



Trabajo Fin de Grado

Implementación de una plataforma de cribado para la selección de
microorganismos ambientales productores de moléculas
antimicrobianas

Implementation of a Screening Platform for the Selection of Environmental
Microorganisms Producing Antimicrobial Molecules

Autor:

María Losilla Fau

Directoras:

Ainhoa Lucía Quintana

Laura Espina Cadena

Departamento de Microbiología, Pediatría, Radiología y Salud Pública

Facultad de Medicina

Grado de Biotecnología

Universidad de Zaragoza

Curso 2024/2025

ÍNDICE

0. RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Resistencia bacteriana a los antibióticos.....	5
1.2. Descubrimiento y desarrollo de antimicrobianos	6
1.3. Productos naturales	7
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo	9
3.2. Ensayo de antibiosis en medio sólido.....	11
3.3. Generación de la cepa <i>M. smegmatis</i> + pMV361GFP	11
3.3.1. Transformación	11
3.3.2. Comprobación.....	12
3.4. Relación D.O/ CFU	12
3.5. Curva de crecimiento de los microorganismos fluorescentes	12
3.6. Ensayo de inhibición	13
3.6.1. Co-cultivo	13
3.6.2. Adición de sobrenadante.....	14
4. RESULTADOS	14
4.1. Antibiosis	14
4.2. Transformación de <i>M. smegmatis</i> + pMV361GFP.....	15
4.3. Relación D.O/CFUs.....	16
4.4. Optimización de las condiciones de crecimiento	16
4.5. Optimización de las condiciones del ensayo de inhibición	17
4.6. Validación de la plataforma de screening con 10 cepas nuevas	23
5. DISCUSIÓN	24
6. CONCLUSIONES.....	25
7. BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXO	30

ABREVIATURAS

- BGCs: Clusters de genes de biosíntesis (por Biosynthetic Gene Clusters)
- CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
- D.O: Densidad óptica
- Hyg: Higromicina
- OMS: Organización mundial de la salud
- O.N.: Overnight, cultivo que se incuba durante la noche.
- PAO: *Pseudomonas aeruginosa* GFP
- RAM: Resistencia antimicrobiana
- S. A : *Staphylococcus aureus* GFP
- TFG: Trabajo fin de grado
- UFC: Unidades formadoras de colonias
- WT: Wild- type

0. RESUMEN

La aparición de resistencias antimicrobianas (RAM) unida a la falta de descubrimiento de nuevos antimicrobianos es uno de los grandes problemas de salud pública hoy en día. Algunos informes como el Lancet (2024) ya afirman que en 2050 las muertes por infecciones bacterianas superarán las muertes por otras patologías como el cáncer.

Para hacer frente a este problema muchos investigadores trabajan en encontrar bacterias productoras de nuevas sustancias antimicrobianas. Entre estas iniciativas, se encuentra el Proyecto Micro Mundo, proyecto con origen estadounidense que bajo el nombre de Small World Initiative llegó a España en 2017 dónde adquirió identidad propia. Se basa en una estrategia aprendizaje-servicio entre la Universidad y los centros educativos con los objetivos de concienciar a la población acerca de la resistencia antimicrobiana, aislar nuevas bacterias productoras de sustancias antimicrobianas y fomentar las vocaciones científicas. El éxito de este proyecto ha llevado a incrementar año tras año el número de participantes y, por consiguiente, el número de muestras analizadas.

En este trabajo se ha diseñado y optimizado una plataforma de cribado masivo para analizar de una forma rápida y eficaz las cepas aisladas más prometedoras; resolviendo la necesidad de análisis de las más de las 500 cepas almacenadas en el Biobanco del proyecto de la Universidad de Zaragoza. La plataforma se optimizó con 10 cepas previamente caracterizadas y posteriormente se validó con 10 cepas nuevas del biobanco.

ABSTRACT:

The emergence of antimicrobial resistance (AMR), linked to the lack of discovery of new antimicrobials, is, nowadays, one of the most important public health problems. The Lancet (2024) claims that by 2050, deaths caused by bacterial infections will outweigh those caused by other diseases such as cancer.

To face this issue, many researchers are working to find new bacteria producers of antimicrobial substances. Among these initiatives is Micro Mundo, a project launched in United States under the name Small World Initiative, and which arrived in Spain in 2017. It is based on a service-learning strategy between universities and educational centers. Its objectives, apart from promoting scientific vocations, are making people aware of antimicrobial resistance and isolating new bacteria producers of antimicrobial substances. The success of this project has led to an increasing number of participants each year and, consequently, a growing number of samples analysed.

In this TFG a high-throughput screening platform was designed and optimized to quickly and effectively analyse the large number of strains isolated in educational centers. It addresses the need to analyse over 500 strains stored in the University of Zaragoza's project biobank. The platform was optimized and validated by using 10 strains, previously characterized and it was also used to analyse 10 new strains from the biobank.

1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son fármacos que combaten las infecciones bacterianas en personas y animales inhibiendo o ralentizando el crecimiento bacteriano. Su uso ha sido destinado al tratamiento de infecciones, así como a las cirugías invasivas, trasplante de órganos, tratamientos inmunomoduladores, oncología y otras disciplinas médicas reduciendo la muerte infantil y aumentando, a su vez, la esperanza de vida (Katz and Baltz, 2016).

Sin embargo, el mal uso de estos fármacos, su consumo excesivo o el abandono del tratamiento sin haber concluido la prescripción médica (Lafuente *et al.*, 2024) son algunas de las causas que, junto a la falta de descubrimiento de nuevos antimicrobianos, han contribuido al desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos. Estas bacterias desarrollan estrategias de defensa frente a los fármacos, permitiéndoles sobrevivir y causando un fracaso terapéutico.

Este problema de salud pública es considerado por la OMS como una de las tres grandes amenazas internacionales del siglo XXI (Organización mundial de la Salud, s.f.). Actualmente, se cobra aproximadamente 33000 muertes al año en Europa (PRAN. (s.f.), 2015). En 2050, según datos recientemente publicados en la prestigiosa revista Lancet, la falta de antibióticos efectivos aumentará hasta 10 millones/año las muertes mundiales; superando a otras patologías como del cáncer (Naghavi *et al.*, 2024, Lafuente *et al.*, 2024).

1.1. Resistencia bacteriana a los antibióticos

Las bacterias resistentes a antibióticos circulan entre el medio ambiente y el ser humano a través de la cadena alimentaria o los animales. Para hacer frente a esta amenaza, la OMS ha puesto en marcha una estrategia integral, conocida como **One Health**, que busca regular el uso de antimicrobianos en la salud humana, el bienestar animal, la producción de alimentos y el medio ambiente (Genilloud, 2019).

La resistencia bacteriana, **intrínseca** o **adquirida**, es un fenómeno natural que las bacterias utilizan para defenderse o sobrevivir. Entre los microorganismos que presentan **resistencia intrínseca** se encuentra por ejemplo *S. aureus* que es resistente a penicilina de **forma natural** al generar enzimas β -lactamasas; mientras que otros microorganismos muestran resistencia al **carecer de las estructuras o dianas** sobre las que actúa el antibiótico (Huemer *et al.*, 2020). En este sentido, las bacterias Gram negativas, debido a la composición de su pared celular, son menos permeables que las Gram positivas, lo que en general se traduce en una mayor resistencia a los antimicrobianos. (Munita and Arias, 2016).

Así mismo, los microorganismos pueden desarrollar **resistencia adquirida** por **mutación genética** o por **transferencia horizontal** de genes. Las bacterias que adquieren resistencia por **mutación genética** pueden presentar modificaciones en la diana antimicrobiana, reducir la afinidad o la internalización del fármaco (Abbas *et al.*, 2024), potenciar la activación de mecanismos de eflujo para expulsarlo (Krzyżek, 2024), o cambiar las rutas metabólicas de degradación de este (Gilmore *et al.*, 2020).

En cambio, aquellas que adquieren resistencia a través de la **transferencia horizontal** de genes lo hacen a través de mecanismos de transformación, transducción o conjugación (Munita and Arias, 2016). Por ejemplo, los genes ampC, codificantes de β -lactamasas, se transfieren mediante plásmidos. (Gude *et al.*, 2013)

1.2. Descubrimiento y desarrollo de antimicrobianos

La búsqueda de nuevos antibióticos existe desde los primeros hallazgos fortuitos de A. Fleming con la penicilina, un gran hito que ha incentivado el desarrollo de numerosas estrategias de búsqueda, hasta la fecha. (Katz and Baltz, 2016).

Los antimicrobianos son moléculas pequeñas, derivadas de un metabolito sintetizado por un organismo y cuya diana es una enzima esencial para otro microorganismo. Con este enfoque, la **primera estrategia** se basó en la búsqueda de microorganismos productores de sustancias antimicrobianas en muestras de suelo, fuente de diversidad microbiana y lugar de intercambio y transformación de sustancias entre comunidades microbianas y plantas. Se conoce como **test fenotípicos de células completas (Whole cell screenings)** y enfrenta al microorganismo productor, aislado del suelo, con los microorganismos frente a los que se quiere buscar sustancias inhibitorias observando si hay o no inhibición. (Katz and Baltz, 2016).

Este tipo de ensayos se realizaron de manera sistemática en la llamada “plataforma Waksman” (Waksman and Schatz, 1945), permitiendo el descubrimiento de las principales familias de antibióticos durante las décadas de 1940 y 1950: tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos y beta-lactámicos. A pesar de ello, esta metodología presentaba los inconvenientes de desconocer los mecanismos de acción de estas moléculas y la dependencia de la inhibición con la concentración o cepa utilizada en el screening (Hughes and Karlén, 2014).

En los siguientes 40 años, las campañas de cribado aislaban repetidamente los mismos productores de antibióticos (Durand, Raoult and Dubourg, 2019) ya conocidos, lo que hizo que no se descubrieran antimicrobianos nuevos. Este periodo de falta de nuevos descubrimientos entre los años 1960 y 2000 es considerado un “**agujero de innovación**” (Davies, 1996). Paralelamente, los antibióticos descubiertos hasta la fecha empezaron a dejar de ser efectivos generando resistencias (Walsh and Wencewicz, 2014).

El desarrollo de metodologías moleculares y biotecnológicas permitió muchos avances, como la secuenciación de genomas bacterianos, que incentivaron nuevas estrategias en el descubrimiento de antibióticos. Esta **segunda generación**, basada en un enfoque racional, buscaba compuestos que inhibiesen dianas esenciales (**Target-based approach**) (Katz and Baltz, 2016), así como mejorar y optimizar la actividad de los antimicrobianos ya conocidos, evitar resistencias y desarrollar derivados bio o semi sintéticos. Aunque se descubrieron fármacos como la espectinomicina y algunos derivados de las tetraciclinas, la estrategia fue finalmente abandonada por las farmacéuticas por el elevado coste de investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos, así como por la no reproducibilidad de la actividad *in vitro* con los ensayos *in vivo*. Los antimicrobianos no eran activos frente a la bacteria completa, principalmente debido a que no entraban en el interior de las bacterias, o éstas conseguían expulsar el fármaco o compensar esta inhibición (Hughes and Karlén, 2014).

Hay **tendencias actuales** que vuelven a los orígenes de **Whole cell screenings**, (Atanasov *et al.*, 2021) aunque con un enfoque diferente. Se busca aislar microorganismos ambientales no cultivables con técnicas convencionales (Espina, 2020), utilizando técnicas como iChip (Nichols *et al.*, 2010) o biorreactores de difusión (Chaudhary, Khulan and Kim, 2019) en las que los microorganismos se aíslan en su ambiente natural. Con estas metodologías se descubrieron antimicrobianos como la teixobactina, activa frente a gram positivas como *S. aureus*, (Ling *et al.*, 2015), o Clovibactina, activa frente a gram positivos *in vitro* e *in vivo*, (Katz and Baltz, 2016). Ambos dirigidos a una diana no proteica por lo que, aparentemente, se evita el desarrollo de resistencias.

Otro de los cambios asumidos en las tendencias actuales fue el **cambio de criterio** de selección. Se dejó de considerar a un antimicrobiano como aquel compuesto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano por inhibición de una diana esencial; a considerarlo como un compuesto capaz de inhibir o retrasar el crecimiento al inhibir una diana esencial o cualquier otra diana no esencial. (Gómara-Lomero *et al.*, 2023a)

Así mismo, se añadió una **nueva categoría de antimicrobianos** en la que se incluyen los adyuvantes y potenciadores de antibióticos o compuestos anti-resistencia. Y se promovió una alternativa al descubrimiento de fármacos llamada **reposiciónamiento**. Ésta consiste en la investigación de nuevos usos como antimicrobianos de fármacos ya aprobados en la clínica. Al conocer sus propiedades farmacológicas, se reducen los costes, el tiempo de desarrollo y de aprobación del fármaco (Farha and Brown, 2019, Gómara-Lomero *et al.*, 2023b).

1.3. Productos naturales

Las nuevas técnicas de secuenciación como Next Generation DNA sequencing han demostrado que, incluso en bacterias cultivables en laboratorio, la mayoría de los clusters de genes de biosíntesis (BGCs) bacterianos no se expresan en condiciones de laboratorio. Estos genes codifican enzimas responsables de la síntesis de metabolitos con actividad antimicrobiana y se activan por estímulos ambientales, por interacción con otros microorganismos o por regulación transcripcional; señales de las que carece en condiciones de laboratorio. Lo que evidencia la necesidad de combinar las ciencias ómicas (Rutledge and Challis, 2015) y las herramientas bioinformáticas con las técnicas de cultivo clásicas en la investigación de nuevos compuestos naturales antimicrobianos (Genilloud, 2019).

La búsqueda de nuevos microorganismos en ambientes extremos, la optimización de las condiciones de cultivo para la activación de BGCs silenciosos (Rutledge and Challis, 2015) o el co-cultivo de dos cepas bacterianas para activar la síntesis de antimicrobianos por competición, son algunas de las estrategias en las que se combinan ambas técnicas (Genilloud, 2019).

Así mismo ha surgido la metagenómica, una disciplina cada vez más relevante, en la que se estudia todo el material genético de una muestra ambiental sin necesidad de cultivar previamente los microorganismos. De forma relacionada, la Genómica de Productos Naturales se ha erigido como una ciencia que estudia las interacciones entre el metabolismo primario y secundario de los productos naturales y permite establecer la relación entre la secuencia genómica, la estructura del metabolito y la actividad biológica del mismo. Gracias a esta ciencia se han identificado y anotado nuevos BGCs responsables de la síntesis de productos antimicrobianos cuya expresión heteróloga de genes mutados permite sobreproducir compuestos naturales de interés (Genilloud, 2019).

De la mano de estas líneas de investigación en la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas, nació en 2012 Small World Initiative (Alvarado *et al.*, 2020, De Groot *et al.*, 2020) un proyecto estadounidense cuyo objetivo es la búsqueda de bacterias productoras de sustancias antimicrobianas o agentes de biocontrol en muestras de suelo, similar a lo que fue la plataforma Waksman.

En 2017-2018 este proyecto llegó a España, concretamente, a la Universidad Complutense de Madrid de la mano de Víctor J. Cid (Alvarado *et al.*, 2020; De Groot *et al.*, 2020) adquiriendo identidad propia como Micro Mundo.

Hoy en día, más de 30 universidades de España y Portugal participan en el proyecto Micro Mundo y en las que, a lo largo de 8 años de proyecto, se han descubierto un total de 6244 cepas prometedoras en la síntesis de antibióticos. Esto supone una tasa de positividad del 4,17%; uno de cada 25 microorganismos aislados mostró algún grado de actividad antimicrobiana frente a al menos una de las bacterias utilizadas en el análisis primario (Gil-Serna *et al.*, 2025).

En el proyecto, estudiantes escolares, con ayuda de voluntarios universitarios, aíslan un conjunto de bacterias a partir de una muestra de tierra. Las bacterias seleccionadas se enfrentan a dos bacterias testigo, una Gram positiva y otra Gram negativa, frente a la que se prueban la actividad antimicrobiana. Concluida la incubación se observa si ha habido inhibición de la bacteria testigo. Este ensayo se conoce como antibiosis y se realiza en los centros educativos (Alvarado et al., 2020; Lafuente et al., 2024)

Una vez terminado el aislamiento bacteriano y la antibiosis en los centros educativos, aquellas bacterias ambientales con actividad antimicrobiana frente a algún microorganismo testigo, se aíslan y se almacenan en crioviales a -80°C para su posterior estudio en la universidad (Pino-Hurtado et al., 2024).

Recientemente en la UCM se ha descrito una bacteriocina, aislada por estudiantes preuniversitarios, denominada altitudina A y producida por *Bacillus altitudinis*. (Lafuente et al., 2024)

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

El problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos ha puesto en marcha diversas investigaciones y proyectos científicos, como Micro Mundo (Gil-Serna et al., 2025b). Este proyecto busca, además de fomentar las vocaciones científicas, concienciar a la sociedad del buen uso de antibióticos y aislar bacterias productoras de sustancias antimicrobianas a partir de muestras ambientales.

Su éxito ha llevado a incrementar año tras año el número de personas participantes y, por consiguiente, el número de muestras analizadas, generando en la Universidad de Zaragoza un biobanco con más de 500 cepas prometedoras en la síntesis de nuevas sustancias antimicrobianas. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha implementado ninguna tecnología de cribado de alta capacidad o cribado masivo para valorar aquellas más interesantes tras el análisis primario realizado en los centros educativos.

