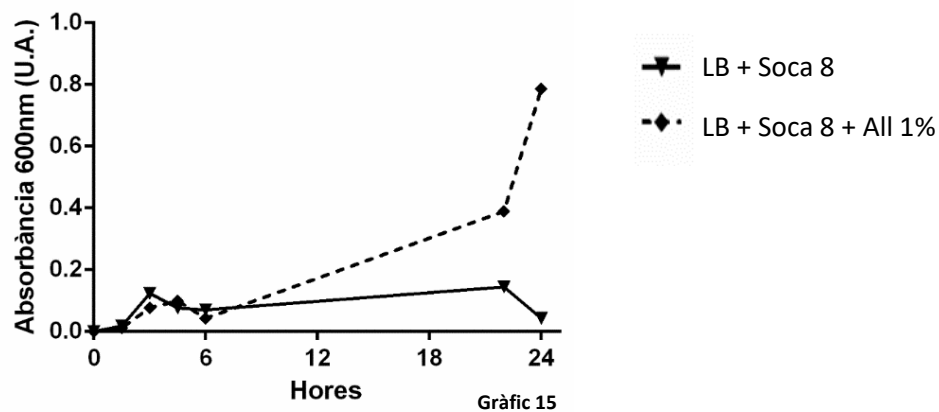
D'altra banda, els bacteris sotmesos a extracte, durant les primeres hores, no han pogut reproduir-se, degut la inhibició que els produïa l'al·licina, fent que, al medi hi quedessin nutrients abundants. Un cop l'al·licina s'ha començat a degradar i esgotar, aquests, davant un medi ric en nutrients, provinents del caldo com dels possibles que conté l'extracte sense al·licina, han emprès un creixement.

✓ **SOCA 7** Caracterització Circular, gran, bacils



En aquest gràfic es mostra una activitat bacteriostàtica per part de l'extracte d'all, però que, a partir de les 3-4'5 hores, quan l'al·licina, s'esgota i es degrada, el creixement de la soca s'activa. Tot i això, mai arriba a igualar a la soca control.

✓ **SOCA 8** Caracterització Irregular, gran, bacil



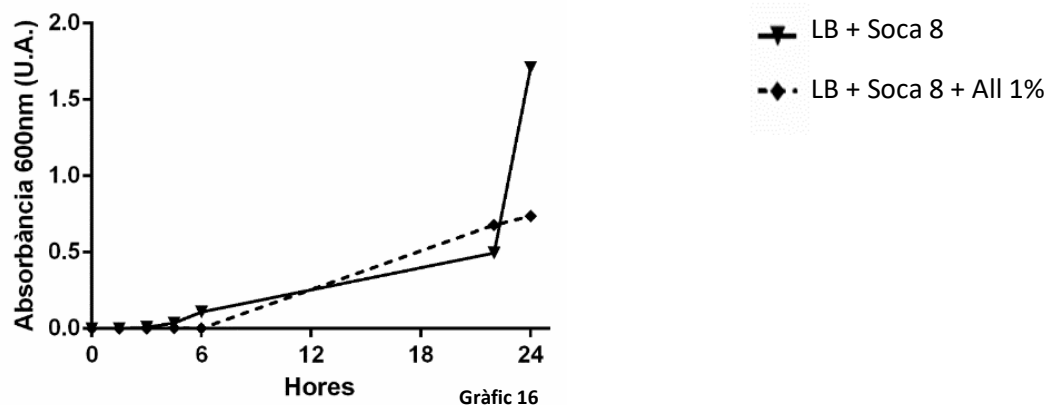
En aquest gràfic es mostra un creixement potenciat de la soca amb extracte respecte el cultiu control.

A les primeres hores, tan la colònia control com la que és sotmesa a l'extracte, creixen solapades. Llavors, és evident que aquest bacteri és resistent a l'extracte, ja que, independentment de l'al·licina, la taxa de creixement és la mateixa.

D'altra banda, a partir de les 6 hores, mentre que la soca control atura el seu creixement, entra en fase estacionària i mort, possiblement perquè es troba a un medi no molt favorable per ella, la soca sotmesa a l'extracte, creix molt per sobre de la control.

Per tant, els bacteris, al ser resistents a l'al·licina i trobar-se en un medi poc favorable, aprofiten els nutrients que li aporta l'extracte, que són semblants a les necessitats nutricional d'un bacteri (carbohidrats, minerals, sofre...) i, d'aquesta manera, poden créixer.

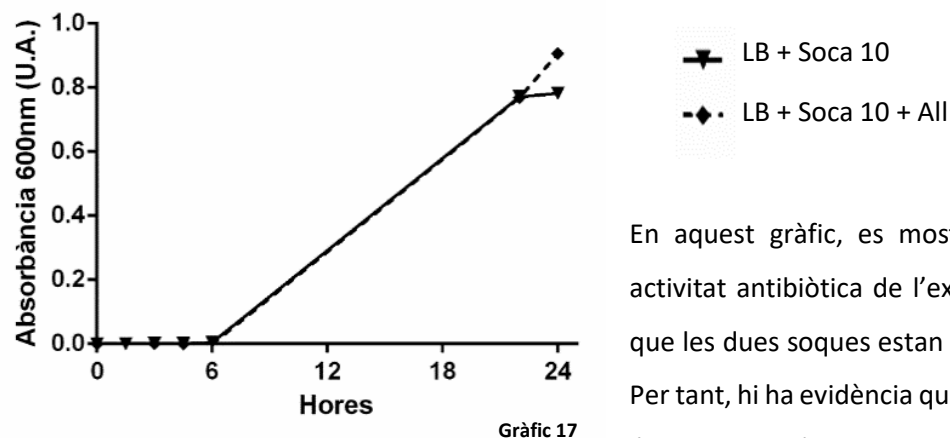
✓ **SOCA 9** Caracterització Circular, petita, cocs



En aquest gràfic, es pot veure com, tant la soca control com la que conté antibiòtic, al principi té lloc una llarga fase de latència. Tot i això, la soca control comença a créixer a les 3 hores, paral·lelament, la soca amb l'antibiòtic no emprèn el creixement fins a les 6 hores. Però, cal destacar que el creixement no s'igualava amb el de la control.

És a dir, que l'extracte mostra una activitat antibiòtica a les primeres hores. Tot i això, a partir de les 6-7 hores, la soca amb extracte comença a créixer, ja que l'al·licina es degrada.

✓ **SOCA 10** Caracterització Circular, petita, cocs



En aquest gràfic, es mostra una nul·la activitat antibiòtica de l'extracte d'all, ja que les dues soques estan superposades. Per tant, hi ha evidència que aquesta soca és resistent a l'al·licina.

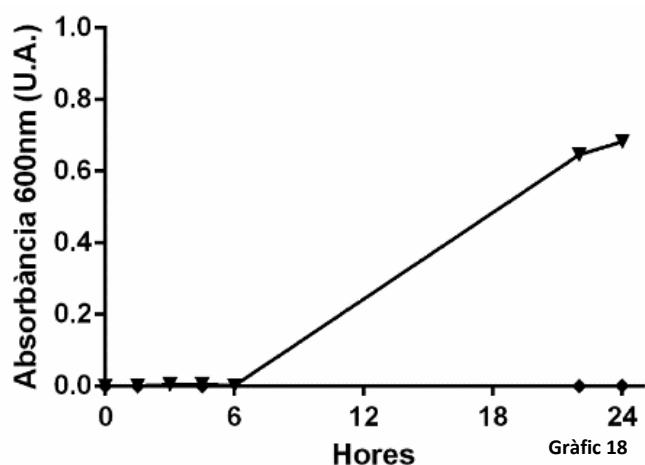
Pel que fa a la dada de les 24 hores, mentre que la soca control entra en fase estacionària, la soca amb extracte segueix creixent.

Per tant, és un reflex on, els nutrients del medi de la control s'han esgotat, però paral·lelament, a l'altra soca hi queden nutrients provinents de l'extracte d'all aprofitables pels bacteris, com l'inulina, el sofre, potassi,... doncs com que són resistents a l'al·licina, no els impedeix la metabolització de l'extracte.

✓ SOCA 11

Caracterització

Circular, petita, cocs



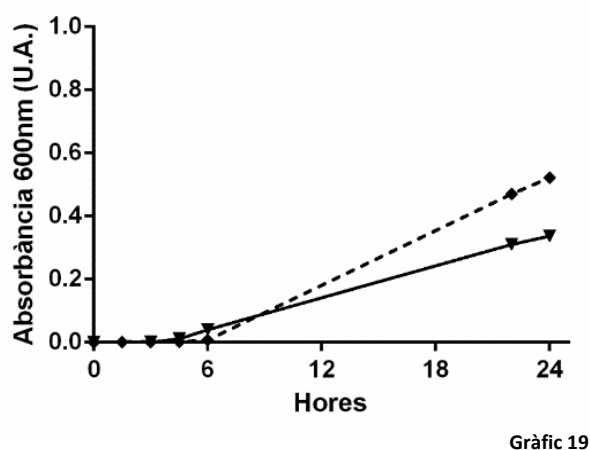
En aquest gràfic es veu com la soca control comença a créixer a les 7 hores. D'altra banda, la soca amb antibiòtic, no creix durant les 24 hores.

