

TRABAJO DE FIN DE GRADO: CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS AISLADOS EN EL PROYECTO MICROMUNDO-UZ



**Universidad
Zaragoza**



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Alumno: Asier Dominguez San Pedro

Tutora: Ainhoa Lucía Quintana

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA - FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

Índice

Resumen.....	5
Abstract	5
Introducción.....	5
¿Qué es MicroMundo?.....	5
¿Cómo se trabaja en MicroMundo? Jerarquías y Proyectos	6
Expansión de SWI, TyE y MicroMundo.....	7
Problemas de la resistencia a antibióticos	8
Mecanismos de resistencia a antibióticos	9
Datos sobre los problemas de la resistencia a antibióticos	11
Conocimiento del problema por parte de la sociedad.....	12
Antimicrobianos naturales	12
Géneros bacterianos productores de antibióticos que hay en el suelo.....	13
Fundamentos del ensayo propuesto en SWI	13
Objetivos	14
Materiales y métodos	14
Cepas bacterianas y medios de cultivo	14
Ensayo de Antibiosis.....	15
Antibiosis realizada con sobrenadante en agujeros del agar.....	15
Antibiosis con discos	15
PCR	16
Resultados.....	16
Encuesta de este trabajo.....	16
Crecimiento, aspecto y morfología de las colonias.....	18
Comprobación de los microorganismos positivos	19
Comprobación tras la congelación de las muestras.....	20
Actividad frente a bacterias patógenas	20
Comprobación de la influencia de los medios	21
Comprobación realizada con la difusión del sobrenadante en el agar	22
Análisis de la PCR.....	22
Discusión	22
Plan de trabajo que se hubiera seguido.....	24
Antibiosis frente a SARM.....	24
Identificación.....	24
Influencia de la temperatura.....	25
Influencia de las condiciones de almacenamiento	25
Repetición del ensayo con <i>M. bovis</i> BCG	25
Conclusiones	26
Conclusions	26
Bibliografía	27
Anexo I. Abreviaturas.....	30
Anexo II. Antibiosis de comprobación.....	31
Anexo III. Resultados de Antibiosis Completos.....	33
Anexo IV. Diferenciación primera antibiosis sobre BHI o M-H	37
Anexo V. Preguntas realizadas en la encuesta de este trabajo	41
Anexo VI. Hoja de recogida de datos y plantilla.....	45
Anexo VII. Gráficas de la encuesta realizada en este TFG y por el Eurobarómetro.....	48
Anexo VIII. Imágenes de ensayos.....	51

Resumen

Durante el curso académico 2018-2019, un grupo de investigadores y alumnos de la Universidad de Zaragoza comenzó en Aragón el proyecto MicroMundo, dentro de la metodología de Aprendizaje-Servicio, acudiendo a diferentes centros de enseñanza de la capital aragonesa.

A lo largo de este trabajo se han empleado distintas técnicas de Microbiología clásica en el manejo de los microorganismos aislados en este proyecto. Se trabajó con 1897 muestras aisladas de las cuales 159 dieron positivo en producción de sustancias inhibitorias en las comprobaciones realizadas y fue con estas 159 con las que se ha trabajado en este TFG. El proyecto MicroMundo y este trabajo no solo buscan el descubrimiento de nuevos antibióticos sino la divulgación acerca del problema de la resistencia a antibióticos y la concienciación sobre su uso responsable.

Abstract

During the academic course 2018-2019, a group of researches and students from the University of Zaragoza began MicroMundo Project in Aragón, using the methodology of Service-Learning by going to different high schools from the Aragón's Capital.

Along this work, classical microbiology techniques have been used in the handling of the isolated microorganisms in this project. Total of isolated microorganisms was 1897 and 159 of them were positive in inhibitory substance production in the checks carried out. We worked with these 159 samples along this TFG. MM and this work seek not only the discovery of new antibiotics but the disclosure of antibiotic resistance and thee awareness of its responsible use.

Introducción

¿Qué es MicroMundo?

“Es un proyecto global con un doble objetivo: fomentar en nuestros jóvenes vocaciones por I+D en Biomedicina y concienciar a la sociedad sobre el problema de salud pública que supone la crisis de los antibióticos”²⁴.

El proyecto MicroMundo nació en Estados Unidos, con el nombre original de Small World Initiative en 2012 de la mano de la Dra. Jo Handelsman en la Universidad de Yale para implantarlo en universidades de Norteamérica. Tiempo después de su creación se produjo una escisión, partiéndose en SWI y TyE.

A lo largo del trabajo, cuando se nombre Small World Initiative (SWI) se refiere al proyecto en Estados Unidos y cuando se diga MicroMundo (MM) se hablará de la versión española.

SWI surgió como medida para despertar la vocación científica entre los estudiantes, porque las carreras de ciencias, tecnologías, ingeniería y matemáticas (STEM, por sus siglas en inglés) habían notado un gran descenso en su número de matriculados⁷. En España, este tipo de carreras universitarias también habían disminuido un 25-30%, según datos de 2016²⁴.

La incorporación del proyecto en España supuso una adaptación en la metodología americana, porque la actividad de MicroMundo se orientó hacia alumnos de bachillerato o últimos cursos

de la ESO, dado que es entonces cuando, en nuestro país, los alumnos deciden la orientación universitaria o grados de formación para estudiar posteriormente.

SWI cumple con la labor social de concienciar a la población sobre un buen uso de antibióticos e intentar encontrar alguno nuevo, ya que nos encontramos en la llamada “crisis de los antibióticos”.