El objetivo **principal** de este trabajo de fin de grado (TFG) es implementar una plataforma de cribado masivo para analizar, de una forma rápida y reproducible, las cepas del biobanco y seleccionar las candidatas con mejores características antimicrobianas. La plataforma se basa en utilizar cepas testigo fluorescentes, frente a las que buscar sustancias antimicrobianas, para observar, por seguimiento de fluorescencia, si se inhibe o no su crecimiento por acción de la cepa ambiental. **Se implementará y optimizará la plataforma con 10 cepas previamente caracterizadas, y posteriormente se validará con 10 cepas nuevas del biobanco.**

En base a esto, los **objetivos parciales** son los siguientes:

1. Selección y comprobación de la actividad antimicrobiana de 10 cepas previamente caracterizadas (Tabla 2) para su inclusión como cepas ambientales en la plataforma.
2. Caracterización del crecimiento de las bacterias fluorescentes (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *M. smegmatis*) para su valoración como posibles testigos en ensayos de inhibición de fluorescencia emitida. Este objetivo incluyó la creación de una cepa fluorescente de *M. smegmatis*.
3. Optimización de las condiciones de cultivo (medio de cultivo, temperatura, contacto entre testigo y ambiental) de la plataforma de cribado.
4. Validación de la plataforma mediante el análisis de resultados obtenidos con 10 nuevas cepas ambientales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron diferentes cepas bacterianas, clasificadas según el objetivo para el que han sido seleccionadas: cepas ambientales y cepas testigo. Todas ellas se almacenaron a -80 °C con 15% de glicerol (v/v) hasta su uso. Las condiciones de cultivo se reflejan en la Tabla 1.

En primer lugar, se utilizaron 21 cepas ambientales (Tabla 2) aisladas en los colegios con el proyecto Micro Mundo. Todas ellas almacenadas en el biobanco del departamento de microbiología en la facultad de medicina de la Universidad de Zaragoza. A excepción de VIALT y CU13 que fueron aisladas por la Dra. Laura Espina en el proyecto KTP 509858.

Por otro lado, contamos con bacterias testigo, aquellas frente a las cuales ensayaremos la actividad antimicrobiana, fluorescentes (Tabla 3) y no fluorescentes: *Bacillus subtilis*, *E.coli* (CECT 101), *E. coli* (perro), *E.coli* (conejo), *E. coli* (Sahai) *E. faecalis*, *L.monocytogenes*, *M. smegmatis* (mc²155), *M. luteus* (CECT 245), *P. aeruginosa* (ATCC 2785), *Salmonella* y *S.aureus* (CECT 794).

Tabla 1: Medio de cultivo, temperatura de crecimiento y fluorescencia según cepa.

Cepa testigo	Fluorescencia	Temperatura de cultivo (°C)	Medio de cultivo
Cepas ambientales	No	25	BHI (Brain Heart Infusion) (2 g/L Dextrosa, 10 g/L Peptona de gelatina, 10 g/L Infusión de corazón, 2,5 g/L Fosfato disódico, 5 g/L Cloruro sódico, 7,5 g/L Infusión de cerebro) (Condalab) y LB (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl) diluido 1/5 con agua estéril. (Líquido o sólido (+1,5%Agar (Condalab)
<i>Bacillus subtilis</i>	No	25	BHI y LB 1/5 (líquido o sólido)
Otras no fluorescentes	No	37	BHI y LB 1/5 (líquido o sólido)
<i>E. coli</i> (mCherry)	Sí	37	BHI y LB 1/5 (líquido o sólido)
<i>S. aureus</i> (GFP)	Sí	37	BHI y LB 1/5 (líquido o sólido)
<i>P. aeruginosa</i> (GFP)	Sí	37	BHI y LB 1/5 (líquido o sólido)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (GFP)	Sí	37	Líquido 7H9 + 0,05% Tween 80: Middlebrook 7H9 (BD Difco) + 0,2% glicerol (v/v) (Sigma) + 10% ADC (v/v) (0,5% albúmina sérica bovina - 0,2% dextrosa - 0,0003% catalasa - 0,085% NaCl) (BD Difco) Sólido 7H10 + 0,05% Tween 80: Middlebrook 7H10 (BD Difco) 0,05% tween 80: Middlebrook 7H9 (BD Difco) + 0,2% glicerol (v/v) (Sigma) + 10% OADC (v/v) (Acido oleico, 0,5% Albúmina sérica bovina - 0,2% Dextrosa - 0,0003%Catalasa-0,085%NaCl) (BD Difco)+ 17 g/L agar

Los medios de cultivo de las cepas bacterianas fluorescentes están suplementados con antibióticos según la cepa: cloranfenicol utilizado a una concentración de 25µg/ml, ampicilina a 50µg/ml a e higromicina a 50µg/ml. Todos los antibióticos fueron almacenados a -20 °C.

Tabla 2: Cepas ambientales clasificadas por año y colegio de aislamiento. Cepas ambientales previamente caracterizadas (naranja). Cepas ambientales no caracterizadas (azul).

CEPA		Año de aislamiento	Colegio	CEPA	Año de Aislamiento	Colegio
Previamente caracterizadas	Z-CA-07-16	2018-2019	Alemán	Z-VAL-06-15	2018-2019	Valdespartera
	Z/SAL-06-12	2018-2019	Salesianos	Z-VAL-16-15	2018-2019	Valdespartera
	Z-UZ-B2-11	2018-2019	Universidad de Zaragoza	Z-UZ-B3-17	2018-2019	Universidad de Zaragoza
	Z/VAL-01-03	2018-2019	Valdespartera	Z-VAL-19-05	2018-2019	Valdespartera
	Z/VAL-01-24	2018-2019	Valdespartera	Z-VAL-14-11	2018-2019	Valdespartera
	Z/VAL-02-25	2018-2019	Valdespartera	Z-RM-08-21	2021-2022	Rosa Molas
	Z/VAL-03-8	2018-2019	Valdespartera	Z-VAL-14-04	2018-2019	Valdespartera
	CU13	2019-2020	Proyecto KTP 509858, Cardiff (UK)	VIALT	2019-2020	Proyecto KTP 509858, Cardiff (UK)
No caracterizadas	Z-DW-12-08	2021-2022	Etopía	Z-DW-35-03	2021-2022	Etopía
	Z-DW-12-09	2021-2022	Etopía	Z-DW-39-02	2021-2022	Etopía
	Z-DW-14-10	2021-2022	Etopía	Z-DW-46-01	2021-2022	Etopía
	Z-DW-15-10	2021-2022	Etopía	Z-DW-52-02	2021-2022	Etopía
	Z-DW-34-08	2021-2022	Etopía	Z-DW-52-09	2021-2022	Etopía

Tabla 3: Cepas testigos fluorescentes según el tipo de fluorescencia, marcador de selección, origen, referencia y hospedador.

CEPA	Fluorescencia	Marcador de selección	Origen	Referencia	Hospedador
E.coli pON.mCherry.	Plásmido no integrativo pON.mCherry	Cloranfenicol	Dra. Laura Espina y Alba Moreno	Cepa: (Cox et al., 2017) Plásmido: (Gebhardt, Jacobson and Shuman, 2017)	Δ bamB Δ tolC BW25113. Cepa hiperpermeable
M.Smegmatis pMV361	Plásmido integrativo pMV361GFP	Higromicina.	Se generó para este TFG.	Astarie-Dequeke et al., 2009)	mc2155
P.aeuroginosa (PAO1-GFP)	Plásmido integrativo pUC18T-mini-Tn7T-Gm -GFP	---	--	Choi and Schweizer, 2006	P. aeruginosa PAO1
S. aureus GFP	Plásmido no integrativo pCN46 GFP	Eritromicina	--	Turner et al., 2024	S. aureus 132

3.2. Ensayo de antibiosis en medio sólido

El ensayo de antibiosis se realiza para determinar si una bacteria (en nuestro caso ambiental) es capaz de inhibir en medio sólido, el crecimiento de otra bacteria (en nuestro caso bacteria testigo), presumiblemente mediante la síntesis de metabolitos con capacidad antimicrobiana.

Se testaron 14 cepas ambientales, previamente caracterizadas (Domínguez A., 2020), (Tabla 2) que se enfrentaron a 11 cepas testigos, no fluorescentes, para confirmar si mantenían o no el fenotipo. Los ensayos se llevaron a cabo en medio sólido BHI y LB 1/5. Se hizo una siembra en césped de la bacteria testigo. Sobre este césped, se realizó una réplica de cada una de las bacterias ambientales que se quieren ensayar, previamente crecidas en medio sólido BHI. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24/48 h.

Concluido el tiempo de incubación, se observa si alrededor de las bacterias ambientales se ha generado o no un halo de inhibición. La existencia de halo de inhibición indica que la bacteria ambiental genera sustancias que inhiben el crecimiento del microorganismo testigo (Pino-Hurtado *et al.*, 2024).

3.3. Generación de la cepa *M. smegmatis* + pMV361GFP

La implementación de la plataforma necesita disponer de cepas testigo fluorescentes. Se contaba con un representante de las bacterias gram positivas: *S. aureus* GFP y dos representantes de las gram negativas: *E. coli* pON.mCherry y *P. aeruginosa* GFP, pero no se tenía un representante del género *Mycobacterium*. Por ello, se transformó la cepa *M. smegmatis* mc²155 el con el plásmido pMV361 GFP, plásmido integrativo resistente a higromicina y con el gen de fluorescencia GFP.

Se preparó un lote de bacterias electrocompetentes siguiendo el protocolo correspondiente. Brevemente, se inoculan 200 ml de medio 7H9 + 0,2% glicerol (v/v) (Sigma) + 10% ADC (v/v) con 3 ml de un cultivo *Mycobacterium smegmatis* mc²155 crecido hasta fase estacionaria en el mismo medio de cultivo. Se incuba O.N. a 37 °C y en agitación.

Pasado el tiempo de incubación, las bacterias se enfriaron en hielo durante 1h.30' y se recuperaron, posteriormente, mediante centrifugación a 3500 rpm durante 10' a 4 °C. El pellet resultante fue lavado tres veces con una solución enfriada en hielo previamente de glicerol 10% (v/v) + Tween 20 al 0,05%, disminuyendo paulatinamente el volumen. Se centrifugó a 3500 rpm durante 10' a 4 °C entre cada lavado. Finalmente, las bacterias electrocompetentes se resuspendieron en 2 ml de una solución de glicerol 10% (v/v) + Tween 20 0,05% previamente enfriada y se prepararon alícuotas que se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Todos los lavados se realizaron en frío para minimizar la pérdida de viabilidad.

3.3.1. Transformación

Se transformó una alícuota de 100 µL de células competentes, con 100 ng de plásmido pMV361-GFP (100 ng/µL, previamente purificado y cedido por la Dra. Ainhoa Arbués (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009)), por electroporación. Se utilizó Gene Pulser (Bio-Rad) a 2,5 kV, 25 µF de capacitancia y 1000 Ω de resistencia, parámetros recomendados para micobacterias. Del mismo modo se transformó una alícuota de competentes con 1 µL de agua estéril como control.

Las bacterias transformadas fueron recuperadas en 7H9 + glicerol + ADC e incubadas durante 3 h a 37 °C sin antibiótico para favorecer la recuperación bacteriana y permitir la expresión del cassette de resistencia. Posteriormente, se plaquearon en Middlebrook 7H10 suplementadas con OADC (10% v/v) e higromicina (100 µg/mL) para seleccionar las colonias transformantes. Las placas se incubaron a 37 °C durante 4 días hasta la aparición de colonias.

3.3.2. Comprobación

Se seleccionaron 5 colonias transformantes que se sometieron a 95°C durante 10 minutos para extraer de forma rápida su material genético, y verificar por PCR y electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, la correcta adquisición del plásmido. Las parejas de cebadores utilizados se dirigen específicamente al gen de resistencia a higromicina (Hyg Fw: CTGCGGAACGACCAGGAATT; Hyg Rv: GACCTCGGAATGGGGGG) y la polimerasa utilizada fue MyTaq DNA Polymerase (Bioline).

El ciclo de PCR que se utilizó empieza con una desnaturación a 95°C, 10 min seguida de 35 ciclos (Desnaturalización: 95 °C (15 segundos), Hibridación: 58 °C (15 segundos) y Elongación: 72 °C (50 segundos) y termina con una elongación final a 72 °C durante 7 minutos.

Paralelamente, se midió la fluorescencia con el filtro de excitación 485/20 nm y de emisión 540/535 nm de las 5 cepas transformantes para seleccionar aquella con mayor intensidad de fluorescencia con el fin de utilizarla en el resto de los ensayos.

3.4. Relación D.O/ CFU

La relación entre unidades formadoras de colonias y un valor de densidad óptica permite estimar de forma indirecta la concentración de bacterias viables en un cultivo líquido. Esta metodología se basa en la medida de turbidez, proporcional al número de células, utilizando un espectrofotómetro calibrado a una longitud de onda de 600 nm.

Para *P. aeruginosa* GFP, *S. aureus* GFP y *E. coli* pON.mCherry se midió la densidad óptica de un cultivo ON en BHI y se prepararon 5 diluciones a diferentes densidades ópticas que, posteriormente, se plaquearon también en medio BHI. Todas las diluciones se realizaron con BHI y las placas se incubaron a 37 °C, 24 h.

En el caso de *M. smegmatis* pMV361 GFP, los medios utilizados fueron 7H9 y 7H10 y las placas se incubaron 48 h a 37 °C. Cada medio de cultivo es suplementado con el antibiótico necesario según la cepa. Transcurrido el tiempo de incubación se contó el número de colonias y se estableció la relación D.O. y ufc/ml.

3.5. Curva de crecimiento de los microorganismos fluorescentes

Con el objetivo de determinar si era posible monitorizar el crecimiento de las cepas testigo en base a la medida de fluorescencia, se realizó una curva de crecimiento de cada uno de ellos. Se ensayó en tres medios de cultivo diferentes BHI, LB ½ y Mix (½ BHI y ½ LB ½) y a dos temperaturas: 37 °C y 25 °C.

Se prepararon cultivos ON de *P. aeruginosa* GFP, *S. aureus* GFP y *E. coli* pON.mCherry en medio BHI suplementado con el antibiótico correspondiente según la cepa. A partir de este cultivo, se ajusta un inóculo bacteriano de 10^4 ufc/ml en un volumen final de 5 ml de BHI, LB ½ o Mix (½ BHI y ½ LB ½), sin antibiótico.

Los nueve cultivos resultantes, tres medios diferentes de cada una de las tres cepas, se dispensaron por octuplicado en una placa de 96 pocillos. Se añadieron como controles los medios de cultivo sin inóculo bacteriano. Se tomaron durante 24 h medidas de absorbancia y fluorescencia, cada hora. En el caso de GFP la fluorescencia se midió con el filtro de excitación 485/20 nm y de emisión 528/20nm, y para mCherry se usó el filtro de emisión 530/25 y de excitación 600/40. En todo caso, la absorbancia se midió a 600nm.

Para curva de crecimiento de *M. smegmatis* pMV361 GFP, el cultivo inicial se lanzó en medio 7H9 suplementado con higromicina (50µg/ml) y ADC 10% durante 48 h; y los medios elegidos fueron: 7H9, 7H9+LB $\frac{1}{5}$, LB $\frac{1}{5}$, 7H9+BHI y BHI. Al igual que el resto de las cepas el inóculo inicial fue de 10^4 ufc/ml y se dispensaron 8 réplicas por cada medio de cultivo. Se incubó a 37 °C y se tomaron medidas de absorbancia y fluorescencia emitida por GFP cada 2 horas durante 70 h.

En todos los casos, el análisis de datos se hizo con los datos de fluorescencia de cada una de las medidas, a los que se eliminó la fluorescencia basal del medio de cultivo.

3.6. Ensayo de inhibición

El ensayo de inhibición determina si una bacteria (en nuestro caso ambiental) es capaz de inhibir en medio líquido, el crecimiento de otra bacteria (en nuestro caso bacteria testigo fluorescente), presumiblemente mediante la síntesis de metabolitos con capacidad antimicrobiana. Se ensayó en co-cultivo y por adición del sobrenadante, ambos en BHI y LB $\frac{1}{5}$.

3.6.1. Co-cultivo

En el ensayo de inhibición en co-cultivo se enfrentaron directamente la cepa testigo fluorescente con la cepa ambiental, y se realizó en placas de 96 pocillos. Se probaron dos tiempos diferentes de incubación de las cepas ambientales antes de enfrentarlas a las testigos: 0 y 1 semana, de esta forma, se comprobó si un aumento en el tiempo de incubación se correlacionaba o no con un aumento en la producción de sustancias antimicrobianas de interés. Se realizaron medidas de fluorescencia y absorbancia a 0 y 24 h para cuantificar por fluorescencia, el crecimiento de la cepa testigo fluorescente. Todo el ensayo se desarrolló a temperatura de 37 °C.

En el ensayo a **0 semanas** se partió de cultivos líquidos de 11 cepas ambientales tras 4 días de incubación) y cultivos ON de cada una de las cepas fluorescentes, suplementados con los antibióticos correspondientes según la cepa. Todos ellos se ajustaron a una densidad óptica de 0,1 y posteriormente se diluyeron 1/100. Esto corresponde a un rango entre 4.5×10^4 - 5.5×10^5 CFU/ml, ideal para determinaciones similares a la determinación de MIC según un protocolo estandarizado ISO 20776-1.