Havent vist els resultats de les altres 11 soques, podem interpretar que aquest bacteri ha sigut molt sensible a l'al·licina, aquesta, com s'ha anat reiterant al llarg dels gràfics, inhibeix quasi sempre durant les primeres hores. De tal manera que, com el creixement en aquesta soca, tan en la control com en la que conté extracte, és pràcticament nul a les primeres 6 hores, l'al·licina ha sigut capaç d'inhibir el creixement dels bacteris abans que es comencessin reproduir.

✓ SOCA 12

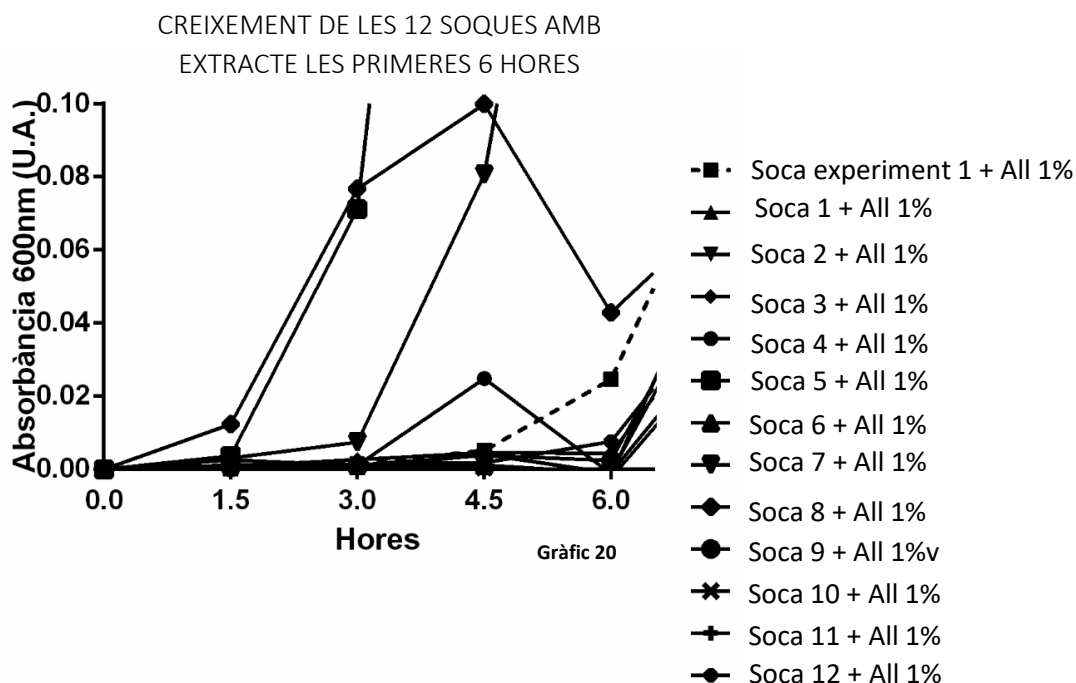
Caracterització

Irregular, bacils



En aquest gràfic l'extracte d'all actua com un potenciador del creixement bacterià, ja que a les 24 hores, la concentració de bacteris a la soca amb extracte és major que la control.

Línies de creixement fins les 6 hores de les soques amb l'extracte d'all



En aquest gràfic hi surten representades totes les línies de creixement de bacteris amb extracte d'aquest últim experiment, i també hi està, en línia discontinua, el del primer on vaig comprovar l'eficàcia de l'extracte de ceba i de l'all.

Tal com es veu al gràfic, de totes les soques, a 3, l'al·licina no els afecta per res, s'ja que emprenen des del principi un creixement exponencial. A partir de les 3-4'5 hores, una altra soca emprèn el seu creixement.

De fet, la resta, que estan totes solapades, almenys, fins les 6 hores, han presentat un creixement nul o escàs. És un indicador que l'al·licina té propietats antibiòtiques en les primeres hores de la seva inoculació, però, a les poques hores, la perd, perquè si ens fixem atentament, després de la sisena hora, totes les línies mostren un fort pendent, cosa que indica un principi de creixement. L'al·licina es degrada.

Per concloure aquest experiment, hem agafat una sèrie de paràmetres per “analitzar” la qualitat de l’extracte d’all com a antibiòtic.

D’aquesta manera, s’han reunit totes les dades obtingudes de l’espectrofotòmetre (**ANNEX D**), i mitjançant el factor de conversió següent i una resta posterior, s’obtindria el percentatge de bacteris morts o inhibits per part de l’extracte respecte la control.

$$\text{Dada bacteri "f" amb antibiòtic 6h} \times (\text{dada bacteri "f" control a les 6 hores}/100) = \% \text{ de bacteris vius}$$

$$100 - \% \text{ de bacteris vius} = \% \text{ bacteris morts}$$

Aquests càlculs s’han dut a terme amb les dades de les 6 hores, perquè és on l’al·licina ja ha dut a terme la seva màxima activitat, i a les 24 hores, la última dada disponible.

A partir d’aquests percentatges he establert una rúbrica per poder determinar l’efectivitat de l’extracte. (**Taula 1**)

- Si mata al 99% de bacteris, té una efectivitat òptima
- Entre el 80 i 99%, és notable
- Entre 80 i 50%, és acceptable
- Menor a 50%, el seu ús no seria recomanat
- Vist els resultats, també s’ha afegit un paràmetre, el del potenciador de creixement, quan la soca d’antibiòtic creix per sobre de la control.

	Percentatge de bacteris morts	Número de soques a les 6 hores	Número de soques a les 24 hores
ÒPTIMA	$x > 99\%$	4	1
NOTABLE	$80 < x < 99\%$	3	0
ACCEPTABLE	$50 < x < 80\%$	0	2
NO RECOMANAT/RESISTENTS	$0 < x < 50\%$	4	4
POTENCIADOR DE CREIXEMENT	-	1	5

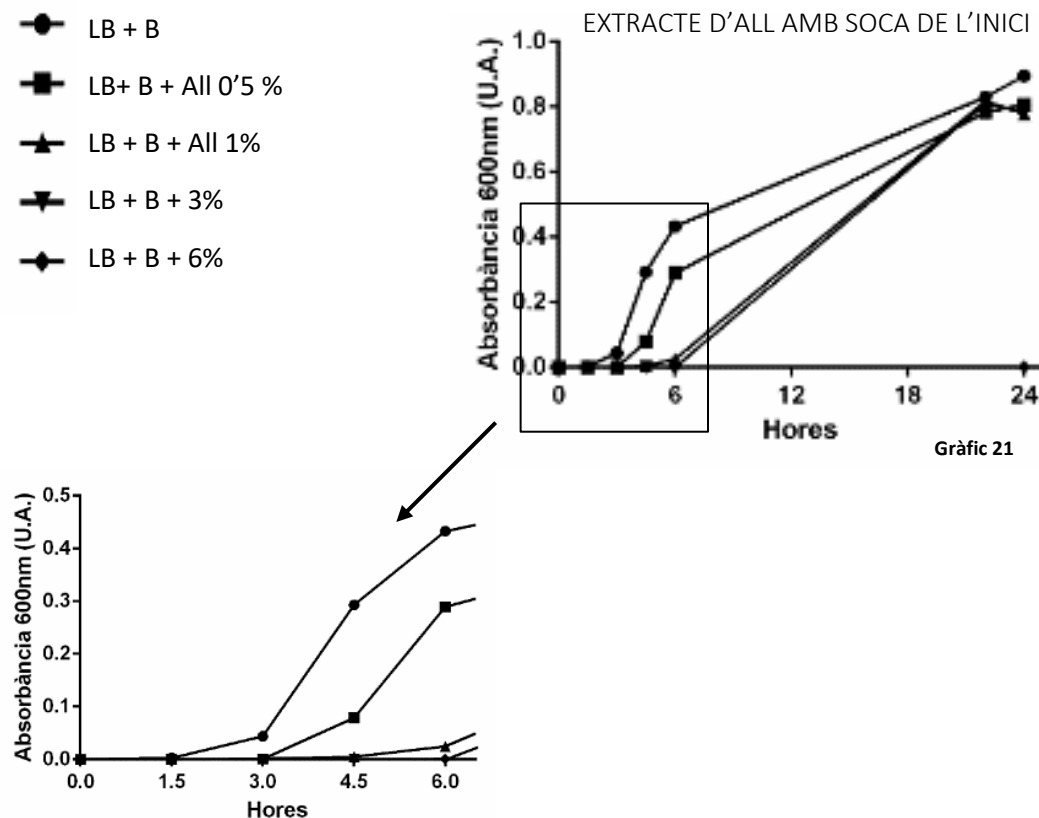
Taula 1. Taula recull de percentatges de bacteris morts respecte la control. Eficàcia i espectre de l’extracte de l’all.

8.3. Comprovar si a més concentració d'extracte d'all, major inhibició

Després d'observar que l'extracte d'all té propietats antibiòtiques a algunes soques, i, a més, afortunadament, com que va sobrar extracte d'all vaig voler comprovar si a més concentració d'extracte més inhibició.