Por su parte, en el ensayo que corresponde a **1 semana**, se utilizaron los cultivos ambientales tras 1 semana de incubación, y las cepas testigo ajustadas a un inóculo inicial entre 4.5×10^4 y 5.5×10^5 CFU/ml. Las cepas ambientales se probaron por cuadruplicado, a excepción de VIALT y CU13 por duplicado, con cada cepa fluorescente. Cada pocillo contenía 100 µl del cultivo de la cepa ambiental y 100µl de la cepa fluorescente. Se incluyeron los controles pertinentes: medio de cultivo sin inocular, cepas ambientales sin cepa fluorescente y cepa fluorescente sin cepa ambientales, manteniendo el inóculo correspondiente y el volumen de 200µl.

Se realizaron las medidas de fluorescencia a tiempo 0 y 24 h. En el caso de GFP la fluorescencia se midió con el filtro de excitación 485/20 nm y de emisión 540/535 nm, y para el plásmido mCherry se usó el filtro de excitación 528/20 y de emisión 600/40. En ambos casos, la absorbancia se midió a 600nm.

En el ensayo de inhibición con la cepa *M. smegmatis* GFP las medidas de absorbancia y fluorescencia se realizaron a las 0 y 48 h. El resto del protocolo se mantuvo constante.

Cabe destacar que sólo los preinóculos están suplementados con el antibiótico correspondiente según la cepa. En el resto de las diluciones y en el ensayo de co-cultivo, el medio de cultivo no contendrá antibiótico para no interferir en el crecimiento de la bacteria ambiental.

3.6.2. Adición de sobrenadante

Algunas bacterias tienen la capacidad de excretar las sustancias antimicrobianas al exterior. Para comprobarlo, se realizó un ensayo de inhibición enfrentando los sobrenadantes bacterianos de los cultivos ambientales con las cepas fluorescentes.

Se partió de los cultivos ambientales tras 1 semana de incubación, se centrifugaron 10' a 3500 rpm y el sobrenadante se hizo pasar por un filtro de 2 μm para asegurar la ausencia de bacterias. Los preinóculos de las bacterias fluorescentes se ajustaron a una D.O = 0,1 y posteriormente se diluyeron 1/100 para obtener un inóculo inicial entre 4.5×10^4 y 5.5×10^5 CFU/ml

Los sobrenadantes se probaron por cuadruplicado, a excepción de VIALT y CU13 por duplicado, con cada cepa fluorescente. Cada pocillo contenía 100 μl de sobrenadante filtrado y 100 μl de la cepa fluorescente. En cada placa se incluyeron los siguientes controles: medio sin inocular, sobrenadantes sin cepa fluorescente y cepas fluorescentes sin sobrenadante manteniendo el inóculo correspondiente y el volumen de 200 μl .

Se realizaron medidas de fluorescencia y absorbancia a 0 y 24 h. La fluorescencia GFP y mCherry y la absorbancia se midieron igual que en los ensayos de co-cultivo. En el ensayo de inhibición con la cepa *M. smegmatis* GFP las medidas se realizaron a las 0 y 48h. El resto del protocolo se mantuvo constante.

4. RESULTADOS

4.1. Antibiosis

En estudios anteriores realizados en el grupo, se había observado un fenotipo variable en las cepas ambientales. El ensayo de antibiosis se llevó a cabo para confirmar el espectro de acción de dichas cepas previamente caracterizadas y seleccionar aquellas que mostraban su actividad de manera más reproducible. Las que mantuvieron el fenotipo estable se eligieron para la validación de la plataforma.

Se ensayaron un conjunto de 14 cepas ambientales caracterizadas previamente, frente a 11 cepas testigo en medio BHI agar y LB $\frac{1}{5}$ agar. Se comprobó si en ambos medios se reproducía el espectro de actividad y si alguno de los dos mostraba ventajas en la inhibición. Las cepas ambientales seleccionadas para este ensayo fueron las siguientes: Z/CA-07-16, Z/SAL-06-12, Z/UZ-B2-11, Z/UZ-B3-17, Z/VAL-01-03, Z/VAL-01-24, Z/VAL-02-25, Z/VAL-03-8, Z/VAL-06-15, Z/VAL-16-15, Z/VAL-19-05, Z/VAL-14-11, Z/RM-08-21 y Z/VAL-14-04. Por su parte las cepas testigo elegidas fueron: *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium smegmatis mc2155*, *E. coli* (perro), *E. coli* (conejo), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* (Sakai), *Micrococcus luteus* y *S. aureus*.

Tras 24 h de incubación (48h en el caso de *Mycobacterium smegmatis*) se espera que alrededor de las cepas ambientales capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria testigo (presumiblemente mediante la síntesis de metabolitos con capacidad antimicrobiana), se observe un halo de inhibición. En tal caso, la antibiosis es positiva. Se considera pues un halo de inhibición cuando se observa una falta de crecimiento de la cepa testigo, alrededor de la cepa ambiental. (Fig.1)



Figura 1: Antibiosis en BHI con cepa testigo *Bacillus subtilis*. Las cepas que muestran halo de inhibición son: 1, 6, 7, 9 y 11

Los resultados de todas las antibiosis realizadas se encuentran en la Tabla A1 (anexo). Con estos resultados, se eligieron las 7 cepas con fenotipo más consistente de actividad, dentro de la variabilidad biológica que se encuentra, frente a las cepas *E. coli* (Gram negativo) y frente a Gram positivos (**Z/CA-07-16**, **Z/UZ-B2-11**, **Z/UZ-B3-17**, **Z/VAL-06-15**, **Z/VAL-16-15**, **Z/RM-08-21**, **Z/VAL-14-04**). Priorizamos aquellas con actividad frente a las Gram negativas ya que, en general presentan una mayor resistencia a los antimicrobianos. (Munita and Arias, 2016).

Así mismo, se seleccionó **Z/VAL-19-05**, cepa sin un amplio espectro de actividad ni fenotipo constante para que sirviera como control de no actividad en la validación de la plataforma, y **Z/VAL-14-11** como cepa interesante por los resultados obtenidos en trabajos anteriores. A estas 9 cepas se le sumaron las cepas ambientales VIALT y CU13.

4.2. Transformación de *M. smegmatis* + pMV361GFP

Debido a la necesidad de cepas fluorescentes en la implementación de la plataforma de cribado, se generó una cepa de *M. smegmatis* con el plásmido pMV361GFP como representante del género *Mycobacterium*. Se generó un lote de *M. smegmatis* mc²155 electrocompetentes que se transformaron con el plásmido integrativo, fluorescente y resistente a higromicina pMV361GFP. De las colonias transformantes se seleccionaron 5 resistentes a higromicina para comprobar la presencia del plásmido por PCR.

Los oligos se dirigían al cassette de resistencia a higromicina (1,7kb) (Garbe *et al.*, 1994) por lo que solo se amplificaron aquellas cepas que contenían el plásmido. El plásmido purificado y la cepa WT sin transformar servirán como controles positivo y negativo respectivamente.

El resultado obtenido muestra la banda correspondiente al plásmido a la misma altura que las observadas en las 5 colonias transformantes (Fig 2). Esto permite confirmar que las 5 cepas seleccionadas han adquirido el plásmido y no son mutantes espontáneas a la higromicina.

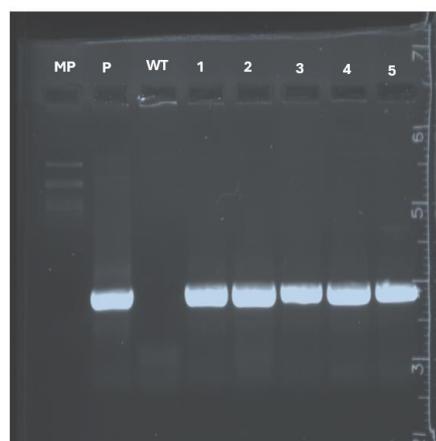


Figura 2: Resultado de la PCR de amplificación sobre el gen de resistencia a Hyg. MP: marcador de pesos moleculares. P: plásmido Pmv361GFP. WT: cepa *M. smegmatis* WT. 1: colonia 1 transformante. 2: colonia 2 transformante. 3: colonia 3 transformante. 4: colonia 4 transformante. 5: colonia 5 transformante.

Tras la medición de la fluorescencia, se eligió la transformante 2 para los ensayos (Tabla 4).

Tabla 4: Valores de fluorescencia GFP de las colonias transformantes de *M. smegmatis* GFP

CEPA	WT	1	2	3	4	5
Valor de fluorescencia	80,75±5,12	133,5±6,78	151±12,57	107,75±13,23	105,75±36,22	127,5±5,74

4.3. Relación D.O/CFUs

Se estableció una relación entre las ufc/ml y la densidad óptica de las cepas fluorescentes. Se prepararon 4 diluciones a distintas densidades ópticas que se plaquearon e incubaron a 37 °C para hacer el recuento de colonias. Las medias aritméticas de ufc/ml se graficaron frente a las D.O. Las relaciones se reflejan en la Tabla 5 y las gráficas en la Fig. A1 (anexo).

Tabla 5: Relaciones D.O /ufc/ml de cada una de las cepas fluorescentes

CEPA	RELACIÓN D.O/CFU	CEPA	RELACIÓN D.O/CFU
<i>E. coli</i> pON.mCherry	DO 0,16 → 4,8x10 ⁷ ufc/ml	<i>S. aureus</i> GFP	DO 0,18 → 5x10 ⁷ ufc/ml
<i>P. aeruginosa</i> GFP	DO 0,1 → 1x10 ⁷ ufc/ml	<i>M.smeqmati</i> s GFP	DO 0,16 → 3x10 ⁷ ufc/ml

4.4. Optimización de las condiciones de crecimiento

Realizando una curva de crecimiento buscamos comprobar si es posible monitorizar el crecimiento de las cepas testigo mediante medidas de la fluorescencia. Se probaron varias condiciones experimentales: 3 medios de cultivo BHI, LB $\frac{1}{5}$ y mix (mezcla al 50% de ambos medios (BHI y LB $\frac{1}{5}$)) y dos temperaturas: 25 °C (temperatura óptima para los microorganismos ambientales) y 37 °C (temperatura óptima para las cepas testigo). Las condiciones óptimas elegidas servirán para ensayar la plataforma de cribado.

Se eligió BHI como medio nutritivo y de referencia en el aislamiento inicial y LB diluido $\frac{1}{5}$ como medio con escasez de nutrientes que simule condiciones extremas de cultivo en las que se espera que se activen los BGCs. El medio de cultivo mezcla, 50% de ambos medios (BHI y LB $\frac{1}{5}$), se planteó como alternativa en caso de que las cepas testigo no crecieran bien en medio pobre LB $\frac{1}{5}$.

Con lo que respecta a las dos temperaturas, el objetivo fue estudiar si las cepas testigo crecían bien a la temperatura óptima para las ambientales.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto en BHI como en LB $\frac{1}{5}$ las cepas testigo crecen correctamente (Fig. 3). Así mismo, se observó que en 24 h la ventana de análisis que había en los valores de fluorescencia era suficientemente amplia para detectar una posible inhibición. Por lo que se puede monitorizar el ensayo de inhibición por seguimiento de fluorescencia tanto en el fluoróforo rojo (Fig.3A) como en el verde (Fig. 3B).

Las curvas de crecimiento del resto de cepas testigo se encuentran en la Fig.A2 (anexos).

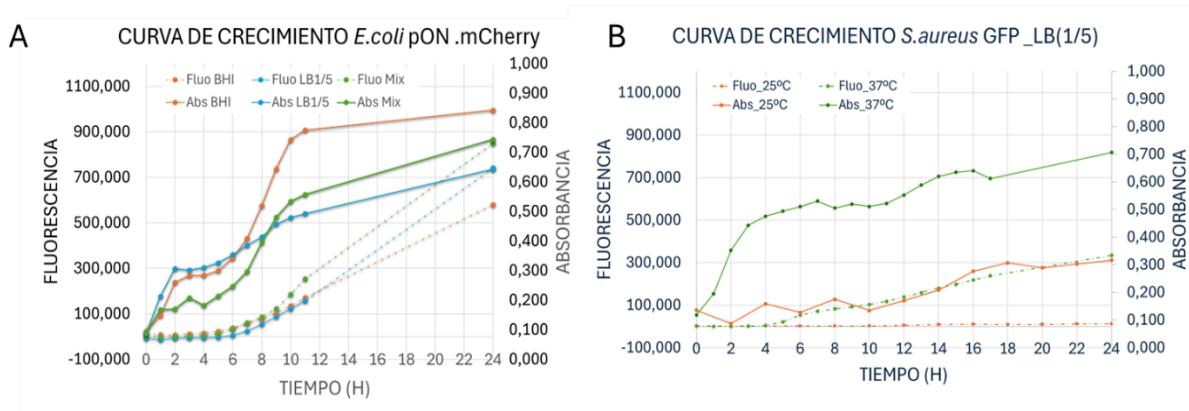


Figura 3: A: Curva de crecimiento de *E.coli* pON.mCherry en medios BHI (naranja), LB $\frac{1}{5}$ (azul) y MIX (verde). B: Curva de crecimiento de *S.aureus* GFP en medio LB $\frac{1}{5}$ a 25 °C (naranja) y 37 °C (verde). Se representan las fluorescencias en líneas discontinuas y las absorbancias con líneas continuas. * No se muestran las barras de error para mejorar la claridad de imagen

Por otro lado, los resultados a 24 h muestran que las cepas fluorescentes a 37 °C han alcanzado valores de fluorescencia más altos que a 25 °C y es que algunas de ellas presentan un crecimiento mucho menor a 25 °C. Todo ello llevó a elegir, los medios de cultivo BHI y LB $\frac{1}{5}$, una temperatura de incubación de 37 °C, y el tiempo de medida a las 24 h, como condiciones a ensayar en la inhibición para las cepas testigo: *E. coli* pON.mCherry, *S. aureus* GFP y *P. aeruginosa* GFP.

Para *M. smegmatis* GFP, se probaron otros medios de cultivo y una única temperatura: 37 °C. Se descartó 25 °C debido al crecimiento ya de por sí lento de las micobacterias, como *M. smegmatis*, que necesitaría a esta temperatura entre 1-2 semanas para llegar a fase estacionaria.

En cuanto a los medios de cultivo, se ensayaron 7H9 como medio de cultivo de referencia de las micobacterias, LB $\frac{1}{5}$ como medio mínimo de nutrientes y BHI como medio de aislamiento original de las cepas ambientales. Como alternativa a que *M. smegmatis* GFP no pudiera crecer en LB $\frac{1}{5}$ o BHI se probaron medios mezcla: 7H9+LB $\frac{1}{5}$ (50% de cada medio de cultivo) y BHI+7H9 (50% de cada medio de cultivo), respectivamente.

Lo que se observó es que en los medios LB $\frac{1}{5}$, BHI+7H9 y BHI, *M. smegmatis* GFP formaba agregados dando una señal errónea de fluorescencia e impidiendo la monitorización del ensayo. En el resto de los medios, la cepa fluorescente creció correctamente (Fig. A3, anexo).

Las condiciones elegidas para los ensayos de inhibición con *M. smegmatis* son: medio de cultivo 7H9+LB $\frac{1}{5}$, una temperatura de incubación de 37 °C y el tiempo de medida a las 48h.

4.5. Optimización de las condiciones del ensayo de inhibición

El ensayo de inhibición permite estudiar si una bacteria (en nuestro caso ambiental) es capaz de inhibir el crecimiento de otra bacteria (en nuestro caso bacteria testigo fluorescente), presumiblemente mediante la síntesis de metabolitos con capacidad antimicrobiana.

Para ello, se enfrentan las 11 cepas ambientales previamente caracterizadas, seleccionadas tras los ensayos de antibiosis, con 4 cepas testigo fluorescentes: *E. coli* pON.mCherry, *P. aeruginosa* GFP, *S. aureus* GFP y *M. smegmatis* GFP. Se enfrentaron en co-cultivo y con los sobrenadantes de las cepas ambientales.

Esto nos da información de si las cepas seleccionadas inhiben más por competición o interacción interespecífica entre cepas (antagonismo, sinergismo o comensalismo), o si, por el contrario, su actividad antimicrobiana viene determinada por sustancias antimicrobianas secretadas. La interacción microbiana en co-cultivo puede activar BGCs lo que aumentaría la síntesis de sustancias antimicrobianas.

Así mismo, el ensayo de co-cultivo se realizó a 0 y 1 semanas de incubación de las cepas ambientales, para comprobar si un mayor tiempo de incubación se correlaciona con un aumento de la síntesis de sustancias antimicrobianas. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C en placas de 96 pocillos y en los medios de cultivo BHI y LB ½. Las medidas de absorbancia y fluorescencia se realizaron a 0 y 24h.

Cabe destacar que todas estas condiciones de cultivo se probaron para *E. coli* pON.mCherry, *P. aeruginosa* GFP y *S. aureus* GFP. Mientras que para *M. smegmatis* GFP solo se realizaron los ensayos en LB ½ de co-cultivo a 0 semanas de incubación y por adición de sobrenadantes. Las medidas de absorbancia y de fluorescencia se realizaron a 0 y 48 h.