La soca amb la que ho he estudiat ha estat amb la del primer experiment, ja que és de la que més dades disposava. De tal manera que, la concentració d'1% hauria d'actuar com a la del experiment 1 aproximadament.

En aquest gràfic apareix que, a la concentració de 6% la inhibició és absoluta, però a 3%, tot i que hi ha inhibició inicial, la línia de creixement acaba igualant-se amb la de la control.



8.4. Determinar si l'extracte d'all podria ser un bon conservant del tomàquet

Després de realitzar l'experiment, a partir dels 5 dies ja vaig poder extreure unes conclusions. Havent sucats extracte d'all a 3 llesques de tomàquet cada 6 hores, i a dos altres impregnar-les ambigua (la control) cada 6 hores, els resultats al cap de 5 dies obvien que l'extracte d'all inhibeix el creixement bacterià en el tomàquet. (Figura 23) Ja que aquells que han estat impregnats d'extracte no mostren cap creixement de colònies visible, en canvi, els que ho estaven amb aigua, sí.



Figura 23: A l'esquerra, tomàquet impregnat d'aigua als 5 dies, a la dreta, tomàquet amb extracte d'all, als 5 dies.

CONCLUSIONS

Els resultats de la part pràctica ens presenten una resposta a la nostra hipòtesi, i, a més, ens la complementen.

Ordenaré les conclusions en quatre blocs, per tal de recollir-les, de manera ordenada i respondre'm a totes les preguntes plantejades.

I. BACTERIS

A l'ambient hi ha moltes classes de microorganismes, com bacteris i fongs, tot i així, en totes les mostres aïllades, després d'observar-les amb el microscopi òptic (**ANNEX B**), els bacteris són els únics que creixen en el medi LB a una temperatura d'incubació de 37 °C.

D'altra banda, la morfologia microscòpica dels bacteris, bacils o cocs (**ANNEX B I C**) té bastanta relació amb la forma de les colònies. De manera que, de les 13 colònies aïllades durant tot el treball, 6 d'aquestes eren cocs, i tots aquests, formaven colònies circulars petites. En canvi, els bacils, formaven, en general, colònies més irregulars.

Per tant, hi ha una evidència on la morfologia microscòpica influencia en la forma macroscòpica de les colònies.

II. ALL I CEBA: EFICÀCIA ANTIBIÒTICA

“Els agents microbians de l'all i la ceba són eficaços?”

Responent a la meua hipòtesi inicial, és a dir, pel que fa als bulbs estudiats i les seves propietats antibiòtiques, començant per la ceba, no en té a les concentracions d'extracte provades (**Gràfic 3**). En canvi, l'extracte d'all sí mostra una inhibició del creixement bacterià. (**Taula 1, Gràfic 2, 8, 11, 13, 14, 16, 18**).

De fet, no vol dir que el component de la ceba no sigui antimicrobià, l'al·licina, ja que l'all la conté i sí inhibeix. Sinó que, la quantitat d'al·licina que es forma a partir de la ceba és tan baixa que, quan es prepara el seu extracte junt amb el solvent, l'al·licina encara queda més diluïda, fet que produeix una nul·la inhibició bacteriana.

Per tant, per a que la ceba pugués tenir una notable propietat antibacteriana, s'hauria de trobar un mètode d'extracció de la seva al·licina més complet i concentrat, o bé, augmentar molt la concentració de l'extracte al medi líquid.

“De quin bulb, all o ceba, podem extreure més al·licina?”

De fet, amb la informació anterior, podem afirmar que l'extracte d'all conté més al·licina que el de ceba. Els extractes s'han fet sota les mateixes quantitats i condicions, l'al·licina és el compost antimicrobià dels bulbs i, l'all és qui mostra més inhibició, per tant, de l'all se'n pot formar més al·licina que en la ceba.

Tot i així, podria haver la possibilitat que l'augment de concentració amb l'augment d'inhibició no fos correlatiu, però, el **Gràfic 22**, ens demostra que quan s'augmenta la concentració d'extracte, d'al·licina, més bacteris s'inhibeixen.

En resum, l'all conté més quantitat d'al·liïna, predecessor de l'al·licina, per gram fresc que la ceba. És per això que, davant una futura comercialització de l'al·licina, l'all és el principal candidat, perquè amb una menor quantitat de bulb podem extreure una major quantitat de principi actiu.

“En quines condicions, els extractes d'all i de ceba, no tindran cap efecte envers la soca?”

D'altra banda, els extractes de ceba, en cap condició mostren inhibició envers la soca. És més, els bacteris que estaven dins el medi sotmesos a l'extracte de ceba bullit (**Gràfic 7**), s'han aprofitat de la nul·la activitat antibiòtica, i, per tant, de la poca concentració d'al·licina, per metabolitzar els nutrients de l'extracte i seguir creixent quan els del medi s'estaven esgotant.

Pel que fa a l'extracte d'all bullit (**Gràfic 6**) no mostra cap mena d'inhibició bacteriana.

Per tant, l'explicació al fenomen és que l'al·licina es volatilitza a temperatures altes, fent que els extractes perdin la propietat antibacteriana.

A més, cal destacar que, aquesta manca d'inhibició, no es deu a una possible desnaturalització de l'enzim alinasa, el que utilitza de substrat l'al·liïna per formar al·licina, ja que complex enzim-substrat i la formació de producte té lloc als primers 2 minuts després de la lisi cel·lular, en canvi, l'extracte, es va bullir 30 minuts després que l'enzim s'activés.

Com a conseqüència, si a casa es volgués consumir all, per les seves característiques nutricèutiques, hauria de ser cru, no bullit.

III. EXTRACTE D'ALL

Degut a la ineficàcia de l'extracte de ceba, la recerca es va veure focalitzada a l'extracte d'all.

“A més concentració, hi ha més inhibició?”

A mesura que augmenta la concentració d'extracte d'all, la inhibició és major. **(Gràfic 22)**

Per tant, com s'ha citat abans, a més concentració d'extracte, més al·licina i, llavors, més inhibició.

“Pot tenir l'extracte d'all, reaccions adverses, és a dir, en comptes d'aturar el creixement bacterià, el potencii?”

L'extracte d'all, tot i la seva activitat antibiòtica, després de realitzar el segon experiment amb 12 soques diferents, potencia el creixement bacterià a un 38% d'aquestes al cap de les 24 hores, **(Taula 1)** en altres paraules, la soca amb extracte d'al·licina creix per sobre de la control.

Això és a causa que l'extracte d'all, a part d'al·licina, conté carbohidrats (inulina), proteïnes, lípids, potassi, fòsfor, iode, calci, i, també, compostos sulfurats. La majoria d'aquests, coincideixen amb els nutrients que requereixen els bacteris per reproduir-se.

De fet, aquesta és la funció del medi de cultiu, proporcionar els nutrients necessaris perquè els bacteris puguin créixer lliurement a la fase exponencial. Tot i així, quan aquests comencen a exhaurir-se, el creixement s'estanca, i s'entra en fase estacionària i posterior mort.

Per tant, l'extracte d'all pot potenciar el creixement d'una soca bacteriana quan aquesta és resistent a l'al·licina, i, llavors, el bacteri té la capacitat d'aprofitar els nutrients que li proporciona l'extracte, un cop els del medi s'han esgotat, un exemple és el **gràfic 17**. O bé, el que passa és que després que l'al·licina, amb el pas del temps, es metabolitza, degrada, i, fins i tot, es volatilitza, els bacteris, inicialment inhibits, poden emprendre de nou un creixement, on es veuen capacitats per aprofitar els nutrients de l'extracte. Un exemple és el **gràfic 13**.

Aquest potenciament de creixement bacterià produeix un gran inconvenient a l'hora d'usar aquest extracte com a antibiòtic, ja que un dels principals usos d'un antibiòtic d'ampli espectre és aturar la proliferació de la infecció en els seus primers estadis quan el bacteri causant d'aquesta encara no s'ha identificat. De manera que, si es prenguéssim l'extracte d'all amb la intenció d'estabilitzar una infecció, podríem dur a terme el procés invers, agreujar la infecció, doncs el creixement s'haurà potenciat.

Per tant, per validar l'ús de l'all com a antibiòtic és necessari l'estudi exhaustiu de la molècula d'al·licina aïllada, ja que possiblement el potenciament és degut als components de l'extracte i no de l'al·licina.

“Són els extractes d'all d'ampli o de reduït espectre?”

L'extracte d'all, observant que ha inhibit el creixement bacterià les primeres 6 hores en 7 de les 13 soques treballades durant tot el treball, **(Taula 1)** interval on l'al·licina treballa òptimament, podem concloure que és d'ampli espectre.

Cal destacar que, al ser d'ampli espectre, el seu ús s'hauria de regular, ja que, podria afectar tan a bacteris patògens com a comensals, tot produïnt conseqüències al nostre cos. Per tant, el seu ús es podria veure reduït en els primers estadis d'una infecció, o bé, en una altra aplicació.

“És efectiu l'extracte d'all en la conservació del tomàquet?”

Després dels resultats anteriors, es va veure que l'ús d'extracte d'all com un antibiòtic clínic estava pràcticament refutat a causa de la seva inestabilitat, de ser d'ampli espectre i de potenciar el creixement.