Cada una de las placas contenía la cepa ambiental en cuadruplicado, y los controles pertinentes, que se utilizaron, para cuantificar la inhibición: medio de cultivo (BHI o LB ½) sin inóculo, cepas testigo fluorescentes sin cepa o sobrenadante ambiental, y cultivos o sobrenadantes ambientales sin la cepa fluorescente.

Para analizar los resultados, los valores de fluorescencia se trataron matemáticamente y se representaron en porcentajes de crecimiento con respecto a la cepa testigo (100%).

Se restó el control de la cepa ambiental a la media de los cuadruplicados para eliminar la fluorescencia basal del medio de cultivo y de la cepa ambiental, (ecuación 1). También se restó la fluorescencia del medio de cultivo a la media de la cepa testigo, (ecuación 2). Y se relacionaron los valores de fluorescencia de las cepas ambientales con respecto al de la cepa testigo en función de porcentaje, (ecuación 3).

$$\text{Ecuación 1: } F_A = \bar{x}_A - C_A$$

$$\text{Ecuación 2: } F_T = \bar{x}_T - C_M$$

$$\text{Ecuación 3: }$$

$$\% \text{Crecimiento} = \frac{F_A}{F_T} \cdot 100$$

F_A =Fluorescencia cepa ambiental

\bar{x}_A =Media valores de fluorescencia cepa ambiental

C_A =Control cepa ambiental

F_T =Fluorescencia cepa testigo

C_M =Control medio de cultivo

\bar{x}_T = Media valores de fluorescencia cepa testigo

Los resultados de fluorescencia que se obtienen en los controles del ensayo a 0 y 24 h, en co-cultivo a 0 semanas y a 1 semana se reflejan en la Tabla 6 para *E. coli* pON.mCherry (fluoróforo rojo) y en la Tabla 7 para *S. aureus* GFP (fluoróforo verde).

Tabla 6: Valores de fluorescencia de 0 y 24 h para *E. coli* pON.mCherry en los ensayos de inhibición en co-cultivo a 0 y 1 semanas.

MEDIO	CONTROL	<i>E. coli</i> pON.mCherry					
		0w			1w		
		n	Tiempo =0h	Tiempo =24h	NºREP	Tiempo =0h	Tiempo =24h
LB 1/5	LB 1/5	2	168,5±3,54	133±2	1	27	34
	<i>E. coli</i> pON.mCherry	3	171,33±3,21	287±72,55	2	27±1,41	342,5±99,7
	Z/CA-07-16	1	159	127	1	27	37
	Z/UZ-B2-11	1	160	128	1	31	41
	Z/UZ-B3-17	1	162	131	1	29	39
	Z/VAL-06-15	1	163	129	1	30	33
	Z/VAL-16-15	1	165	135	1	31	34
	Z/VAL-19-05	1	168	134	1	35	31
	Z/VAL-14-11	1	168	137	1	35	39
	Z/RM-08-21	1	163	136	1	34	33
	Z/VAL-14-04	1	164	137	1	33	37
	CU13	1	160	126	1	26	29
	Vial -T	1	169	132	1	34	29
	ANEXO Tabla A2<---	Co-cultivo					
BHI	BHI	3	225,33±5,51	229,5±4,95	1	131	156
	<i>E. coli</i> pON.mCherry	3	222,33±9,81	1037,66±188,69	2	144±2,83	697,5±161,93
	Z/CA-07-16	1	220	232	1	156	163
	Z/UZ-B2-11	1	228	232	1	151	158
	Z/UZ-B3-17	1	230	239	1	156	167
	Z/VAL-06-15	1	209	231	1	155	161
	Z/VAL-16-15	1	227	230	1	155	162
	Z/VAL-19-05	1	225	238	1	149	156
	Z/VAL-14-11	1	230	241	1	156	170
	Z/RM-08-21	1	234	240	1	152	164
	Z/VAL-14-04	1	233	288	1	156	174
	CU13	1	231	245	1	160	161
	Vial -T	-	-	-	1	159	163
	ANEXO Tabla A2<---	Co-cultivo					

Tabla 7: Valores de fluorescencia a 0 y 24 h de para *S. aureus* GFP de los ensayos de inhibición en co-cultivo a 0 y 1 semanas.

MEDIO	CONTROL	<i>S. aureus</i> GFP					
		0w			1w		
		n	Tiempo =0h	Tiempo =24h	NºREP	Tiempo =0h	Tiempo =24h
LB 1/5	LB 1/5	1	59	52	1	77	79
	<i>S. aureus</i> GFP	2	59,5±0,71	500,5±501,34	2	80,5±2,12	359±79
	Z/CA-07-16	1	58	58	1	100	98
	Z/UZ-B2-11	1	61	139	1	100	101
	Z/UZ-B3-17	1	62	59	1	95	98
	Z/VAL-06-15	1	62	241	1	101	93
	Z/VAL-16-15	1	63	65	1	94	106
	Z/VAL-19-05	1	63	55	1	97	105
	Z/VAL-14-11	1	63	62	1	107	117
	Z/RM-08-21	1	63	58	1	97	84
	Z/VAL-14-04	1	61	578	1	100	111
	CU13	1	60	70	1	111	153
	Vial -T	-	-	-	1	107	172
	ANEXO Tabla A3<---	Co-cultivo					
BHI	BHI	2	385±15,5	374,5±13,43	2	472±12,72	479,5±20,5
	<i>S. aureus</i> GFP	2	389±0	561,5±36,06	2	538±4,24	551±7,07
	Z/CA-07-16	1	342	391	1	925	889
	Z/UZ-B2-11	1	359	364	1	908	881
	Z/UZ-B3-17	1	387	360	1	950	925
	Z/VAL-06-15	1	397	440	1	922	915
	Z/VAL-16-15	1	397	382	1	914	891
	Z/VAL-19-05	1	390	387	1	646	606
	Z/VAL-14-11	1	408	452	1	1351	1346
	Z/RM-08-21	1	407	379	1	963	930
	Z/VAL-14-04	1	394	548	1	1250	1604
	CU13	1	402	410	1	731	1032
	Vial -T	-	-	-	1	612,25	618,25
	ANEXO Tabla A3<---	Co-cultivo					

Como se puede observar, se muestran diferencias en los **medios de cultivo** según el tipo de fluoróforo. Los valores de fluorescencia a las 24h (en el ensayo de 0W) en el rojo son 287 en la cepa testigo y entre 126-137 para las cepas ambientales en LB $\frac{1}{5}$ y 1037,6 en la testigo y entre 230-288 para las ambientales en BHI lo que indica que el ensayo se ha desarrollado con normalidad dejando una ventana de análisis amplia para observar la inhibición.

Por el contrario, los valores de fluorescencia en el fluoróforo verde son 500,5 en la testigo y entre 55-241 para las ambientales en medio LB $\frac{1}{5}$ y 561,5 en la testigo y entre 360-548 para las testigos en medio BHI. Estos resultados evidencian que el medio BHI en estas longitudes de onda emite mucha fluorescencia basal llegando a igualar los valores de fluorescencia de las cepas ambientales a los de la testigo e imposibilitando el seguimiento de la inhibición.

Este hallazgo es consistente con la literatura que reporta que diferentes fluoróforos pueden interactuar de diversas maneras con los componentes del medio de cultivo o con la autofluorescencia inherente de las bacterias, lo que puede afectar la sensibilidad del ensayo (Mihalcescu *et al.*, 2015)

Por otro lado, estos resultados también nos permiten comprar la condición experimental del co-cultivo **a 0 y 1 semanas de incubación** de las cepas ambientales (Tabla 6 y 7).

Los valores obtenidos a las 24 tras 1 semana de incubación (1W) para las cepas ambientales en BHI de ambos fluoróforos varían entre 156-174 con respecto a 697,5 de la testigo en el rojo y entre 618,25-1604 con respecto a la testigo 551 en el verde. Lo que muestra que a 1 semana de incubación los controles de las cepas ambientales tienen mucha fluorescencia por sí mismas y se enmascaran los resultados obtenidos. Los valores de fluorescencia de todos los ensayos de co-cultivo se encuentran en las Tablas A2 a A5 (anexo).

El análisis de todos los resultados nos permitió hacer un análisis comparativo entre los diversos factores analizados.

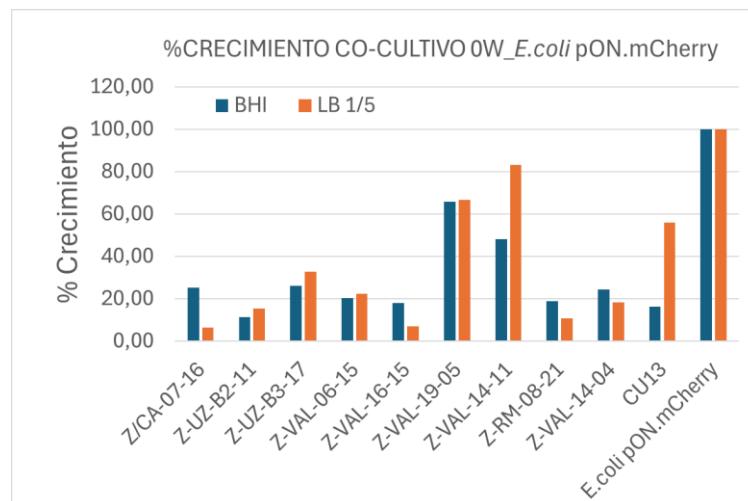


Figura 4: % de crecimiento de *E. coli* pON.mCherry en co-cultivo a 0 semanas de incubación, en medio LB $\frac{1}{5}$ (naranja) y en medio BHI (azul). * No se muestran las barras de error para mejorar la claridad de imagen ni VIALT por errores experimentales.

En primer lugar, si comparamos los resultados de los dos medios de cultivo en el fluoróforo rojo, (Fig. 4), se observa que la actividad antimicrobiana sigue la misma tendencia; ninguno de los medios resulta especialmente beneficioso en la síntesis de antimicrobianos y, en este caso, ambos serían óptimos para el ensayo de inhibición.

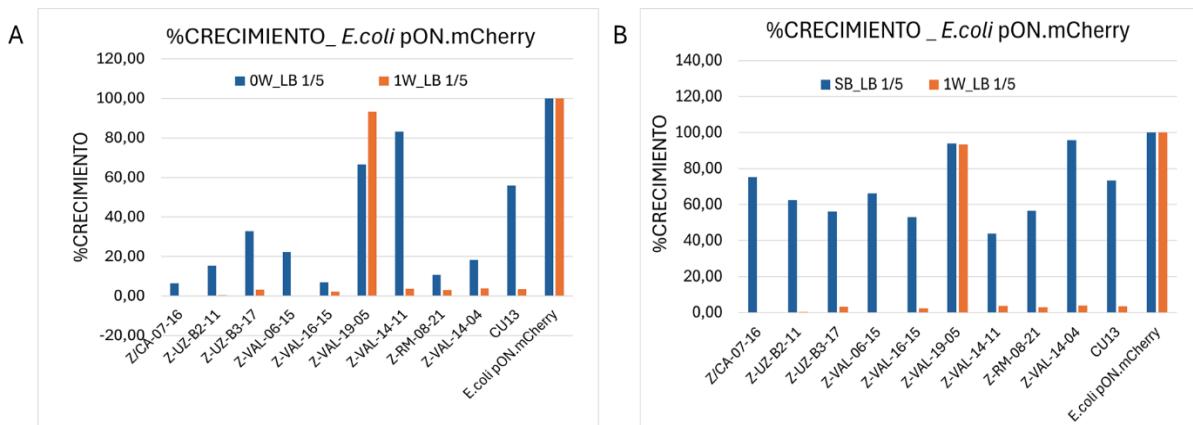


Figura 5: Representación del crecimiento en co-cultivo de *E. coli* pON.mCherry en medio LB 1/5. **A:** Se comparan la condición 0 semanas (azul) y 1 semana (naranja) de incubación de las cepas ambientales. **B:** Se comparan la condición 1 semana (naranja) de incubación de las cepas ambientales y ensayo con sobrenadante (azul). * VIALT no se muestra por errores experimentales. * No se muestran las barras de error para mejorar la claridad de imagen.

Paralelamente, se observó mayor actividad antimicrobiana en el ensayo realizado a 1 semana que a 0 semanas, lo que a priori hizo pensar que una mayor incubación se relacionaba directamente con una mayor producción de metabolitos antimicrobianos, (Fig. 5A). Este fenómeno se observa claramente en todas las cepas a excepción de Z-VAL-19-05.

A pesar de ello, al comparar estos resultados con los obtenidos en el ensayo con sobrenadante, cuyos cultivos también tenían una semana de incubación, se observó que no había correlación en la actividad antimicrobiana, (Fig. 5B). Las cepas que inhiben a 1 semana de incubación no lo hacían con los sobrenadantes, como ejemplo Z-VAL-14-04 que inhibe casi al 100% el crecimiento en co-cultivo y un 0% en sobrenadante.

Esto hizo pensar que el incremento de actividad antimicrobiana a una semana de incubación no era debido a un aumento en la síntesis de compuestos antimicrobianos, sino que, probablemente, estuviera ocurriendo una competición bacteriana entre la cepa ambiental y la testigo; ya que la elevada cantidad de bacterias que contenía el inóculo de las cepas ambientales no dejó crecer a las cepas testigo en las 24 h de ensayo.

Por lo que respecta a los resultados de ensayo de inhibición en co-cultivo a 0 semanas con *M. smegmatis* GFP, no fueron concluyentes (Tabla A5, anexo), puesto que la intensidad de la señal de fluorescencia de la cepa testigo era parecida a la medida basal de las cepas ambientales y no se pudo determinar una posible inhibición.

Todo ello llevó a concluir que, aunque en el fluoróforo rojo el BHI daba buenos resultados, la elevada fluorescencia emitida por las cepas ambientales en el verde, llevó a descartar dicho medio y a elegir LB 1/5 como el medio común entre ambos fluoróforos y, por tanto, como óptimo para el desarrollo de la plataforma. Así mismo, la elevada fluorescencia basal de los cultivos ambientales a 1 semana de incubación unida a la competición bacteriana en co-cultivo hicieron descartar esta condición y seleccionar **0 semanas como tiempo** óptimo de incubación.

Se analizaron, también, los resultados del ensayo de inhibición por adición de **sobrenadantes** para estudiar si alguna de las cepas seleccionadas excretaba al exterior las sustancias antimicrobianas producidas. Esperando, en ese caso, que la actividad antimicrobiana fuese mayor que la observada en condiciones de co-cultivo. Para ello, los cultivos ambientales con 1 semana de incubación se centrifugaron y los sobrenadantes filtrados se ensayaron frente a las cepas fluorescentes.

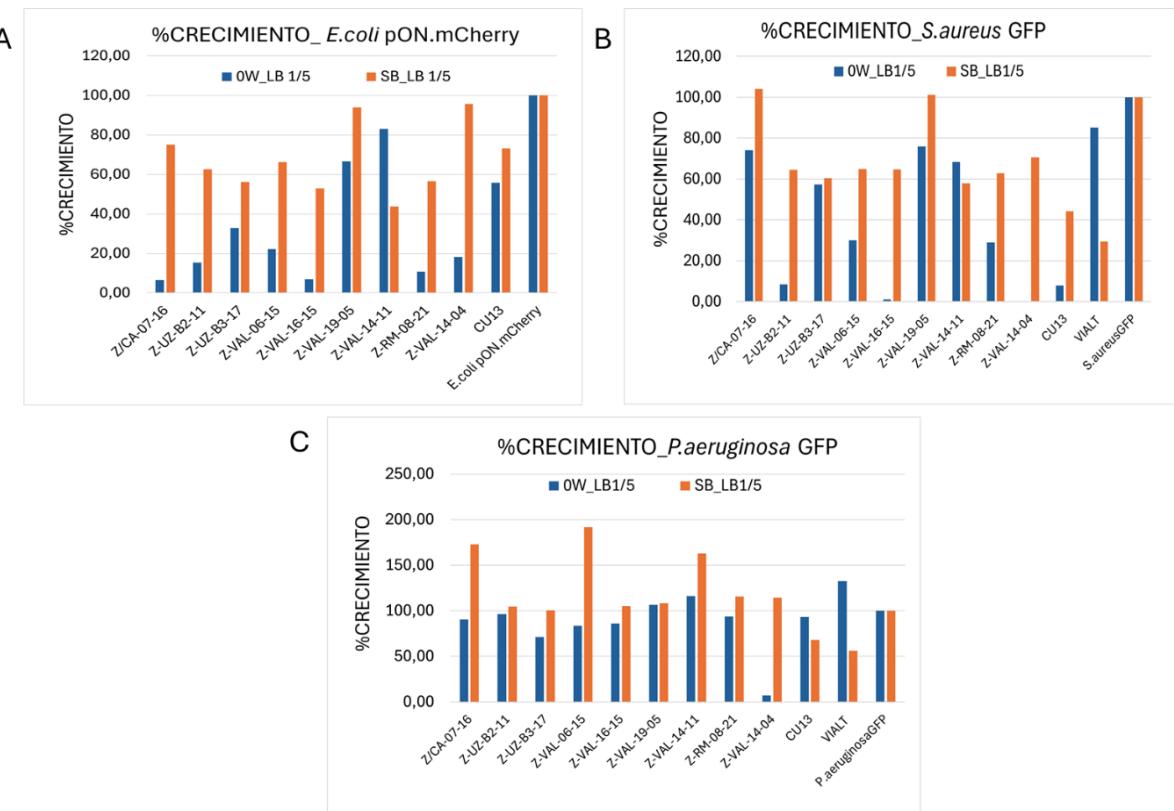


Figura 6: Se comparan la condición de co-cultivo a 0 semanas (azul) y sobrenadante (naranja) **A:** % crecimiento *E. coli* pON.mCherry. * VIALT no se muestra por errores experimentales. **B:** % crecimiento *S. aureus* GFP*Z-VAL-14-04 no se muestra por errores experimentales, **C:** % crecimiento *P. aeruginosa* GFP. * No se muestran las barras de error para mejorar la claridad de imagen.