En aquest moment es va plantejar la segona hipòtesi del meu treball: ***Potser l'extracte d'all es pot utilitzar per a la conservació d'aliments***, on la resposta a aquesta és força contundent.

Aquest extracte es pot utilitzar en la conservació del tomàquet, ja que quan s'impregna extracte d'all al tomàquet, s'inhibeix el creixement i proliferació de colònies a la seva superfície, i, a més, mantenint-lo en un bon estat físic. **(Figura 23)** En canvi, en el tomàquet que no conté extracte s'hi observen colònies i, a més a més, l'inici de la seva descomposició.

Per tant, l'extracte d'all no seria recomanable com un antibiòtic clínic però sí com a conservant, perquè actua millor com a agent preventiu que no pas com a agent terapèutic o curatiu.

IV.AL·LICINA

Pel que fa al principi actiu de l'all i la ceba, l'al·licina, és un sulfòxid que té un efecte, principalment, bacteriostàtic. És a dir, relanteix el creixement bacterià sense inhibir-los per complet.

L'al·licina és un compost inestable, als experiments, al cap de les 4-6'5 hores comença a degradar-se, la concentració d'al·licina baixa, i, en conseqüència, es comença a reprendre el creixement bacterià arribant a assolir les dades de la control. **(exemple en gràfic 2 i 13)**

Per tant, el seu temps de vida mitjana és curt, ja que és un tiosulfat altament reactiu.

A més, no resulta un impediment pels bacteris resistents, és perfectament metabolitzada. **(Gràfic 10)**

V. RECAPITULACIÓ

En resum, per tal de recórrer a l'al·licina com una alternativa a antibiòtics d'ampli espectre, o bé, a ser un conservant, aquesta s'hauria d'aïllar i purificar per tal d'analitzar si el potenciament del creixement bacterià per part de l'extracte d'all segueix vigent sense la presència de carbohidrats ni minerals provinents d'aquest.

Tot i que l'extracte d'all no podria ser un antibiòtic d'ús clínic, l'al·licina aïllada ho podria ser en potència si s'analitzés en més profunditat les seves característiques i propietats per tal de poder trobar un solvent en el qual aquesta s'estabilitzés, i, per tant, tingués més temps de vida mitjana.

D'altra banda, l'extracte d'all amb al·licina es podria utilitzar com a conservador d'aliments **(Figura 23)**, és a dir, amb funcions més preventives de la infecció i no terapèutiques o curatives.

Per tant, el que és evident és que estem davant una molècula amb poders antimicrobians, de manera que, amb un profund estudi d'aquesta, podria utilitzar-se com un recurs més a diferents àmbits científics.

BIBLIOGRAFIA

- **LLIBRES**

Costa, M., & Grau, R. (2017). *Nou biocontext, 2 Batxillerat, Biologia* (1st ed.). Barcelona: Teide.

Stanier Y. Roger, Ingraham L. John, Wheelis L. Mark, Painter R. Page (1991) *Microbiología* Editorial Reverté

Taylor, M., Simon, E., Dickey, J., Hogan, K., & Reece, J. *Campbell biology* (2nd ed.). Campbell.

- **SUPORTS VISUALS**

Televisió de Catalunya (Productor i Director). (2018). *La fi dels antibiòtics*. Barcelona: Corporació Catalana de Mitjans Audiovisuals S. A

- **PÀGINES WEB**

A.Fernández Olmoos et al. (2010) *Métodos de identificación bacteriana*. Consultada el 18 de setembre de 2018.

A.Morán. (2014). *Los antibióticos*. Consultat 5 de maig 2018.
<http://www.dciencia.es/antibioticos/>

A. Rojas-Triviño (2011) *Conceptos y práctica de microbiología general*. Consultada el 10 d'octubre de 2018. <http://bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>

A.Morgado et al. (2010). *Historia y evolución de los antibióticos*. Consultada el 10 de setembre de 2018. <https://biotecnologia.fundaciontelefonica.com/2010/06/21/el-descubrimiento-de-los-antibioticos-historia-y-evolucion-2/>

Alimentación Sana. (data no especificada). Consultada el 10 de setembre <http://www.alimentacion-sana.org/informaciones/novedades/cebolla.htm>

Autor no conegut. (2018). *Bactericida y bacteriostático*. Consultat 10 juliol de 2018
<https://www.phsseekonten.com/higiene/bactericida-bacteriostatico/>

Autor no conegut. *Extracción de alicina en ajo y su cuantificación por HPLC*. Consultat 10 de juliol de 2018.

<https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZGVmYXVsdGRvbWFpbnxxbTlyMzJ8Z3g6MjcxZWVmODc2ZDdhNWMxMQ>

C. Madrigal. (2018). *El ajo como antimicrobiano*. Consultada el 10 de juliol de 2018.
<https://www.doctorcidon.com/blog/el-ajo-como-antimicrobiano>

D. Bilbao. *Morfología de las colonias bacterianas*. Consultada el 2 d'agost,
<https://www.biografiasyvidas.com/reproducir.htm>

Dr. P. F. Mateos (2017). *Agentes microbianos y microorganismos*. Consultada el 12 d'octubre de 2018. <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a3-agentes-antimicrobianos-y-microorganismos.pdf>

Dr. P. F. Mateos (2018). *Nutrición bacteriana*. Consultada el 15 d'octubre de 2018.
<http://webcd.usal.es/web/educativo/micro2/tema05.html>

Efsa(2010). *Cebolla*. Consultada el 27 d'agost de 2018.
<http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/cebolla.pdf>.

Fundación Eroski. *El ajo, antibiótico natural*. Consultat el 3 de juliol de 2018.
http://ideasana.fundacioneroski.es/web/es/13/escuela_1/escuela1_ajo.pdf

Harris et al. (2001). *Antimicrobial properties of allicin from garlic*. Consultat 19 agost de 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594976/>

J. García Calleja (2009) *La reproducción de las bacterias*. Consultada el 20 de juny de 2018. <https://biologia.laguia2000.com/microbiologia/la-reproduccion-de-las-bacterias>

J.L. López-Hortangas, F.J. Castilla i M.Salavert. *Técnicas de identificación*. Consultat 30 juny 2018, <http://media.axon.es/pdf/65248.pdf>

L. Diaz, K. Jiménez (2008). *Validación de un método de extracción de alicina y su cuantificación por HPLC*. <http://studylib.es/doc/5359225/s2a2.-validaci%C3%B3n-de-un-m%C3%A9todo-de-extracci%C3%B3n-de-alicina-en>.

M. Sahonera. Data no especificada. *Tipos y morfología de las bacterias*. Consultada el 27 d'agost. <https://psicologiaymente.com/salud/tipos-de-bacterias>

M. Silva (2018). *El crecimiento bacteriano*. Consultada el 7 de juliol de 2018.
<http://knoow.net/es/ciencias-tierra-vida/biologia-es/crecimiento-bacteriano/>

Natura foundation. *Fitoterapia, Allium Sativum*. Consultat 3 d'agost de 2018
[file:///C:/Users/PC/Downloads/allium_sativum_170117%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/PC/Downloads/allium_sativum_170117%20(2).pdf)

P. Prati, C. Maria Henrique, V.S. Nunes da Silva, M.T. Bertoldo. (2014) *Evaluation of allicin stability in processed garlic of different cultivars*. Consultada 20 d'agost de 2018.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612014000300028

Q. García Hylary et al. (2014) *Curva de crecimiento*. Consultada el 23 de setembre de 2018. <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/curva-del-crecimiento.html>

Nom ni data especificada. *Extracción de al·licina en ajo y cuantificación por HPLC*.

Consultada el 15 d'agost.

<https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZGVmYXVsdGRvbWFpbnnxbTlyMzJ8Z3g6MjcZWRmODc2ZDdhNWMxMQ>

- **ARTICLES**

D. Bender-Bojalil i M.E. Bárcenas. (2013) *El ajo y sus aplicaciones en la conservación de alimentos*. Consultat 10 juliol 2018 <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-71-Bender-Bojalil-et-al-2013.pdf>

D. P. Íllic (2011). *Allicin and related compounds: biosynthesis, synthesis and pharmacological activity*. Consultada el 10 d'octubre de 2018. <http://facta.junis.ni.ac.rs/phat/pcat2011/pcat2011-02.pdf>

H. Rubi, L. Narcedalia, E. Martínez-Santiago. (2016). *Efectos terapéuticos del ajo*. Consultat 20 d'agost 2018 http://www.unsis.edu.mx/revista/doc/vol3num8/A4_Efectos_Terapeuticos_Ajo.pdf

M. de los Ángeles Córdova Bentancourt. Instituto politécnico nacional. (2010) *Extracción y purificación de alicina a partir de ajo: implicaciones analíticas*. Consultat 10 de juny <https://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/9243/1/81.pdf>

M. Egbobor et al. (2007). *A comparative assesment of the antimicrobial effects of garlic (alium Sativum) and antibiotics on diarrheagenic organisms*. Consltada el 10 de setembre. http://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/2007_38_2/18-3826.pdf

M. López (2016). *Los antibióticos de espectro más reducido, la opción para las enfermedades infecciosas*. Consultat el 20 de juliol. https://www.abc.es/salud/enfermedades/abci-antibioticos-espectro-reducido-futuro-frente-enfermedades-infecciosas-201605091709_noticia.html

S. Chhabria et al. (2016) *Purification and characterisation of alliinase produced by Cupriavidus necator and its application for generation of cytotoxic agent: Allicin*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X1600005X>

V. Seija, R. Vignoli. (2008). *Principales grupos de antibióticos*. Consultat 18 juliol 2018.
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>

També s'ha cercat informació en referències com:

- <http://www.diccionari.cat/>
- <https://www.enciclopedia.cat/>
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.quimica.es/>

ANNEX

ANNEX

- ANNEX A: PROCEDÈNCIA DE LES SOQUES

Adjunto una taula on indico la procedència de totes les mostres aïllades en aquest treball.