Se observa que algunas cepas ambientales presentan un espectro de actividad diferente en el ensayo de inhibición por adición del sobrenadante que en co-cultivo, (Fig. 6). Esto indica que algunas de ellas parecen secretar las sustancias antimicrobianas al exterior y al ensayar el sobrenadante, inhiben el crecimiento de las cepas testigo. Mientras que el sobrenadante de otras no tiene efecto antimicrobiano, pero sí muestran actividad en co-cultivo (Tablas A6-A9, anexo).

Para exemplificarlo, en el ensayo frente a la cepa testigo *E. coli* pON.mCherry, (Fig. 6A) las cepas: Z-CA-07-16, Z-B2-11, Z-B3-17, Z-VAL-06-15, Z-RM-08-21, Z-VAL14-04 y CU13 presentan mayor actividad en co-cultivo. Por el contrario, Z-VAL-14-11 muestra un claro cambio en el espectro de actividad, pasando de no presentar actividad antimicrobiana frente a esta cepa testigo en co-cultivo, a inhibir su crecimiento casi al 60% en el sobrenadante. Por su parte, Z-VAL-19-05 no muestra actividad en ningún caso lo que se corresponde con los resultados anteriores de la antibiosis en medio sólido.

Esta misma tendencia de actividad antimicrobiana se repite, casi en su totalidad, en el ensayo de inhibición frente a *S. aureus* GFP, (Fig.6B). A diferencia del ensayo anterior, en este caso se observó la inhibición que ejerce el sobrenadante de la cepa VIALT.

Por último, el ensayo de *P. aeruginosa* GFP presenta mucha variabilidad, (Tabla A8, anexos), dando resultados por sobrenadante similares a los de Co-cultivo, (Fig. 6C). Como excepción encontramos Z-VAL-14-04 que inhibe en co-cultivo y CU13 y VIALT por sobrenadantes. Por lo que respecta a *M. smegmatis* GFP la variabilidad biológica y la baja intensidad de fluorescencia de la cepa testigo llevó a resultados no concluyentes, Tabla A9 (anexos).

La diferencia de fenotipo de las cepas en co-cultivo y por adición de sobrenadante llevó a concluir que, para evitar la pérdida de información sobre el espectro de actividad, en la plataforma de cribado se llevarían a cabo tanto el ensayo de co-cultivo a 0 semanas de incubación como el ensayo de inhibición por sobrenadantes.

4.6. Validación de la plataforma de screening con 10 cepas nuevas

Basándonos en las conclusiones obtenidas del apartado anterior, las condiciones elegidas para validar la plataforma son el ensayo de **co-cultivo con 0 semanas de incubación y por sobrenadante**, ambos en medio **LB 1/5** para las cepas testigo *E. coli* pON.mCherry, *S. aureus* GFP, *P. aeruginosa* GFP con medidas a 0 y 24 h. Y para *M. smegmatis* GFP **LB 1/5 +7H9**, tomando medidas a 0 y 48 h.

Con estas condiciones se prueban 10 cepas, almacenadas en el biobanco y no caracterizadas previamente (Tabla 2), para conocer su espectro de actividad. Los valores de fluorescencia obtenidos en co-cultivo a 0 semanas y por sobrenadante obtenidos con estas cepas se encuentran para *E. coli* pON.mCherry, *S. aureus* GFP, *P. aeruginosa* GFP y *M. smegmatis* GFP en las Tablas A10- A13 (anexo), respectivamente.

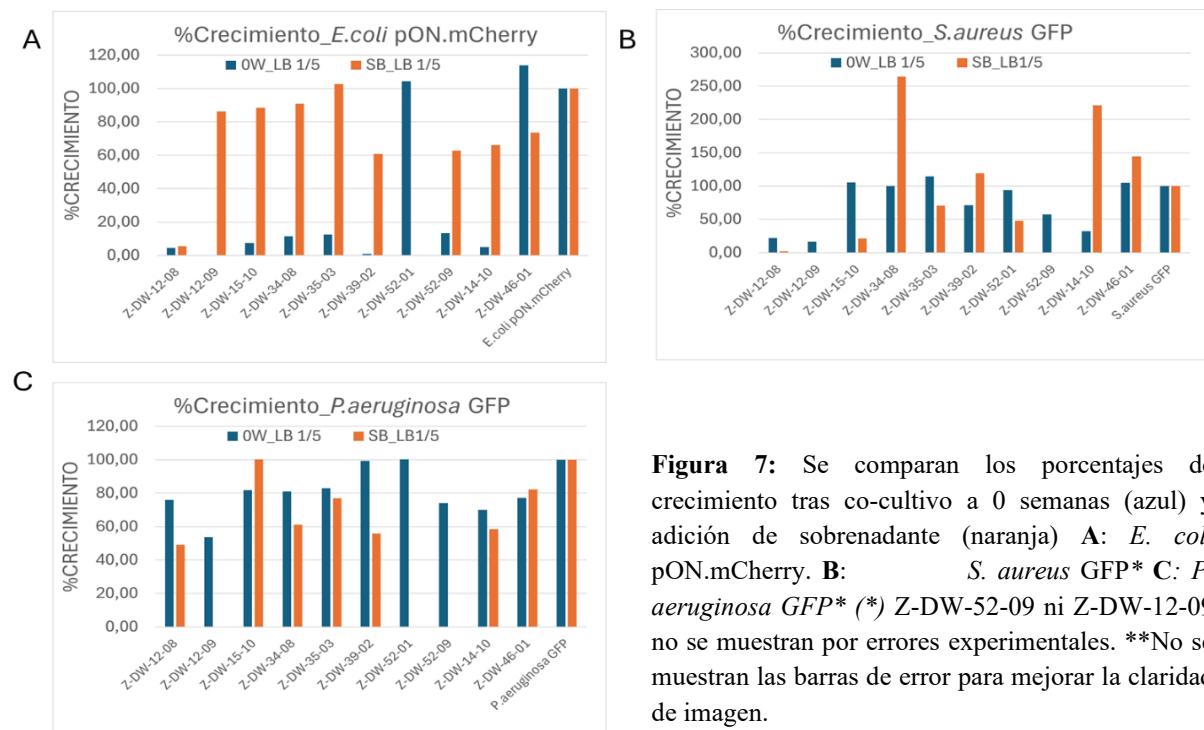


Figura 7: Se comparan los porcentajes de crecimiento tras co-cultivo a 0 semanas (azul) y adición de sobrenadante (naranja) **A:** *E. coli* pON.mCherry. **B:** *S. aureus* GFP* **C:** *P. aeruginosa* GFP* (*) Z-DW-52-09 ni Z-DW-12-09 no se muestran por errores experimentales. **No se muestran las barras de error para mejorar la claridad de imagen.

Los resultados obtenidos muestran algunas cepas con actividad antimicrobiana prometedora. Por ejemplo, **Z-DW-12-08** inhibe tanto en co-cultivo como con sobrenadantes frente a las testigos *E. coli* pON.mCherry (Fig. 7A) y *S. aureus* GFP (Fig. 7B). **Z-DW-12-09** y **Z-DW-14-10**, por su parte, inhiben casi con totalidad a *E. coli* pON.mCherry en co-cultivo y también son activas frente *S. aureus* GFP.

El sobrenadante de **Z-DW-15-10** es activo frente a *S. aureus* GFP mientras que en co-cultivo no muestra ningún indicio de inhibición frente a esta cepa testigo. Por el contrario, solo es activa frente a *E. coli* pON.mCherry cuando se encuentra en co-cultivo, la acción del sobrenadante no influye en esta cepa testigo. Los resultados de **Z-DW-52-01** también resultan relevantes. Aunque en co-cultivo no muestre inhibición, frente a las testigos probadas, en el ensayo con sobrenadante inhibe al 100% a *E. coli* pON.mCherry y *P. aeruginosa* GFP (Fig. 7C) y reduce el crecimiento de *S. aureus* GFP.

Otras cepas como **Z-DW-38-08, Z-DW-35-03, Z-DW-39-02 y Z-DW-52-09** solo muestran actividad antimicrobiana en co-cultivo frente a *E. coli* pON.mCherry. **Z-DW-46-01** no muestra ningún tipo de actividad antimicrobiana frente a las cepas testigo ensayadas.

Cabe comentar que no se consideran los resultados del co-cultivo 0w y en los resultados obtenidos por sobrenadantes con *M. smegmatis* GFP, ya que los controles de las cepas ambientales se igualaban o superaban la fluorescencia del testigo, dejando una pequeña o nula ventana de análisis de los resultados de inhibición. Los valores de fluorescencia se encuentran en la Tabla A13 (anexo).

5. DISCUSIÓN

Después de la obtención de los resultados de todas las condiciones de cultivo se puede concluir varios aspectos. En primer lugar, se ha demostrado que los datos obtenidos con el fluoróforo rojo son más ventajosos que los del fluoróforo verde debido a que las bacterias ambientales, así como los propios medios de cultivo, no emiten tanta fluorescencia basal y permitiría llevar a cabo el experimento en BHI.

Sin embargo, como el objetivo principal es la optimización de una plataforma de cribado, en la que se testan varias cepas testigo, se eligió el **medio LB 1/5** como medio común en el que se consiguen buenos resultados en todas ellas. Otra alternativa sería construir cepas testigo, representantes de cada tipo bacteriano, con un plásmido que emitiese fluorescencia en el espectro rojo.

Por otro lado, se esperaba que el desarrollo del ensayo en medio LB 1/5 como medio pobre de nutrientes activaría clusters de biosíntesis de compuestos antimicrobianos. Sin embargo, se observó, en los resultados del fluoróforo rojo, que la tendencia del espectro de actividad en BHI y LB 1/5 era la misma, por lo que se concluye que, para estas cepas ambientales seleccionadas, el medio de cultivo pobre no sobre activa su producción de metabolitos antimicrobianos.

Otro de los aspectos a comentar, es la elevada fluorescencia que alcanzan las cepas ambientales tras 1 semana de incubación, que enmascara los resultados de la inhibición. Además, de que los resultados obtenidos en los ensayos de co-cultivo a 0 semanas y los obtenidos por adición de sobrenadante son complementarios. La información que se obtiene es diferente, por lo que no se puede descartar ninguno de los ensayos en la plataforma.

Así mismo, cabe destacar la variabilidad presentada por la cepa testigo *P. aeruginosa* GFP, dando unos resultados poco representativos con mucha desviación estándar. Por lo que, para optimizar mejor la plataforma, se debería elegir una cepa con resultados más reproducibles. También se debería buscar otra cepa de micobacterias hospedadora diferente a la utilizada en la cepa de *M. smegmatis* GFP construida. De esta forma, se aumentaría la señal de fluorescencia y se obtendría una ventana de análisis de resultados más amplia. Otra alternativa sería dejar transcurrir el ensayo de inhibición durante 72h y observar si la señal de fluorescencia da una ventana más amplia de análisis. En este trabajo no se probó por la posibilidad de que las cepas ambientales crecieran demasiado y se enmascararan los resultados.

A pesar de la variabilidad, los resultados obtenidos por la plataforma coinciden con los obtenidos en la antibiosis en medio sólido, lo que valida la plataforma. Como ejemplo, Z-VAL-19-05 que inicialmente fue seleccionada como control negativo, se correspondió con la no inhibición en el co-cultivo ni por sobrenadantes, de ninguna de las cepas testigo. Z/UZ-B2-11 que presentaba actividad frente a las Gram negativas y Gram positivas, confirma su espectro inhibiendo a *E. coli* pON.mCherry y *S. aureus* GFP en co-cultivo.

En general, basándonos en la media entre los porcentajes de crecimiento del ensayo con sobrenadantes con los del co-cultivo podríamos decir que *E. coli* pON.mCherry, *S. aureus* GFP y *M. smegmatis* GFP, se inhiben más en co-cultivo, mientras que en *P. aeruginosa* GFP por sobrenadantes. (Fig.A4, anexo)

Y si se comparan los porcentajes de crecimiento entre las cepas testigo se observa que las cepas ambientales son en general más activas frente a *E. coli* pON.mCherry que frente a *P. aeruginosa* GFP, *S. aureus* GFP o *M. smegmatis* GFP. (Fig.A4, anexo)

Cabe comentar que la cepa testigo *E. coli* utilizada se caracteriza por ser hiperpermeable (Cox *et al.*, 2017); esto se traduce en una mayor facilidad para que las sustancias antimicrobianas atraviesen la membrana plasmática e inhiban a dicha cepa. Además de tener un sistema de eflujo que impide la expulsión de compuestos. Resulta de interés porque acentúa la posible inhibición, amplificando el efecto de los compuestos y facilitando así su identificación.

Este TFG ha contribuido al desarrollo y validación de una plataforma robusta para el cribado de nuevas sustancias antimicrobianas, identificando cepas ambientales muy prometedoras para análisis posteriores como Z-DW-12-08, Z-DW-12-09, Z-DW-14-10, Z-DW-15-10 y Z-DW-52-01 entre otras. Este trabajo se une al esfuerzo previo de numerosos proyectos como el de Micro Mundo. El desarrollo y la mejora continua de estas metodologías son esenciales en la lucha contra el creciente problema de la resistencia antimicrobiana, proporcionando una herramienta valiosa para el descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas.

6. CONCLUSIONES

1. El fluoróforo que emite en el espectro rojo resulta más ventajoso para el desarrollo de una plataforma de cribado, basada en fluorescencia como esta.
2. El medio de cultivo LB $\frac{1}{5}$ emite menor fluorescencia *per se* que BHI, lo que da una ventana más amplia en el análisis de resultados.
3. El co-cultivo a 0 semanas de incubación resulta óptimo para el desarrollo de la plataforma, ya que las cepas ambientales tienen menos fluorescencia basal que a 1 semana de incubación y su baja concentración (ufc/ml) en el ensayo no enmascara los resultados por competición bacteriana.
4. El ensayo de inhibición en medio de cultivo LB $\frac{1}{5}$ muestra un espectro de actividad similar al BHI, por lo que este medio mínimo de nutrientes no muestra activación de clusters de genes de biosíntesis de metabolitos antimicrobianos en las cepas ambientales seleccionadas.
5. Los resultados obtenidos en el ensayo por co-cultivo y por adición de sobrenadantes aportan información complementaria, siendo ambos ensayos relevantes en la plataforma.
6. Para optimizar la plataforma, las cepas testigo fluorescentes deberían presentar un fenotipo reproducible, sin variabilidad, y con una intensidad de fluorescencia superior a las cepas ambientales testadas.
7. Cepas como Z-DW-12-08, Z-DW-12-09, Z-DW-14-10 y Z-DW-15-10, entre otras, resultan prometedoras en la síntesis de sustancias antimicrobianas, por lo que serían susceptibles de análisis posteriores.

CONCLUSIONS

1. The fluorophore emitting in the red spectrum is more advantageous for the development of such a fluorescence-based screening platform.
2. LB $\frac{1}{5}$ culture medium emits less fluorescence *per se* than BHI, which gives a wider window in the analysis of results.

3. Co-culture at 0 weeks incubation is more optimal for platform development, as the environmental strains have less basal fluorescence than at 1 week incubation and their low concentration (cfu/ml) does not mask the results by bacterial competition.
4. The inhibition assay on LB 1/5 culture medium shows a spectrum of activity similar to BHI, whereby this minimal nutrient medium does not show activation of antimicrobial metabolite biosynthesis gene clusters in the selected environmental strains.
5. The results obtained in the co-culture assay and the supernatant addition assay give complementary information, both assays being important in the platform.
6. To optimise the platform, the fluorescent control strains should have a reproducible phenotype, without variability, and with a higher fluorescence intensity than the environmental strains tested.
7. Strains such as Z-DW-12-08, Z-DW-12-09, Z-DW-14-10 and Z-DW-15-10, among others, show promise in the synthesis of antimicrobial substances and would therefore be amenable to further analysis

7. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A. *et al.* (2024) 'Antibiotic resistance: A key microbial survival mechanism that threatens public health', *Cell Host and Microbe*. Cell Press, pp. 837–851. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.05.015>.

Alvarado, M. *et al.* (2020) 'MicroMundo Upside Down: Targeted Searching for Antibiotics-Producing Bacteria From Soil With Reverse Antibiosis Approaches', *Frontiers in Microbiology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.577550>.

Astarie-Dequeker, C. *et al.* (2009) 'Phthiocerol Dimycocerosates of *M. tuberculosis* Participate in Macrophage Invasion by Inducing Changes in the Organization of Plasma Membrane Lipids', *PLoS Pathogens*, 5(2), p. 1000289. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000289>.

Atanasov, A.G. *et al.* (2021) 'Natural products in drug discovery: advances and opportunities', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Research, pp. 200–216. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.

Batantou Mabandza, D. *et al.* (2024) 'Do Microorganisms in Bathing Water in Guadeloupe (French West Indies) Have Resistance Genes?', *Antibiotics*, 13(1). Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010087>.

Chaudhary, D.K., Khulan, A. and Kim, J. (2019) 'Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria', *Scientific Reports*, 9(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43182-x>.

Choi, K.H. and Schweizer, H.P. (2006) 'mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: Example *Pseudomonas aeruginosa*', *Nature Protocols*, 1(1), pp. 153–161. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.24>.

Cox, G. *et al.* (2017) 'A Common Platform for Antibiotic Dereplication and Adjuvant Discovery', *Cell Chemical Biology*, 24(1), pp. 98–109. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.11.011>.

Davies, J. (1996) 'Origins and evolution of antibiotic resistance.', *Microbiología (Madrid, Spain)*, pp. 9–16. Available at: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10>.

De Groot, P.W.J. *et al.* (2020) 'Optimizing Small World Initiative service learning by focusing on antibiotics-producing actinomycetes from soil', *FEMS Microbiology Letters*, 366(24). Available at: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa019>.

Domínguez A. (2020) *Caracterización de microorganismos productores de antibióticos aislados en el proyecto micromundo-uz.* TFG. Universidad de Zaragoza. Available at: <https://zaguan.unizar.es/record/98160> (Accessed: 21 May 2025).

Durand, G.A., Raoult, D. and Dubourg, G. (2019) 'Antibiotic discovery: history, methods and perspectives', *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V., pp. 371–382. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>.

Espina, L. (2020) 'An approach to increase the success rate of cultivation of soil bacteria based on fluorescence-activated cell sorting', *PLoS ONE*, 15(8 August). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237748>.

Farha, M.A. and Brown, E.D. (2019) 'Drug repurposing for antimicrobial discovery', *Nature Microbiology*, 4(4), pp. 565–577. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0357-1>.

Garbe, T.R. *et al.* (1994) 'Transformation of mycobacterial species using hygromycin resistance as selectable marker', *Microbiology*, 140(1), pp. 133–138. Available at: <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-133>.

Gebhardt, M.J., Jacobson, R.K. and Shuman, H.A. (2017) 'Seeing red; the development of pON. mCherry, a broad-host range constitutive expression plasmid for Gram-negative bacteria', *PLoS ONE*, 12(3). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173116>.

Genilloud, O. (2019) 'Natural products discovery and potential for new antibiotics', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 81–87. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.012>.

Gilmore, M.S. *et al.* (2020) 'Genes Contributing to the Unique Biology and Intrinsic Antibiotic Resistance of *Enterococcus faecalis*', *mBio*, 11(6), pp. 10.1128/mbio.02962-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/mbio.02962-20>.

Gil-Serna, J. *et al.* (2025a) 'Citizen Science to Raise Antimicrobial Resistance Awareness in the Community: The MicroMundo Project in Spain and Portugal', *Microbial biotechnology*, p. e70123. Available at: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70123>.

Gómara-Lomero, M. *et al.* (2023a) 'In vitro synergy screens of FDA-approved drugs reveal novel zidovudine- and azithromycin-based combinations with last-line antibiotics against *Klebsiella pneumoniae*', *Scientific Reports*, 13(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-396479>

Gude, M.J. *et al.* (2013) 'Molecular epidemiology, resistance profiles and clinical features in clinical plasmid-mediated AmpC-producing Enterobacteriaceae', *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8), pp. 553–557. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2013.07.007>.

Huemer, M. *et al.* (2020) 'Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives', *EMBO reports*, 21(12). Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>.

Hughes, D. and Karlén, A. (2014) 'Discovery and preclinical development of new antibiotics', *Upsala Journal of Medical Sciences*. Informa Healthcare, pp. 162–169. Available at: <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.896437>.

Katz, L. and Baltz, R.H. (2016) 'Natural product discovery: past, present, and future', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag, pp. 155–176. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>.

Krzyżek, P. (2024) 'Helicobacter pylori Efflux Pumps: A Double-Edged Sword in Antibiotic Resistance and Biofilm Formation', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms25221222>.

Lafuente, I. *et al.* (2024) 'Production of Pumilarin and a Novel Circular Bacteriocin, Altitudin A, by *Bacillus altitudinis* ECC22, a Soil-Derived Bacteriocin Producer', *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms25042020>.

Mihalcescu, I., Van-Melle Gateau, M., Chelli, B., Pinel, C., & Ravanat, J. L. (2015). Green autofluorescence, a double edged monitoring tool for bacterial growth and activity in micro-plates. *Physical Biology*, 12(6). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/12/6/066016>

Munita, J.M. and Arias, C.A. (2016) 'Mechanisms of Antibiotic Resistance', *Microbiology Spectrum*. Edited by I.T. Kudva and Q. Zhang, 4(2). Available at: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.

Naghavi, M. *et al.* (2024) 'Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050', *The Lancet*, 404(10459), pp. 1199–1226. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1).

Nichols, D. *et al.* (2010) 'Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable microbial species" ', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), pp. 2445–2450. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.01754-09>.

Organización mundial de la salud (no date) *Resistencia a los antimicrobianos*, *Organización mundial de la salud*(s.f.). Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (Accessed: 8 June 2025).

Pino-Hurtado, M.S. *et al.* (2024) 'Searching for Antimicrobial-Producing Bacteria from Soils through an Educational Project and Their Evaluation as Potential Biocontrol Agents', *Antibiotics*, 13(1). Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010029>.

PRAN. (s.f.). (2015) *Sobre la resistencia. Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos*. Available at: <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/sobre-la-resistencia> (Accessed: 4/06/25).

Rutledge, P.J. and Challis, G.L. (2015) 'Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 509–523. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3496>.

Turner, A.B. *et al.* (2024) 'Biofilm morphology and antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on poly-D,L-lactide-co-poly(ethylene glycol) (PDLLA-PEG) coated titanium', *Biofilm*, 8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2024.100228>.

Walsh, C.T. and Wencewicz, T.A. (2014) 'Prospects for new antibiotics: A molecule-centered perspective', *Journal of Antibiotics*, pp. 7–22. Available at: <https://doi.org/10.1038/ja.2013.49>.

ANEXO

Tabla A1: Espectro de acción de las bacterias ambientales. Las columnas **O** corresponden al espectro de actividad previo mientras que **ATB** a los resultados de antibiosis. Los + indican la existencia de halo de inhibición, los – la ausencia de este y los NE de No Ensayado. Las cepas marcadas en naranja fueron las seleccionadas.

	GRAM +								Micobacterias		GRAM -																							
	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Lmonocytogenes</i>		<i>Micrococcus luteus</i>		<i>S.aureus</i>		<i>Mycobacterium smegmatis</i>		<i>E.Coli (XL1)</i>		<i>E.Coli (Sahai)</i>		<i>E.Coli (perro)</i>		<i>E.Coli (conejo)</i>		<i>Salmonella</i>		<i>E. faecalis</i>													
ID	O	ATB	O	ATB	O	ATB	O	ATB	O	ATB	O	ATB	O	ATB	O	ATB	O	ATB	O	ATB	O	ATB												
	BHI	BHI	LB	BHI	BHI	LB	BHI	BHI	LB	BHI	BHI	LB	BHI	7H10	LB	BHI	BHI	LB	BHI	BHI	LB	BHI	BHI											
Z/CA-07-16	+	+	+	-	+	-	NE	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	NE	+	-	NE	+	+	+	+	-	-	-	-	-			
Z/SAL-06-12	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-			
Z/UZ-B2-11	+	+	+	NE	+	+	NE	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	NE	+	+	NE	-	+	-	+	+	+	+		
Z/UZ-B3-17	+	+	-	+	+	-	NE	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-			
Z/VAL-01-03	+	+	-	-	-	-	NE	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Z/VAL-01-24	+	+	+	-	-	-	NE	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
Z/VAL-02-25	+	+	+	-	-	-	NE	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	NE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z/VAL-03-8	+	+	+	-	-	-	NE	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Z/VAL-06-15	+	+	+	+	+	-	NE	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Z/VAL-16-15	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Z/VAL-19-05	+	+	-	-	-	-	NE	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Z/VAL-14-11	+	-	+	-	-	-	NE	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z/RM-08-21	+	+	+	NE	+	-	NE	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	NE	-	+	NE	+	+	NE	+	-	NE	-	+	NE	-	-	
Z/VAL-14-04	-	+	+	-	+	-	NE	+	+	NE	-	-	+	-	-	-	NE	+	+	NE	-	-	NE	-	+	NE	-	-	NE	-	-	NE	-	

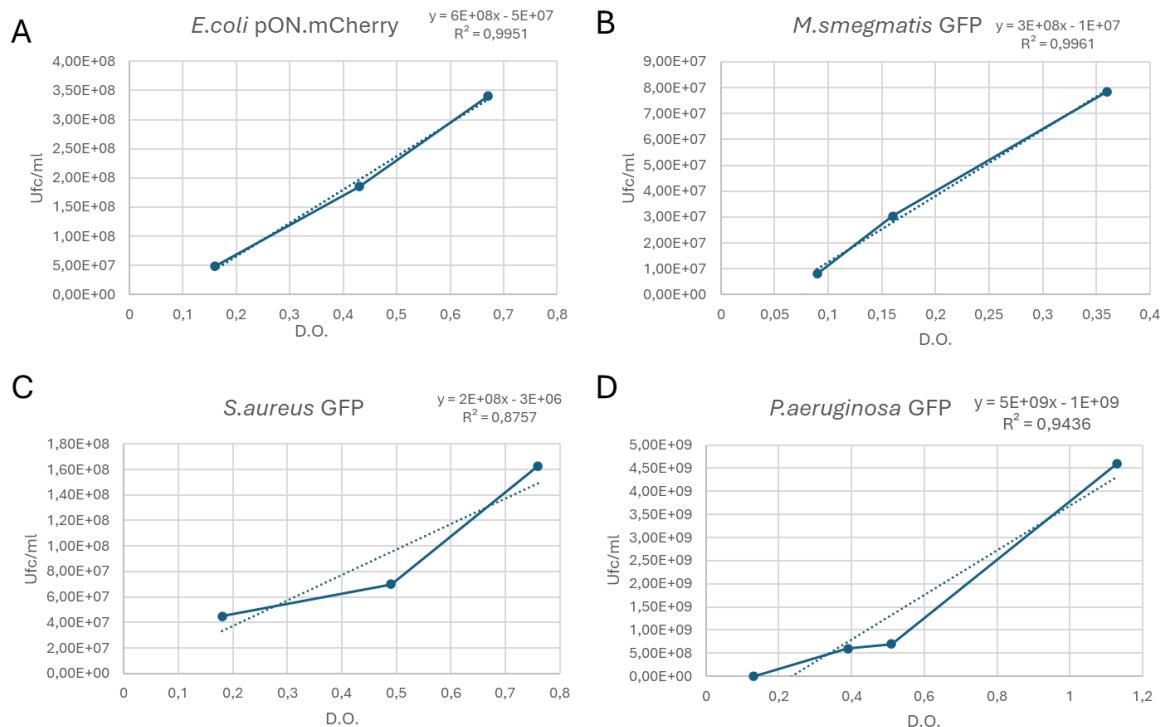


Figura A1: Representación gráfica de (ufc/ml) frente a la densidad óptica (D.O.) de las cepas testigo fluorescentes. **A.** *E. coli* pON.mCherry **B.** *M. smegmatis* GFP **C.** *S. aureus* GFP. **D.** *P. aeruginosa* GFP.

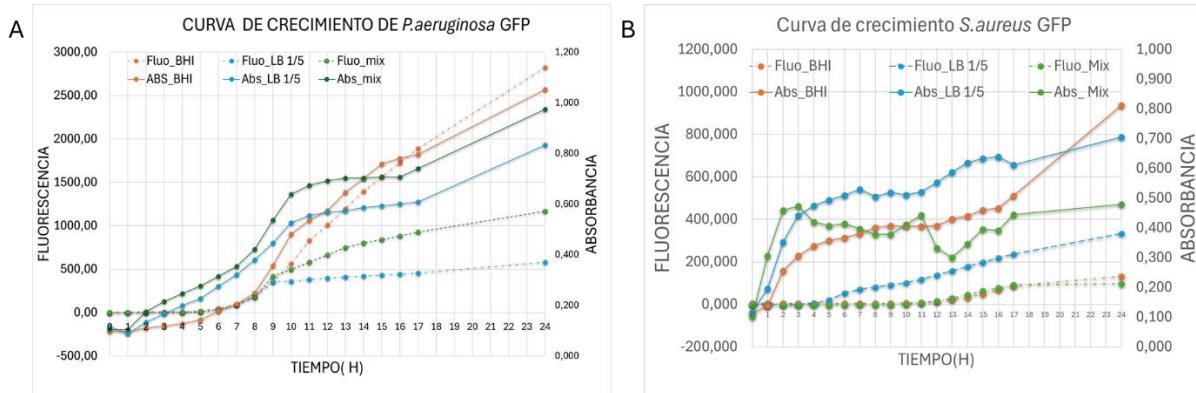


Figura A2: Curva de crecimiento en medios BHI (naranja), LB 1/5 (azul) y MIX (verde) a 37 °C. Se representan las fluorescencias en líneas discontinuas y las absorbancias con líneas continuas. **A** *P. aeruginosa* GFP; **B**: *S. aureus* GFP

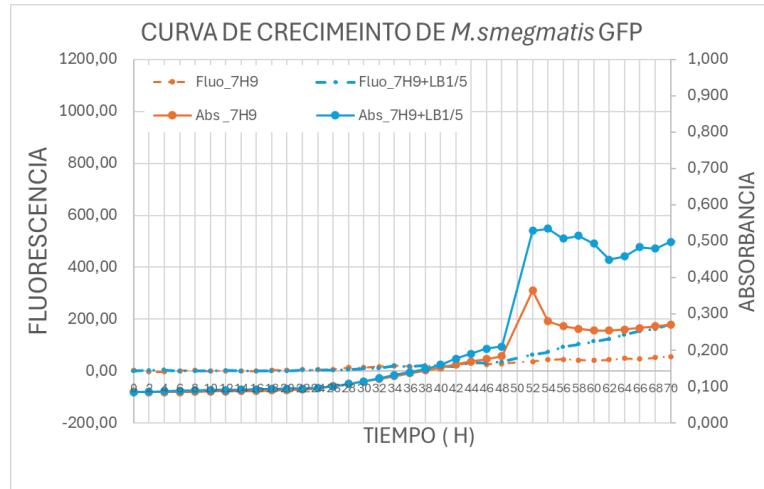


Figura A3: Curva de crecimiento *M. smegmatis* GFP en medios 7H9 (naranja), LB 1/5+7H9 (azul) a 37°C. Se representan las fluorescencias en líneas discontinuas y las absorbancias con líneas continuas

Tabla A2: Datos de fluorescencia a 0 y 24 h de *E. coli* pON.mCherry (fluoróforo en el espectro rojo) del ensayo de co-cultivo a 0 semanas (0w) y 1 semana (1w) de incubación de las cepas ambientales, con los medios de cultivo LB 1/5 y BHI. Se reflejan las medias de los datos del cultivo con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo.

MEDIO	CO-CULTIVO	<i>E.coli</i> pON.mCherry					
		0w		1w			
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h
LB 1/5	LB 1/5	2	168,5±3,54	133±2	1	27±0	34±0
	<i>E.coli</i> pON.mCherry	3	171,33±3,21	287±72,55	2	27±1,41	342,5±99,7
	Z/CA-07-16	4	156±2,58	137±6,06	4	31,5±2,38	36,25±4,43
	Z/UZ-B2-11	4	156,5±1,73	151,75±13,2	4	34±3,65	42,25±2,75
	Z/UZ-B3-17	4	155,75±2,22	181,5±30,38	4	32,75±4,5	49±9,42
	Z/VAL-06-15	4	156±2,16	163,25±6,29	4	31±4,08	32,5±1,29
	Z/VAL-16-15	4	154,75±1,26	145,75±8,92	4	33,25±0,96	41±4,9
	Z/VAL-19-05	4	157,25±2,5	236,5±100,45	4	32,25±2,06	319±9,49
	Z/VAL-14-11	3	160,66±4,73	265±67,85	4	33,5±3,51	50,5±8,7
	Z/RM-08-21	3	158,66±1,53	152,6±16,07	4	32,5±4,12	42,5±3,32
	Z/VAL-14-04	3	159±2	165±23,52	4	32,5±3,7	48,75±13
	CU13	2	160±2,83	212±66,47	2	33±1,41	39,5±0,71
	Vial -T	2	161,5±0,71	330±7,07	2	31,5±0,71	37±0
BHI	BHI	3	225,33±5,51	229,5±4,95	1	131,00	156,00
	<i>E.coli</i> pON.mCherry	3	222,33±9,81	1037,66±188,69	2	144±2,83	697,5±161,93
	Z/CA-07-16	4	276,75±12,04	435±83,55	4	161,25±2,75	169,25±4,79
	Z/UZ-B2-11	4	294,25±4,5	323,5±3,7	4	159,25±2,63	169±3,74
	Z/UZ-B3-17	4	293,75±3,77	449±171,54	4	158±6,78	169,5±4,12
	Z/VAL-06-15	4	295,25±6,24	395,25±90,26	4	161,75±6,29	173,25±2,75
	Z/VAL-16-15	4	294±2,94	375,5±9,81	4	152,5±6,14	166,25±5,32
	Z/VAL-19-05	4	290±3,92	769,5±43,67	4	154,5±3,11	677,75±155,44
	Z/VAL-14-11	4	294±6,53	629,5±238,39	4	153,5±4,2	165,75±7,18
	Z/RM-08-21	4	296,25±3,77	392,75±114,87	4	154,5±7,33	170±6,06
	Z/VAL-14-04	4	292,75±3,86	484,25±191,25	4	161,75±5,06	172,75±3,3
	CU13	4	290,25±2,06	375,5±13,38	2	160±1,41	159,5±3,54
	Vial -T	-	-	-	2	154,5±2,12	171,5±0,71

Tabla A3: Datos de fluorescencia a 0 y 24 h de *S. aureus* GFP (fluoróforo en el espectro verde) del ensayo de co-cultivo a 0 semanas (0w) y 1 semana (1w) de incubación de las cepas ambientales, con los medios de cultivo LB 1/5 y BHI. Se reflejan las medias de los datos del cultivo con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo.