<u>SOCA</u>	<u>PROCEDÈNCIA</u>
EXPERIMENT 1	Aixeta bany públic
1	Interior sabata vella d'esport
2	Interior sabata vella d'esport x2
3	Paret de paperera
4	Paret de paperera x2
5	Sola d'una sabata
6	Sola d'una sabata
7	Mostres del sòl d'un jardí
8	Mostres del sòl d'un jardí x2
9	Empremtes dactilars
10	Empremta dactilar x2
11	Empremta dactilar x3
12	Empremta dactilar x4

- ANNEX B: CARACTERITZACIÓ DE LES SOQUES AÏLLADES

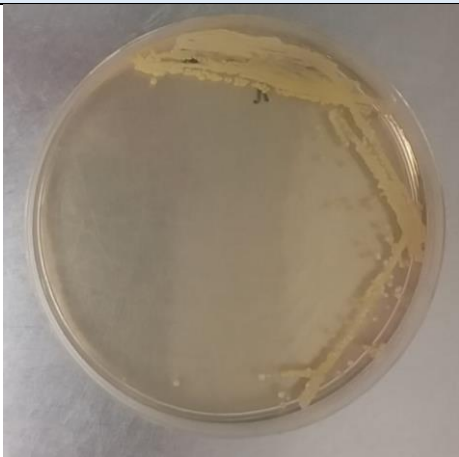
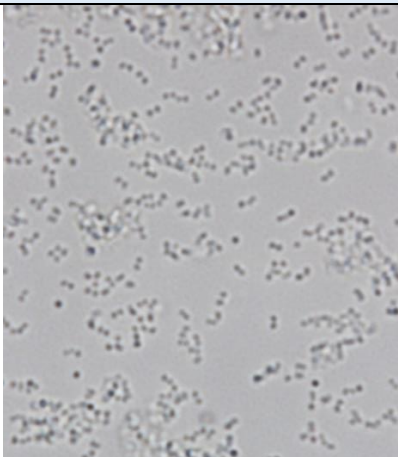
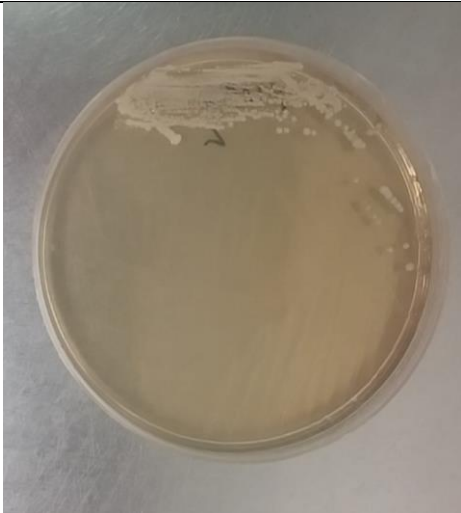
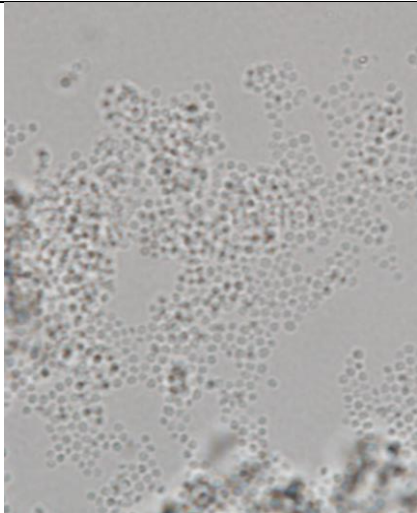
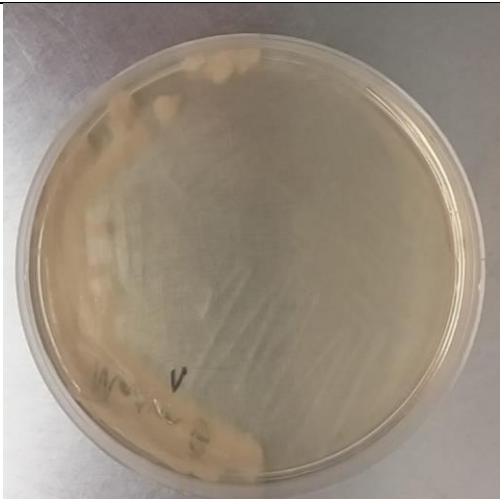
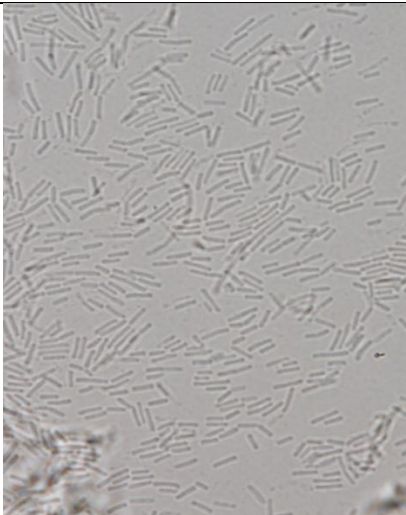
Quan es van aïllar les 13 soques, vam voler-nos assegurar que totes 13 eren bacteris.

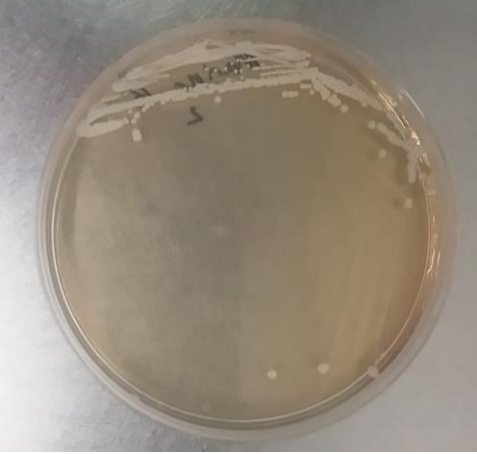
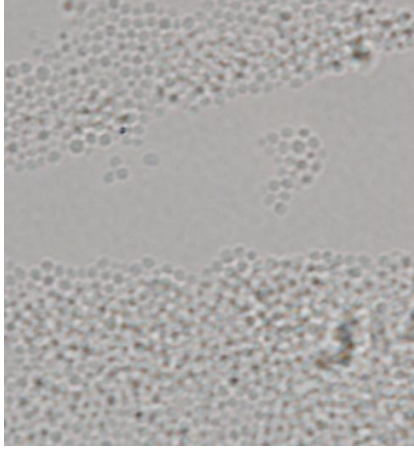
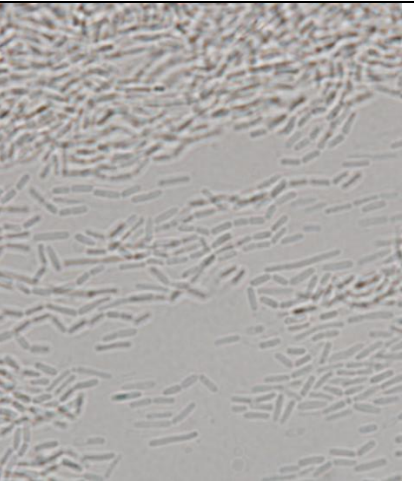
Per tant, amb el microscopi òptic, a 100x, vam observar les cèl·lules. Totes eren bacteris.

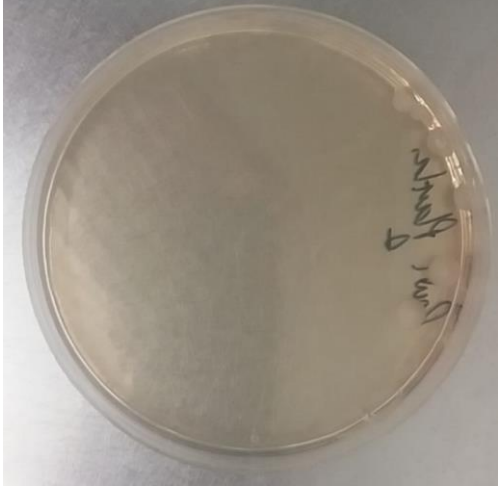
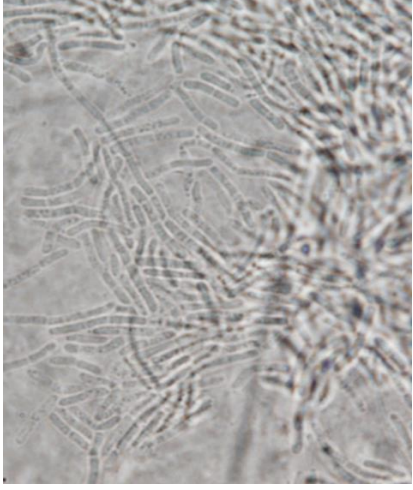
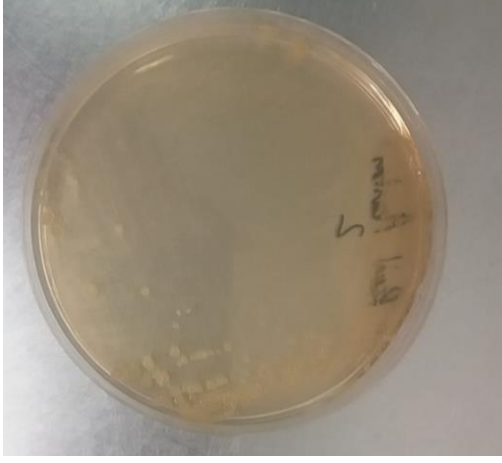
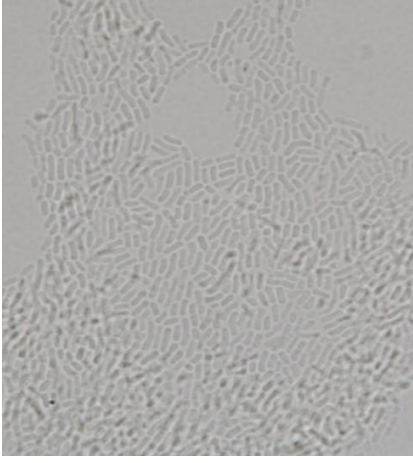
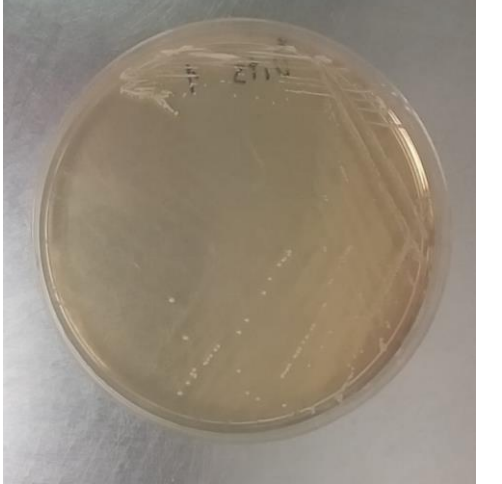
Van créixer colònies molt diverses i morfològicament també, de fet, aquest últim apunt em va servir per obrir un nou “apartat”, i analitzar si, els cocs i els bacils, formen sempre el mateix tipus de colònies.

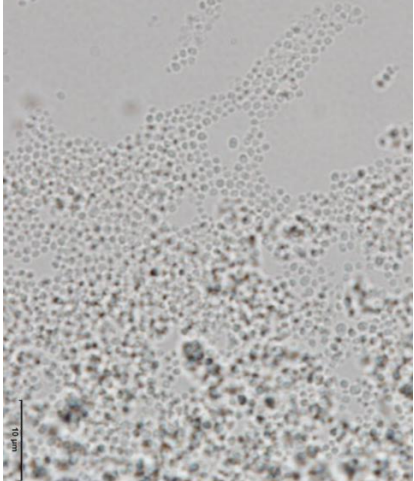
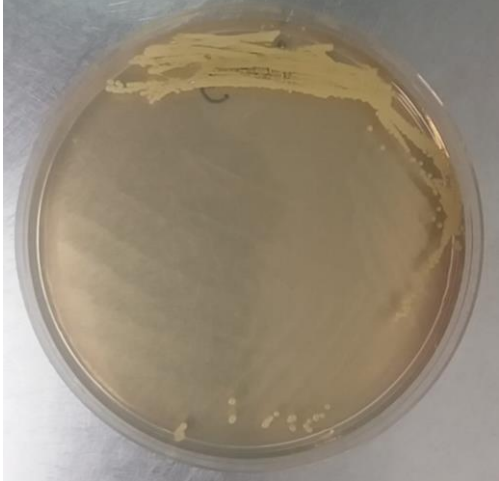
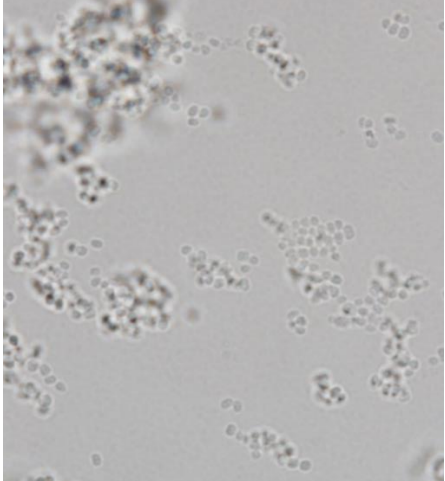
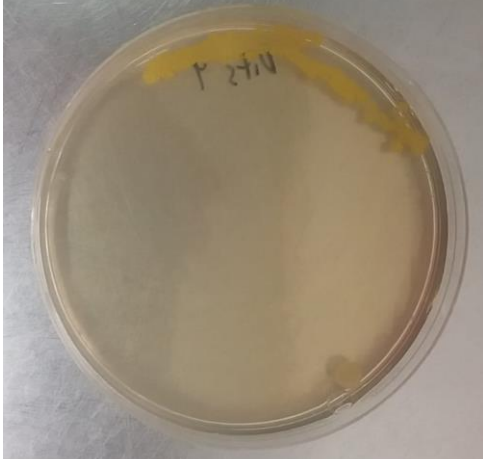
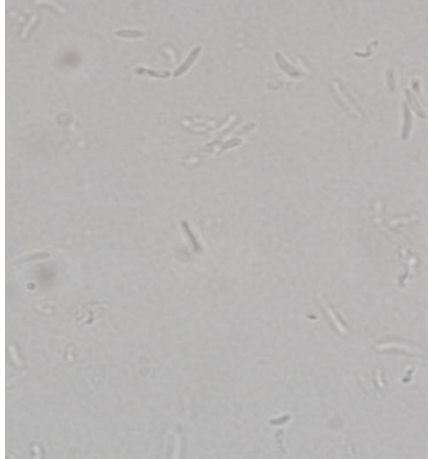
De les 13 plaques aïllades, una d’aquestes, és la del primer experiment.. Gràcies a la informació adjuntada a l’apartat 2.1 del marc teòric, es va poder fer una descripció detallada de cada una.

	SUPERFICIE	FORMA	VORA	COLOR	MORFOLOGIA
SOCA1	Convexa	Circular	Arrodonida	Groga	Estreptococs
SOCA 2	Convexa	Circular	Arrodonida	Crema	Estafilococs
SOCA 3	Plana	Irregular	Espiculada	Crema	Bacils
SOCA 4	Convexa	Circular	Arrodonida	Crema	Estafilococs
SOCA 5	Plana	Puntiforme	Arrodonida	Crema	Estreptobacils
SOCA 6	Acuminada	Filamentosa	Lobulada	Nucli groc, blanc	Estreptobacils
SOCA 7	Papilada	Circular	Arrodonida/ondulada	Crema	Estreptobacils
SOCA 8	Enfonsada	Irregular	Ondulada	Groc daurat	Bacils
SOCA 9	Convexa	Circular	Arrodonida	Blanc torrat	Estafilococs
SOCA 10	convexa	Circular	Arrodonida	Grogueja	Estafilococs
SOCA 11	Convexa	Circular	Arrodonida	Groga	Estafilococs
SOCA 12	convexa	Irregular	Ondulada	Groga	Vibrions
SOCA 13 (experiment 1)	plana	Irregular/circular	Ondulada/arrodonida	crema	Estreptobacils

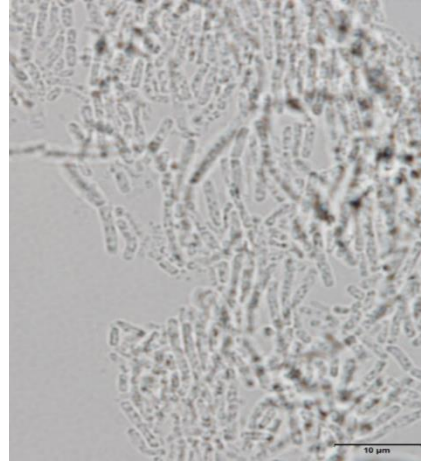
	Fotografia escala real	Microscopia òptica 100x
1		
2		
3		

4		
5		
6		

7		
8		
9		

10	 *	
11		
12		

13



*La soca 10 està contaminada. Però quan vam sembrar aquesta soca al medi líquid, encara no ho estava. La raó és que vam fer la fotografia d'aquesta dies després que hagués estat oberta i manipulada en un ambient no estèril

- ANNEX C: RELACIÓ ENTRE LA FORMA DE LES COLÒNIES I LA MORFOLOGIA MICROSCÒPICA

Aquest és un apartat extra, prescindible per resoldre la meua hipòtesi, però que vaig trobar interessant destacar. Després de descriure cada soca i la seva morfologia microscòpica. Em vaig adonar que tots els cocs conformaven colònies circulars, i, la majoria de bacils, colònies irregulars. Aquí hi ha una taula on s'evidencia:

- ✓ En blau fluix, els cocs, on tots aquests, la colònia que formen és circular
- ✓ En blau més fosc, es veuen els bacils, on aquests conformen unes colònies molt diferents les unes de les altres, però que, tot i així, la majoria són irregulars.