Medio	CO-CULTIVO	<i>S. aureus</i> GFP					
		0w			1w		
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h
LB 1/5	LB 1/5	1	59±0	52±0	1	77±0	79±0
	<i>S. aureus</i> GFP	2	59,5±0,71	500,5±501,34	2	80,5±2,12	359±79
	Z/CA-07-16	4	58,25±2,5	390±58	4	99±3,46	96,5±4,73
	Z/UZ-B2-11	4	59,25±1,71	177,25±139	4	98,75±2,46	97±2,58
	Z/UZ-B3-17	4	60±1,15	316±59	4	98±2,71	110,75±12,84
	Z/VAL-06-15	4	59,5±0,58	376±241	4	100,5±3,7	111±4,55
	Z/VAL-16-15	4	59,5±0,58	70,25±65	4	96,5±3,51	104,25±5,12
	Z/VAL-19-05	4	58,5±1,29	395,75±55	4	101,25±3,5	109,5±3,87
	Z/VAL-14-11	3	59,33±0,58	368,66±62	4	103±2,16	127,5±4,36
	Z/RM-08-21	3	59,66±0,58	188±58	4	93,25±1,89	91±4,16
	Z/VAL-14-04	3	60,33±1,53	298,33±578	4	100,75±4,43	124±1,41
	CU13	2	61,5±0,71	105,5±70	2	112±1,41	155±2,83
	Vial -T	2	58±0,71	440±58	2	99±0	148,5±0,71
BHI	BHI	2	385±15,5	374,5±13,43	2	472±12,72	479,5±20,5
	<i>S. aureus</i> GFP	2	389±0	561,5±36,06	2	538±4,24	551±7,07
	Z/CA-07-16	4	633,5±10,54	581,66 ±6,66	4	894±35,52	888,75±40,48
	Z/UZ-B2-11	4	662,25±13,05	626,25±11,56	4	920,5±42,34	893,25±27,4
	Z/UZ-B3-17	4	666,25±5,44	715,5±6,56	4	962±37,07	919±19,8
	Z/VAL-06-15	4	674±11,11	633,25±14,01	4	945±43	934,5±25,69
	Z/VAL-16-15	4	651,5±22,55	671±22,5	4	911,25±63,15	894,25±34,51
	Z/VAL-19-05	4	647,75±30,74	625,5±15,26	4	641,25±25,18	663,25±37,16
	Z/VAL-14-11	4	672±9,83	746±7,62	4	1296,5±60,08	1349±43,53
	Z/RM-08-21	4	665,25±8,14	691,5±20,57	4	901,75±38,31	875,5±7,23
	Z/VAL-14-04	4	650,75±9,36	748,5±91,4	4	1475±130,65	1532,5±77,04
	CU13	3	675±7,94	610,666±7,647	4	827,25±36,89	1092±14,07
	Vial -T	-	-	-	4	638,75±47,2	657,5±46,19

Tabla A4: Datos de fluorescencia a 0 y 24 h de *P. aeruginosa* GFP (fluoróforo en el espectro verde) del ensayo de co-cultivo a 0 semanas (0w) y 1 semana (1w) de incubación de las cepas ambientales, con los medios de cultivo LB 1/5 y BHI. Se reflejan las medias de los datos del cultivo con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo.

<i>P.aeruginosa</i> GFP						
Medio	CONTROL	0w			1w	
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	n	Tiempo =0 h
LB 1/5	LB 1/5	1	59±0	52±0	1	77
	<i>P.aeruginosa</i> GFP	2	58,5±0,71	723±554,37	2	78±2,83
	Z/CA-07-16	1	58	58	1	100
	Z/UZ-B2-11	1	61	139	1	100
	Z/UZ-B3-17	1	62	59	1	95
	Z/VAL-06-15	1	62	241	1	101
	Z/VAL-16-15	4	63	65	1	94
	Z/VAL-19-05	1	63	55	1	97
	Z/VAL-14-11	1	63	62	1	107
	Z/RM-08-21	1	63	58	1	97
	Z/VAL-14-04	1	61	578	1	100
	CU13	1	60	70	1	111
	Vial -T	1	65	58	1	107
LB 1/5	Co-cultivo	0w			1w	
	LB 1/5	1	59±0	52±0	1	77
	<i>P.aeruginosa</i> GFP	2	58,5±0,71	723±554,37	2	78±2,83
	Z/CA-07-16	4	59±0,82	666±422,5	4	99,25±2,99
	Z/UZ-B2-11	4	60±0,82	785,75±275,36	4	99±2,94
	Z/UZ-B3-17	4	59,25±0,96	538,5±296,61	4	96±4,08
	Z/VAL-06-15	4	59,5±0,58	801,75±326,07	4	102±1,41
	Z/VAL-16-15	4	58,75±0,96	643±310,94	4	94±1,41
	Z/VAL-19-05	4	59±0,82	770±276,59	4	102,75±2,63
	Z/VAL-14-11	3	58,66±1,15	842,66±186,47	4	103±2,58
	Z/RM-08-21	3	58,66±0,58	687,66±270,15	4	91,75±2,87
	Z/VAL-14-04	3	58,33±0,58	626,33±431,24	4	102,25±1,71
	CU13	2	57±1,41	696±511,95	2	105±2,83
	Vial -T	2	58±1,41	947,5±849,24	2	101±1,41
BHI	CONTROL	0w			1w	
	LB 1/5	1	59±0	52±0	1	77
	<i>P.aeruginosa</i> GFP	2	58,5±0,71	723±554,37	2	78±2,83
	Z/CA-07-16	4	59±0,82	666±422,5	4	99,25±2,99
	Z/UZ-B2-11	4	60±0,82	785,75±275,36	4	99±2,94
	Z/UZ-B3-17	4	59,25±0,96	538,5±296,61	4	96±4,08
	Z/VAL-06-15	4	59,5±0,58	801,75±326,07	4	102±1,41
	Z/VAL-16-15	4	58,75±0,96	643±310,94	4	94±1,41
	Z/VAL-19-05	4	59±0,82	770±276,59	4	102,75±2,63
	Z/VAL-14-11	3	58,66±1,15	842,66±186,47	4	103±2,58
	Z/RM-08-21	3	58,66±0,58	687,66±270,15	4	91,75±2,87
	Z/VAL-14-04	3	58,33±0,58	626,33±431,24	4	102,25±1,71
	CU13	2	57±1,41	696±511,95	2	105±2,83
	Vial -T	2	58±1,41	947,5±849,24	2	101±1,41
BHI	Co-cultivo	0w			1w	
	BHI	2	385±15,56	374,5±13,43	2	472±12,73
	<i>P.aeruginosa</i> GFP	2	397±16,97	5566,5±5398,76	2	519,5±6,36
	Z/CA-07-16	1	342,00	391,00	1	925,00
	Z/UZ-B2-11	1	359,00	364,00	1	908,00
	Z/UZ-B3-17	1	387,00	360,00	1	950,00
	Z/VAL-06-15	1	397,00	440,00	1	922,00
	Z/VAL-16-15	1	397,00	382,00	1	914,00
	Z/VAL-19-05	1	390,00	387,00	1	646,00
	Z/VAL-14-11	1	408,00	452,00	1	1351,00
	Z/RM-08-21	1	407,00	379,00	1	963,00
	Z/VAL-14-04	1	394,00	548,00	1	1250,00
	CU13	1	402,00	410,00	1	731,00
	Vial -T	-	-	-	-	-

Tabla A5: Datos de fluorescencia a 0 y 48 h de *M. smegmatis* GFP (fluoróforo en el espectro verde) del ensayo de co-cultivo a 0 semanas (0w) de incubación de las cepas ambientales, con los medios de cultivo LB 1/5+7H9. Se reflejan las medias de los datos del cultivo con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo.

M.smeqmati s GFP				
Medio	CONTROL	0w		
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =48 h
LB 1/5 +7H9	LB 1/5 +7H9	2	81	94,5
	<i>M.smeqmati s</i> GFP	2	75±4,93	116,5±7,81
	Z/CA-07-16	1	79	94
	Z/UZ-B2-11	1	69	116
	Z/UZ-B3-17	1	80	100
	Z/VAL-06-15	1	84	102
	Z/VAL-16-15	1	80	105
	Z/VAL-19-05	1	81	95
	Z/VAL-14-11	1	81	108
	Z/RM-08-21	1	81	93
	Z/VAL-14-04	1	67	121
	CU13	1	77	181
	Vial -T	1	77	86
Co-cultivo	0w			
	LB 1/5 +7H9	2	81	94,5
	<i>M.smeqmati s</i> GFP	2	75±4,93	116,5±7,81
	Z/CA-07-16	4	76±5,29	99,5±8,74
	Z/UZ-B2-11	4	75,75±4,27	107,5±5,57
	Z/UZ-B3-17	4	71,25±3,2	114,25±15,44
	Z/VAL-06-15	4	77,25±4,65	113,75±9,60
	Z/VAL-16-15	4	70,75±2,2	99,25±5,38
	Z/VAL-19-05	4	74±3,46	167±15,46
	Z/VAL-14-11	4	79,5±6,24	118±5,48
	Z/RM-08-21	4	73±3,46	118,25±42,94
	Z/VAL-14-04	4	76,25±3,77	113±6,16
	CU13	2	71±0	350,5±239,71
	Vial -T	2	64±4,24	114,5±4,95

Tabla A6: Datos de fluorescencia a 0 y 24 h de *E.coli* pON.mCherry (fluoróforo en el espectro rojo) del ensayo con sobrenadantes, con los medios de cultivo LB 1/5 y BHI. Se reflejan las medias de los datos del cultivo y sus controles con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo.

E.coli pON.mCherry				
Medio	CONTROL	Sobrenadantes		
		n	Tiempo =0h	Tiempo =24h
LB 1/5	LB 1/5	1	24	23
	<i>E.coli</i> pON.mCherry	2	27,5±2,12	232±25,46
	Z/CA-07-16	1	32	31
	Z/UZ-B2-11	1	27	26
	Z/UZ-B3-17	1	37	41
	Z/VAL-06-15	1	33	24
	Z/VAL-16-15	1	26	38
	Z/VAL-19-05	1	35	38
	Z/VAL-14-11	1	26	28
	Z/RM-08-21	1	30	32
	Z/VAL-14-04	1	24	29
	CU13	1	33	36
	Vial -T	1	35	38
	Co-cultivo		Sobrenadantes	
	LB 1/5	1	24	23
	<i>E.coli</i> pON.mCherry	2	27,5±2,12	232±25,46
	Z/CA-07-16	4	32±4,55	188±25,13
	Z/UZ-B2-11	4	32,75±4,03	156,75±9,22
	Z/UZ-B3-17	4	31,5±3,42	158,25±12,92
	Z/VAL-06-15	4	32,5±4,2	162,5±8,35
	Z/VAL-16-15	4	29,5±4,04	148,75±13,6
	Z/VAL-19-05	4	33,75±4,57	234,25±23,56
	Z/VAL-14-11	4	31,5±3,87	119,5±16,05
	Z/RM-08-21	4	30,25±4,03	150,25±25,5
	Z/VAL-14-04	4	31,5±3,42	229±12,57
	CU13	2	31,5±0,71	189±67,88
	Vial -T	2	26,5±0,71	296±1,41
BHI	CONTROL		Sobrenadantes	
	BHI	2	274,5±2,12	289±1,41
	<i>E.coli</i> pON.mCherry	3	273,66±1,53	973±2,83
	Z/CA-07-16	1	271,00	280,00
	Z/UZ-B2-11	1	275,00	283,00
	Z/UZ-B3-17	1	282,00	288,00
	Z/VAL-06-15	1	271,00	279,00
	Z/VAL-16-15	1	283,00	296,00
	Z/VAL-19-05	1	282,00	296,00
	Z/VAL-14-11	1	289,00	297,00
	Z/RM-08-21	1	283,00	300,00
	Z/VAL-14-04	1	281,00	289,00
	CU13	1	275,00	293,00
	Vial -T	1	280	283
	Co-cultivo		Sobrenadantes	
	BHI	2	274,5±2,12	289±1,41
	<i>E.coli</i> pON.mCherry	3	273,66±1,53	973±2,83
	Z/CA-07-16	4	271,5±4,12	626,75±49,73
	Z/UZ-B2-11	4	277±4,69	687,5±76,29
	Z/UZ-B3-17	4	279,75±2,99	838±31,52
	Z/VAL-06-15	4	270±5,35	781,66±29,28
	Z/VAL-16-15	4	274,75±2,5	766±126,92
	Z/VAL-19-05	4	277,75±4,99	924,5±105,56
	Z/VAL-14-11	4	285±5,38	390,33±95,24
	Z/RM-08-21	4	277,66±3,3	862,25±81,48
	Z/VAL-14-04	4	280±6,22	757,25±62,25
	CU13	2	271,5±3,54	843±142,84
	Vial -T	2	274,5±4,95	830,5±109,6

Tabla A7: Datos de fluorescencia a 0 y 24 h de *S. aureus* GFP (fluoróforo en el espectro verde) del ensayo con sobrenadantes, con los medios de cultivo LB 1/5 y BHI. Se reflejan las medias de los datos del cultivo y sus controles con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo.

S.aureus GFP				
Medio	CONTROL	Sobrenadantes		
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h
LB 1/5	LB 1/5	1	60	57
	<i>S.aureus</i> GFP	2	59,5±0,71	826,5±437,7
	Z/CA-07-16	1	56	55
	Z/UZ-B2-11	1	59	57
	Z/UZ-B3-17	1	60	60
	Z/VAL-06-15	1	57	57
	Z/VAL-16-15	1	59	59
	Z/VAL-19-05	1	63	60
	Z/VAL-14-11	1	59	59
	Z/RM-08-21	1	58	56
	Z/VAL-14-04	1	58	58
	CU13	1	76	76
	Vial -T	1	74	72
	Sobrenadantes			
	Co-cultivo	n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h
		1	60	57
		2	59,5±0,71	826,5±437,7
		4	59,75±0,96	856±379,1
		4	61,5±0,58	552,66±16,74
		4	60,75±0,5	628,75±208,9
		4	58±0,82	557±13,08
		4	59,75±0,5	556,66±2,52
		4	62,5±0,58	838,75±171,9
		4	60,25±0,96	505±15,08
		4	59±0,82	539,75±9,64
		4	60,5±1,29	602±23,81
BHI	CU13	2	77±0	416,5±2,12
	Vial -T	2	73,5±0,71	298,5±33,23
	Sobrenadantes			
	CONTROL	n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h
		1	349	375
		2	339,5±2,12	668,5±82,73
		1	346,00	369,00
		1	345,00	365,00
		1	336,00	354,00
		1	336,00	358,00
		1	348,00	366,00
		1	347,00	370,00
		1	359,00	390,00
		1	344,00	365,00
		1	349,00	382,00
	CU13	1	350,00	381,00
	Vial -T	1	337	370
	Sobrenadantes			
	Co-cultivo	n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h
		1	349	375
		2	339,5±2,12	668,5±82,73
		4	342,75±2,5	500,25±54,96
		4	344,25±2,22	361,5±2,52
		4	332,75±3,4	521±4,16
		4	342,5±1	591±40,55
		4	342±1,41	586,75±56,71
		4	346,5±1,91	528±22,99
		4	350,25±0,96	380,25±4,57
		4	336,75±0,96	526,75±11,9
		4	352,75±0,5	549±25,47

Tabla A8: Datos de fluorescencia a 0 y 24 h de *P. aeruginosa* GFP (fluoróforo en el espectro verde) del ensayo con sobrenadantes, con los medios de cultivo LB 1/5 y BHI. Se reflejan las medias de los datos del cultivo y sus controles con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo.