Una observació és que els cocs es solen disposar en colònies circulars.

SOC A	FORMA	MIDA DE LA COLÒNIA	MORFOLOGIA MICROSCÒPICA
1	Circular	Petita i color groga	Cocs
2	Circular	Petita color crema	Cocs
3	Irregular	Gran color crema	Bacils
4	Circular	Petita, color crema	Cocs
5	Puntiforme	Gran, color crema	Bacils
6	Filamentosa, irregular	Gran, nucli groguenc, resta crema	Bacils
7	Circular	Gran, crema	Bacils
8	Irregular	Gran, groga dorada	Bacils
9	Circular	Petita, blanca	Cocs
10	Circular	Petita, groguenca	Cocs
11	Circular	Petita groguenca	Cocs
12	Irregular	Amorfa, groga	Bacils
13	Irregular	Gran	Bacils

- ANNEX D: RECURS DE DADES ESPECTROFOTÒMETRE

Aquí s'adjunten totes les dades d'absorbància de l'espectrofotòmetre de tot el treball.

	1,5h	3h	4,5h	6h	22h	24,5h
LB+Bacteris	0,04868333	0,13488333	0,16258333	0,20288333	0,14498333	0,17078334
LB+B+EtOH 1%	0,04368333	0,12308334	0,17378333	0,15928334	0,15038334	0,13568333
LB+B+EtOH 0,5%	0,03628333	0,11918333	0,16988334	0,17518334	0,14568333	0,16828333
LB+B+EtOH 0,25%	0,04058333	0,11168334	0,16338333	0,16318333	0,14718333	0,17808334
LB+B+All 1%	0,00678333	0,02398333	0,06958334	0,14448333	0,12018333	0,15908333
LB+B+All 0,25%	0,02388333	0,11808333	0,14488333	0,19898332	0,14828333	0,20508332
LB+B+Ceba 1%	0,04068333	0,14658333	0,20068334	0,18528335	0,14408333	0,17748333
LB+B+Ceba 0,5%	0,04108333	0,13168333	0,19738333	0,18718333	0,14758333	0,19138334
LB+B+Ceba 0,25%	0,04358333	0,14228333	0,18608333	0,18058334	0,16078333	0,18068333
LB+B+All+Ceba (tot 1%)	0,00438333	0,02138334	0,06888333	0,12818333	0,13898334	0,14878334
LB+B+All+Ceba (tot 0,5%)	0,01548333	0,07678333	0,16298333	0,19838334	0,15098333	0,17198333
LB+B+All+Ceba (tot 0,25%)	0,03058333	0,12338333	0,17038333	0,19828333	0,17558335	0,16448334
LB+B+All (Bullit) 1%	0,03508333	0,12328334	0,17168334	0,16388333	0,19318335	0,16468332
LB+B+All (Bullit) 0,5%	0,04248333	0,13578333	0,18018333	0,17218333	0,16658333	0,16048333
LB+B+All (Bullit) 0,25%	0,04778334	0,11748333	0,16198334	0,16078333	0,15318334	0,17958332
LB+B+Ceba (Bullit) 1%	0,04798333	0,15358333	0,19748334	0,18068333	0,30658333	0,33628334
LB+B+Ceba (Bullit) 0,5%	0,04998334	0,13128333	0,18388332	0,17388333	0,37558333	0,35698335
LB+B+Ceba (Bullit) 0,25%	0,04738333	0,12658334	0,16178334	0,17618333	0,16808334	0,18588333
LB+B+All+Ceba (Bullit) 1%	0,03348333	0,13628334	0,14678333	0,15908333	0,14988333	0,16998332
LB+B+All+Ceba (Bullit) 0,5%	0,04408333	0,11768333	0,15718333	0,17788334	0,16338333	0,19048334
LB+B+All+Ceba (Bullit) 0,25%	0,03978333	0,13688333	0,19218333	0,26568334	0,27178333	0,29088334

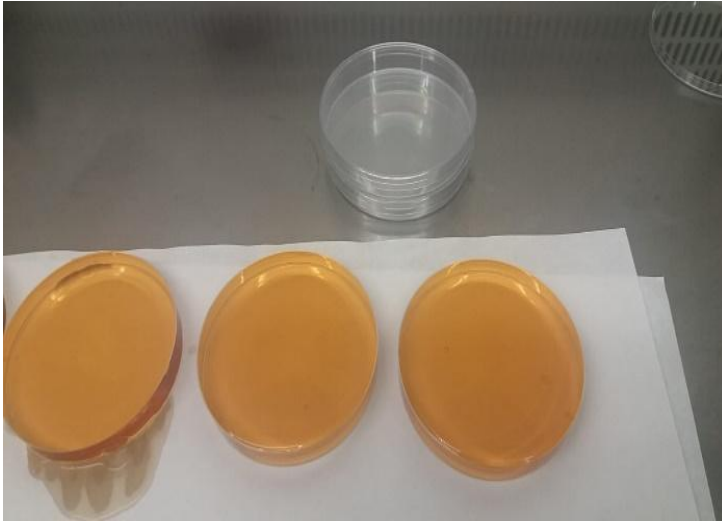
Taula de dades del primer experiment. Comprovar si extractes d'all i de ceba tenen propietats antibiòtiques

	0h	1h30	3h	4h30min	6h	22h	24h
LB+B	0	0	0	0	0	0	0
LB+B+All 0'5%	0	0,0029	0,0439	0,2932	0,4329	0,8298	0,8952
LB+B+All 1%	0	0,0008	0,0006	0,0788	0,2893	0,7826	0,807
LB+B+All 1%	0	0,0001	0,0015	0,0052	0,0246	0,8177	0,7782
LB+B+All 3%	0	0,0004	0,0006	0,0012	-0,0009	0,8101	0,783
LB+B+All 6%	0	0,0002	0,0001	0,0005	0,0011	-0,0005	0,001
Soca 1	0	0	0,0001	0,0019	-0,0011	0,4909	0,601
Soca 1 + All 1%	0	0,0006	0,001	0,0012	-0,002	0,0187	0,2783
Soca 2	0	0,0009	-0,0003	0,0488	-0,0013	0,2484	0,2883
Soca 2 + All 1%	0	0,0004	0,0004	0,0041	-0,001	0,6869	0,7575
Soca 3	0	0,0037	0,0044	0,0141	0,0434	0,407	0,5473
Soca 3 + All 1%	0	0,0009	0,0027	0,0046	0,0045	0,4918	0,5222
Soca 4	0	0,0007	0,0019	0,0056	0,0128	0,852	0,9396001
Soca 4 + All 1%	0	0,0026	0,0011	0,0249	-0,0012	0,2094	0,4807
Soca 5	0	0,0098	0,1188	0,3079	0,3864	0,5189	0,5619
Soca 5 + All 1%	0	0,0037	0,0711	0,3692	0,4409	0,5665	0,5134
Soca 6	0	0,0021	0,0373	0,2854	0,3904	0,404	0,2862
Soca 6 + All 1%	0	0,0012	0,0012	0,0012	-0,001	0,4537	0,5054
Soca 7	0	0,0265	0,2063	0,3671	0,3907	0,4646	0,5811
Soca 7 + All 1%	0	0,0031	0,0075	0,0806	0,27	0,3778	0,3996
Soca 8	0	0,018	0,1234	0,0759	0,0708	0,1444	0,0426
Soca 8 + All 1%	0	0,0124	0,0767	0,0999	0,0429	0,3898	0,7862
Soca 9	0	0,0015	0,0085	0,0367	0,1092	0,496	1,7104999
Soca 9 + All 1%	0	0,0005	0,0012	0,0039	0,0025	0,6793	0,737
Soca 10	0	0,0004	0,0023	0,0016	0,005	0,771	0,7824
Soca 10 + All 1%	0	-1E-04	0,0013	0,0005	-0,0016	0,7684	0,9061
Soca 11	0	0,0009	0,0042	0,0054	0,0021	0,6463	0,6825
Soca 11 + All 1%	0	0,0003	-0,0007	0,0004	-0,0008	0	0,0012
Soca 12	0	-0,0018	0,0011	0,0109	0,0407	0,3106	0,3371
Soca 12 + All 1%	0	0,0011	0,0015	0,0019	0,0076	0,4705	0,522

Taula de dades de l'experiment per comprovar l'espectre de l'all, i, comprovar si a més concentració d'extracte, més inhibició

- ANNEX E: RECULL DE FOTOGRAFIES DE LES PRÀCTIQUES

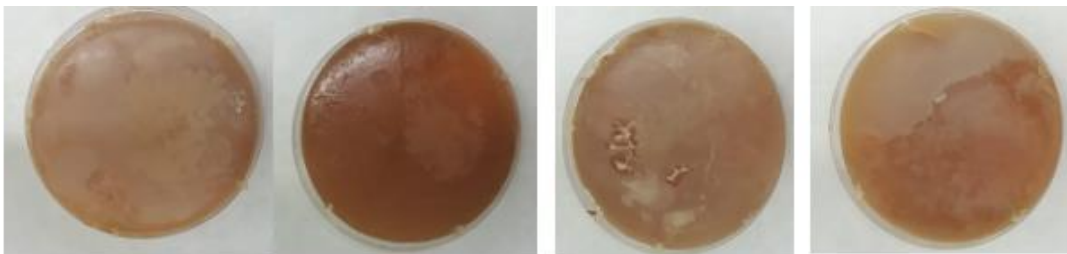
La meua memòria escrita estava saturada de pàgines, de tal manera que aquí adjunto algunes fotografies del meu marc pràctic



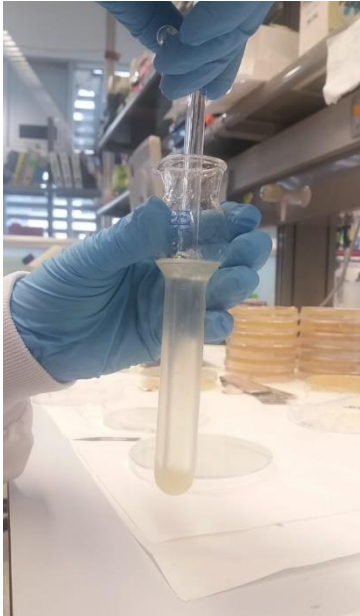
Elaboració del medi sòlid



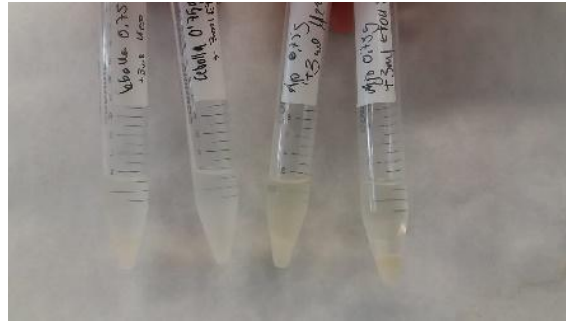
Incubació de les 4 mostres



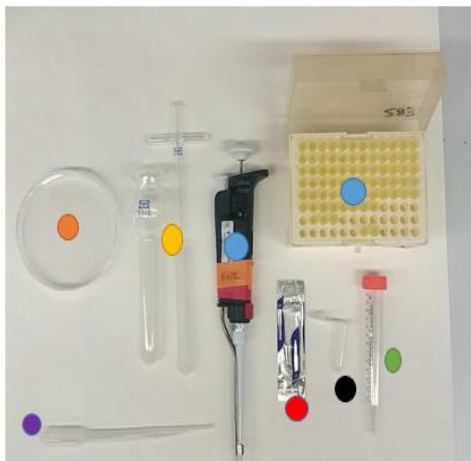
Mostres de l'1 a la 4 al cap de 24 hores incubades, encara mostren poc creixement



Elaboració de l'extracte, lisant amb l'èmbol.
Homogeneïtzant



Extractes preparats, d'all i de ceba bullits i sense.



Conjunt de material emprat per l'extracció

Lila: utilitzada per introduir l'all i/o ceba dins
l'homogeneïtzador

Groc: Homogeneïtzador (tub i èmbol)

Blau: pipetejador i pipetes

Verd: Tub de centrifugadora on s'han posat els extractes
durant la centrifugació

Negre: Tub d'*ependorf*



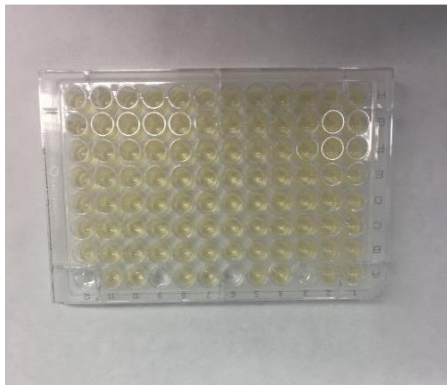
Soca aïllada de l'anterior soca 1, on s'utilitzaria en la primera pràctica/experiment



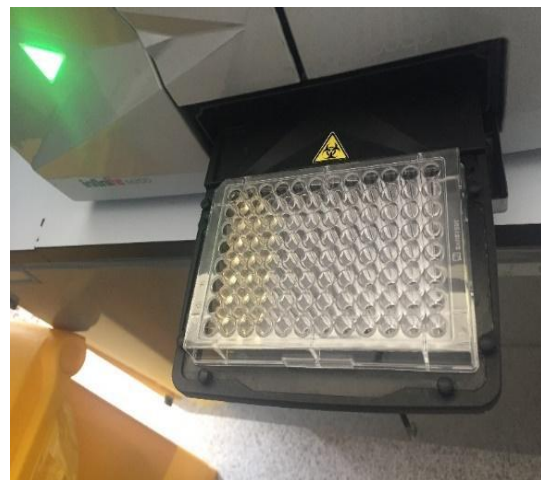
Tubs on s'han inoculat els bacteris, extractes i medi de cultiu (Pràctica i), dins la cambra de flux



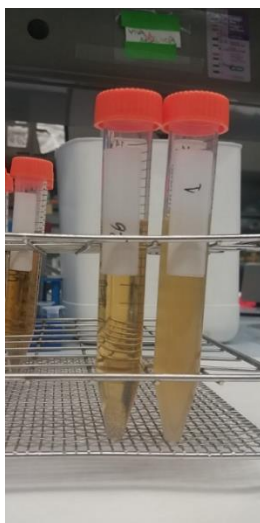
Màquina incubadora dels bacteris en medi de cultiu líquid



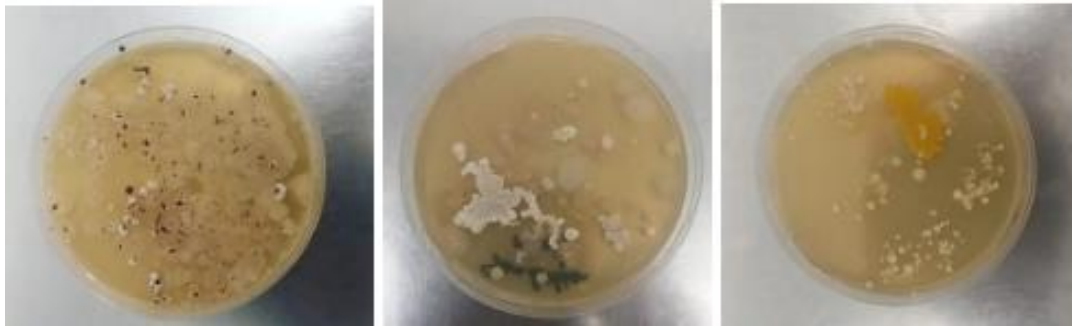
Microplaques de l'espectrofotòmetre, a cada forat hi corresponia el material d'un tub



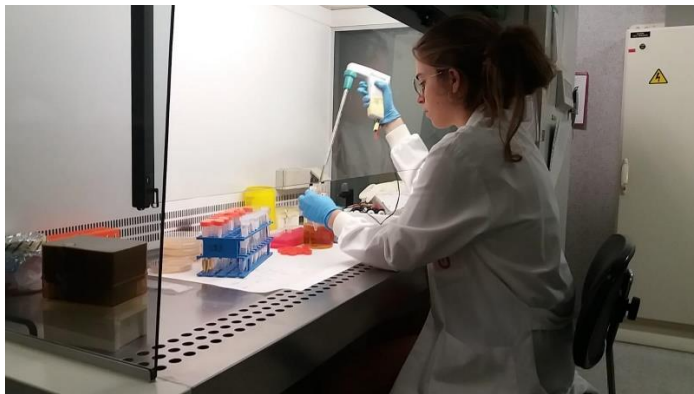
Microplaca a punt de ser llegida per l'espectrofotòmetre



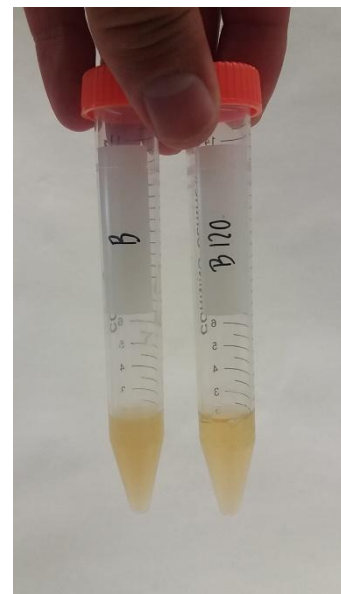
A l'esquerra, medi líquid sol, a la dreta, la control, medi de cultiu junt amb bacteri creixent. S'observa una diferencia de terbolesa.



Recull de mostres després d'incubar-se 48 hores. A punt de ser aïllats per l'experiment 2.



Introduint el medi dins els pots, a la campana de flux per mantenir l'esterilitat



Tubs de l'experiment per comprobar si a més concentració d'extracte, més inhibició.

A la dreta, extracte de més concentració, a l'esquerra, el control amb el bacteri creixent lliurement.