		<i>P.aeruginosa</i> GFP		
Medio	CONTROL	Sobrenadantes		
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h
LB 1/5	LB 1/5	1	60	57
	<i>P.aeruginosa</i> GFP	2	59±1,41	516±2,83
	Z/CA-07-16	1	56	55
	Z/UZ-B2-11	1	59	57
	Z/UZ-B3-17	1	60	60
	Z/VAL-06-15	1	57	57
	Z/VAL-16-15	1	59	59
	Z/VAL-19-05	1	63	60
	Z/VAL-14-11	1	59	59
	Z/RM-08-21	1	58	56
	Z/VAL-14-04	1	58	58
	CU13	1	76	76
	Vial -T	1	74	72
	Co-cultivo		Sobrenadantes	
LB 1/5	LB 1/5	1	60	57
	<i>P.aeruginosa</i> GFP	2	59±1,41	516±2,83
	Z/CA-07-16	3	58,66±0,58	712,66±317,26
	Z/UZ-B2-11	4	60,5±1,29	535,5±7,59
	Z/UZ-B3-17	4	59±0,82	608,25±176,81
	Z/VAL-06-15	4	58±082	932,25±464,61
	Z/VAL-16-15	4	58,5±1	718,75±358,18
	Z/VAL-19-05	4	61±0,82	556±7,87
	Z/VAL-14-11	4	59,25±0,96	803,75±361,49
	Z/RM-08-21	4	57±0	714,25±371,87
	Z/VAL-14-04	4	58,75±1,26	764,25±367,9
	CU13	2	73,5±0,71	387±16,97
	Vial -T	2	58±0,71	328±1,41
	CONTROL		Sobrenadantes	
BHI	BHI	1	349	375
	<i>P.aeruginosa</i> GFP	2	336±1,41	1007±41,01
	Z/CA-07-16	1	346,00	369,00
	Z/UZ-B2-11	1	345,00	365,00
	Z/UZ-B3-17	1	336,00	354,00
	Z/VAL-06-15	1	336,00	358,00
	Z/VAL-16-15	1	348,00	366,00
	Z/VAL-19-05	1	347,00	370,00
	Z/VAL-14-11	1	359,00	390,00
	Z/RM-08-21	1	344,00	365,00
	Z/VAL-14-04	1	349,00	382,00
	CU13	1	350,00	381,00
	Vial -T	1	337	370
	Co-cultivo		Sobrenadantes	
BHI	BHI	1	349	375
	<i>P.aeruginosa</i> GFP	2	336±1,41	1007±41,01
	Z/CA-07-16	4	337±6,93	1141,66±5,51
	Z/UZ-B2-11	4	340,5±3	1121,5±14,48
	Z/UZ-B3-17	4	326±6,08	1089±48,66
	Z/VAL-06-15	4	337,75±2,63	3803,25±3065,32
	Z/VAL-16-15	4	331,33±2,08	1107,33±11,55
	Z/VAL-19-05	4	337,75±2,06	1063,25±17,63
	Z/VAL-14-11	4	346,25±3,4	2926,25±2167,16
	Z/RM-08-21	4	333,5±1,29	4636,75±2427,01
	Z/VAL-14-04	4	346,33±4,93	1082±34,39
	CU13	2	336±5,66	3392±3518,56
	Vial -T	2	337±11,31	1063,5±26,16

Tabla A9: Datos de fluorescencia a 0 y 48 h de *M. smegmatis* GFP (fluoróforo en el espectro verde) del ensayo con sobrenadantes, con los medios de cultivo LB $\frac{1}{5}$ + 7H9. Se reflejan las medias de los datos del cultivo y sus controles con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo.

<i>M.smegmatis</i> GFP				
Medio	CONTROL	Sobrenadantes		
		n	Tiempo =0h	Tiempo = 48 h
LB 1/5 +7H9	LB 1/5 +7H9	1	74	87
	<i>M.smegmatis</i> GFP	2	85±7,07	110±2,83
	Z/CA-07-16	1	68	84
	Z/UZ-B2-11	1	78	89
	Z/UZ-B3-17	1	75	81
	Z/VAL-06-15	1	84	87
	Z/VAL-16-15	1	80	80
	Z/VAL-19-05	1	81	84
	Z/VAL-14-11	1	92	102
	Z/RM-08-21	1	73	83
	Z/VAL-14-04	1	77	90
	CU13	1	87	100
	Vial -T	1	76	89
LB 1/5 +7H9	Co-cultivo		Sobrenadantes	
	Co-cultivo	n	Tiempo =0h	Tiempo =48 h
		1	74	87
		2	85±7,07	110±2,83
		4	80,25±4,35	165,75±108,93
		4	89,25±2,36	226,5±112,03
		4	88,25±3,59	167,25±71,65
		4	82,5±1,91	161,5±101,95
		4	88±2,94	147,75±66,96
		4	86±6,38	167,5±97,89
		4	101,75±5,44	190±81,29
		4	85,25±3,77	238,33±95,32
		4	88,25±2,22	118±6
	CU13	2	110,5±2,12	173±120,21
	Vial -T	2	98,5±0,71	123±5,66

Tabla A10: Datos de fluorescencia a 0 y 24 h de *E.coli* pON.mCherry (fluoróforo en el espectro rojo) del ensayo con sobrenadantes y en co-cultivo a 0 semanas de incubación (0w) de las cepas ambientales, en medio de cultivo LB 1/5. Se reflejan las medias de los datos del cultivo y sus controles con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo.

Medio	CONTROL	<i>E.coli</i> pON.mCherry					
		0w			Sobrenadante		
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h
LB 1/5	LB 1/5	3	28,33±2,52	31±3	1	28,5±2,12	30,5±10,61
	<i>E.coli</i> pON.mCherry	3	33,33±3,79	220±26	2	29±2,83	230,5±20,51
	Z-DW-12-08	1	33	43,5	1	27	31
	Z-DW-12-09	1	30	30,75	1	33	35
	Z-DW-15-10	1	28	35,75	1	30	24
	Z-DW-34-08	1	25	47,75	1	34	31
	Z-DW-35-03	1	27	58,5	1	32	30
	Z-DW-39-02	1	31	33,75	1	34	28
	Z-DW-52-01	1	33	220,25	1	30	33
	Z-DW-52-09	1	35	52,25	1	34	27
	Z-DW-14-10	1	26	37,25	1	33	33
	Z-DW-46-01	1	34	243,25	1	25	27
	Co-cultivo	0w			Sobrenadante		
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h
	LB 1/5	3	28,33±2,52	31±3	1	28,5±2,12	30,5±10,61
	<i>E.coli</i> pON.mCherry	3	33,33±3,79	220±26	2	29±2,83	230,5±20,51
	Z-DW-12-08	4	31±3,92	43,5±9,04	4	30,5±3,7	42±4,55
	Z-DW-12-09	4	32,75±3,3	30,75±4,03	4	32,75±2,63	207,5±10,75
	Z-DW-15-10	4	31±4,32	35,75±6,4	4	28,25±1,89	200,75±7,27
	Z-DW-34-08	4	31,25±4M43	47,75±27,11	4	33±3,37	212,75±17,69
	Z-DW-35-03	4	31,5±4,2	58,5±26,71	4	30±3,83	235,25±9,57
	Z-DW-39-02	4	30±3,56	33,75±8,1	4	31±3,65	149,75±1,71
	Z-DW-52-01	4	31,5±3,32	220,25±83,44	4	29±4,2	30±5,23
	Z-DW-52-09	4	31±4,24	52,25±30,53	4	30±2,5	152,5±3,7
	Z-DW-14-10	4	30,5±4,2	37,25±4,92	4	33,66±1,5	165,25±8,38
	Z-DW-46-01	2	29±3,56	243,25±81,33	4	29,75±2,5	174,25±6,29

Tabla A11: Datos de fluorescencia a 0 y 24 h de *S.aureus* GFP (fluoróforo en el espectro verde) del ensayo con sobrenadantes y en co-cultivo a 0 semanas de incubación (0w) de las cepas ambientales, en medio de cultivo LB 1/5. Se reflejan las medias de los datos del cultivo y sus controles con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo. * Los valores en rojo no son válidos debido a una contaminación.

Medio		CONTROL	<i>S.aureus</i> GFP					
			0w			Sobrenadante		
			n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h
LB 1/5	<i>S.aureus</i> GFP	LB 1/5	2	66±0	65±0	2	60,5±0,71	63±0,71
		<i>S.aureus</i> GFP	2	65,5±0,71	254,5±9,19	2	60,5±0,71	264±14,14
		Z-DW-12-08	1	63	81	1	62	84
		Z-DW-12-09	1	63	78	1	61	487
		Z-DW-15-10	1	64	65	1	57	63
		Z-DW-34-08	1	64	78	1	57	60
		Z-DW-35-03	1	65	66	1	61	66
		Z-DW-39-02	1	65	81	1	66	74
		Z-DW-52-01	1	65	60	1	58	60
		Z-DW-52-09	1	66	67	1	58	522
		Z-DW-14-10	1	62	86	1	66	69
		Z-DW-46-01	1	61	62	1	57	58
	Co-cultivo	0w			Sobrenadante			
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	
		LB 1/5	2	66±0	65±0	2	60,5±0,71	63±0,71
		<i>S.aureus</i> GFP	2	65,5±0,71	254,5±9,19	2	60,5±0,71	264±14,14
		Z-DW-12-08	4	66,25±2,5	122,5±6,81	3	67±1	88,33±11,02
		Z-DW-12-09	4	66,75±0,5	109,75±1,26	4	64±2,71	556±16,02
		Z-DW-15-10	4	66,5±1,29	264,25±11,03	4	60,75±0,96	103,5±16,58
		Z-DW-34-08	4	66,25±0,5	267,5±14,27	4	60±0,82	560,75±359,41
		Z-DW-35-03	4	66,5±0,58	283±14,35	4	63,5±0,58	200±5,72
		Z-DW-39-02	4	66,25±0,96	216,25±29,99	4	67,75±0,96	299,25±136,23
		Z-DW-52-01	4	65,5±0,58	238,5±8,66	4	58,25±0,50	150±1,41
		Z-DW-52-09	4	66,25±0,96	176±6,98	4	60,25±0,50	584,75±280,03
		Z-DW-14-10	4	66,5±0,58	147,25±9,81	4	68,5±0,58	488±221,52
		Z-DW-46-01	2	65±0,82	260,25±23,49	4	58,25±1,50	332±43,92

Tabla A12: Datos de fluorescencia a 0 y 24 h de *P. aeruginosa* GFP (fluoróforo en el espectro verde) del ensayo con sobrenadantes y en co-cultivo a 0 semanas de incubación (0w) de las cepas ambientales, en medio de cultivo LB 1/5. Se reflejan las medias de los datos del cultivo y sus controles con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo. * Los valores en rojo no son válidos debido a una contaminación.

Medio	CONTROL	<i>P.aeruginosa</i> GFP						
		0w			Sobrenadante			
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	
LB 1/5	LB 1/5	2	66±0	65±0	2	60,5±0,71	63±0,71	
	<i>P.aeruginosa</i> GFP	2	64±0	818±427,09	2	60,5±0,71	851±472,35	
	Z-DW-12-08	1	63	81	1	62	84	
	Z-DW-12-09	1	63	78	1	61	487	
	Z-DW-15-10	1	64	65	1	57	63	
	Z-DW-34-08	1	64	78	1	57	60	
	Z-DW-35-03	1	65	66	1	61	66	
	Z-DW-39-02	1	65	81	1	66	74	
	Z-DW-52-01	1	65	60	1	58	60	
	Z-DW-52-09	1	66	67	1	58	522	
	Z-DW-14-10	1	62	86	1	66	69	
	Z-DW-46-01	1	61	62	1	57	58	
	Co-cultivo	0w			Sobrenadante			
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	n	Tiempo =0 h	Tiempo =24 h	
		LB 1/5	2	66±0	65±0	2	60,5±0,71	63±0,71
		<i>P.aeruginosa</i> GFP	2	64±0	818±427,09	2	60,5±0,71	851±472,35
		Z-DW-12-08	4	64,5±1	653,75±403,51	3	63,33±2,08	470,33±21,59
		Z-DW-12-09	4	65,25±1,71	482,25±10,05	3	63±3	543,33±14,22
		Z-DW-15-10	4	64,75±1,26	681±269,56	3	58,33±2,08	852,33±477,4
		Z-DW-34-08	4	64,5±1,29	688±282,88	3	57,66±2,52	540,66±8,5
		Z-DW-35-03	4	64,25±1,26	690±258,24	3	60,33±2,08	673±2,48,55
		Z-DW-39-02	4	64,5±1	828±342,19	3	65,33±2,52	513,33±14,57
		Z-DW-52-01	4	63±1,41	815,5±328,3	3	55,66±2,08	61,66±3,06
		Z-DW-52-09	4	63,75±1,26	624,5±274,49	3	60±6,08	658±380,62
		Z-DW-14-10	4	64,25±0,96	612,75±332,23	3	65±2,65	529,33±11,55
		Z-DW-46-01	2	64±0,82	642,75±257,72	3	57,33±1,53	706,33±324,53

Tabla A13: Datos de fluorescencia a 0 y 48 h de *M. smegmatis* GFP (fluoróforo en el espectro verde) del ensayo con sobrenadantes en medio de cultivo LB 1/5 + 7H9. Se reflejan las medias de los datos del cultivo y sus controles con su desviación estándar y el número de réplicas utilizadas para su cálculo. * Los valores en rojo no son válidos debido a una contaminación.

		<i>M.smegmatis</i> GFP		
Medio	CONTROL	Sobrenadante		
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =48 h
LB 1/5 +7H9	LB 1/5 +7H9	2	78±	83±1,41
	<i>M.smegmatis</i> GFP	2	84±8,49	199,5±128
	Z-DW-12-08	1	76	78
	Z-DW-12-09	1	71	74
	Z-DW-15-10	1	79	166
	Z-DW-34-08	1	74	93
	Z-DW-35-03	1	77	89
	Z-DW-39-02	1	83	143
	Z-DW-52-01	1	69	73
	Z-DW-52-09	1	82	83
	Z-DW-14-10	1	89	88
	Z-DW-46-01	1	72	76
	Co-cultivo	Sobrenadante		
		n	Tiempo =0 h	Tiempo =48 h
		LB 1/5 +7H9	78±	83±1,41
		<i>M.smegmatis</i> GFP	84±8,49	199,5±128
		Z-DW-12-08	91,75±4,19	308±295,85
		Z-DW-12-09	81,75±2,06	377,5±296,16
		Z-DW-15-10	89,75±2,63	329,5±214,78
		Z-DW-34-08	86,5±5,07	208±104,99
		Z-DW-35-03	83,75±3,5	154,5±69,17
		Z-DW-39-02	90,25±0,96	115,5±8,06
		Z-DW-52-01	76,25±2,22	207±121,38
		Z-DW-52-09	88±4,69	223,25±137,58
		Z-DW-14-10	95,5±3,7	170±88,70
		Z-DW-46-01	82±2,16	274,75±158,36

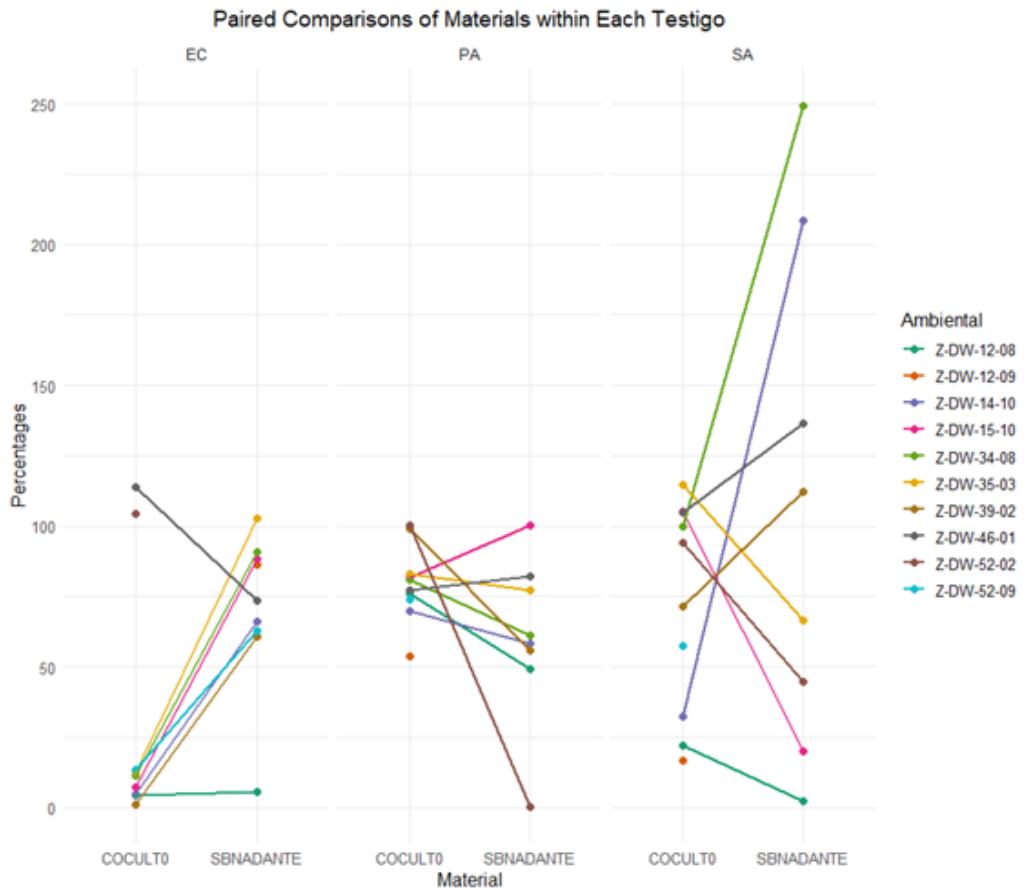


Figura A4: Análisis de las medias de los porcentajes de crecimiento según cepas testigo: **EC**: *E. coli* pONmCherry, **PA**: *P. aeruginosa* GFP, **SA**: *S. aureus* GFP. Y según ensayo de inhibición en co-cultivo y con sobrenadantes. Figura fue generada con R a partir de la librería ggplot2.