¿Cómo trabaja MicroMundo? Jerarquías y proyectos

“El Aprendizaje-Servicio es una propuesta educativa que combina procesos de aprendizaje y de servicio a la comunidad en un solo proyecto bien articulado donde los participantes aprenden a trabajar en necesidades reales en el entorno con la finalidad de mejorarlo”³.

Se desarrollaron unas directrices básicas desde su comienzo, como el organigrama de jerarquías seguido, el empleo de medios selectivos para evitar el crecimiento de hongos, las diferentes sesiones que tienen lugar...

En este proyecto, los estudiantes universitarios afianzan sus conocimientos en microbiología a través de la preparación de las sesiones y buscando las respuestas a las preguntas generadas en los centros educativos; a su vez prestan un servicio a la sociedad, divulgando sobre los problemas de la resistencia a antibióticos e intentando transmitir sus conocimientos en microbiología. En las sesiones de MicroMundo se trabaja con muestras de tierra que los propios alumnos son los encargados recoger de los lugares donde ellos consideren.

Micromundo es un proyecto jerarquizado, distinguiéndose tres niveles²⁴:

- **SWIPI:** es un docente/investigador universitario al cargo de un grupo de trabajo.
- **SWITA:** estudiante universitario, perteneciente a un grupo formado entre 3-6 SWITAS son los encargados de llevar las sesiones, hablar y explicar a los estudiantes del centro escolar los procedimientos. Antes de acudir a los centros escolares deben preparar el material que se va a emplear.
- **Investigadores SWI:** son los estudiantes del centro escolar en el que se desarrollan las sesiones.



Figura 1. Representación gráfica de la jerarquía en el Proyecto Micromundo

Los SWITA asisten a una clase formativa antes de realizar las sesiones a los centros educativos, para conocer el fundamento y las formas de proceder, como marcan las normas de SWI. Las sesiones que se llevan a cabo en colegios e institutos se dividen en:

1. Presentación del proyecto y dotación del material de recogida de muestras, así como hojas para apuntar toda la información que sea posible (Anexo VI).
2. Realización de diluciones seriadas de la muestra de tierra y siembra sobre medios de cultivo sólidos. Las muestras se incuban en las estufas de la universidad a 30°C. Los medios de cultivo llevan cicloheximida para evitar el crecimiento de hongos.
3. Aislamiento de un determinado número de bacterias en otras placas, siguiendo la plantilla que se encuentra en el Anexo VI.
4. Proceder al ensayo de antibiosis, utilizando dos microorganismos testigo no patógenos en dos ensayos diferentes, una bacteria Gram positiva (*B. subtilis*) y una bacteria Gram negativa (*E. coli*).
5. Visualización y discusión de los resultados. Anotación sobre la hoja de muestras aquellas bacterias que han dado positivo en la producción de algún antibiótico frente a los microorganismos testigo.

Expansión de SWI, TyE y MicroMundo

El proyecto SWI comenzó en 2012 en la Universidad estadounidense de Yale. En apenas ocho años, se ha expandido por todo el mundo al igual que TyE.

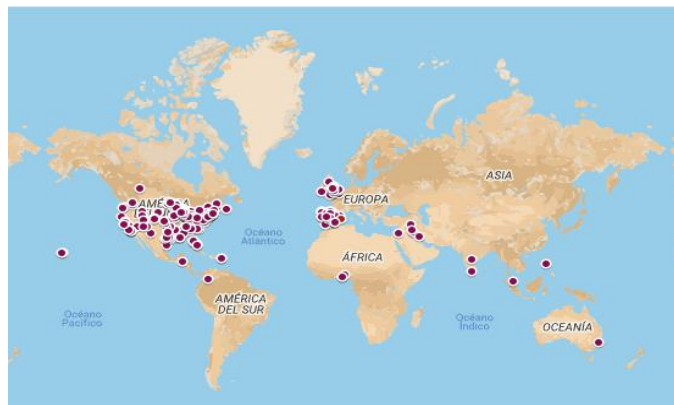


Figura 2. Localizaciones en las que Tiny Earth ha llevado su proyecto³¹

TyE se encuentra en 258 localizaciones, en 45 estados de los Estados Unidos y en otros 15 países, llegando a cerca de 10000 estudiantes anualmente.

TyE muestra los 25 centros universitarios en la Península Ibérica donde ahora mismo se está desarrollando MicroMundo. En España y Portugal se llega a más de 100 centros de enseñanza en la Península Ibérica y se han testado a más de 15000 microorganismos.



Figura 3. Localizaciones donde el proyecto MicroMundo se está llevando a cabo en la península ibérica

Tabla 1. Centros Universitarios de la Península Ibérica donde se lleva a cabo la actividad de MicroMundo			
Universidad de Castilla La Mancha: Campus de Ciudad Real	Universidade de Santiago de Compostela	Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria	Universidad de Castilla La Mancha: Campus de Albacete
Universidad de Navarra	Universidad de Murcia	Universidad de Sevilla	Universidad de Jaén
Universitat Miguel Hernández	Universidad del País Vasco-EHU	Universidade da Coruña	Universidad Complutense de Madrid
Universitat de Valencia	Universitat de Barcelona	Universidade de Vigo	University of Porto
Universidad de Valladolid	CEU Cardinal Herrera University	Universidad de Santiago de Compostela	Universidad de las Islas Baleares
Universidad de Zaragoza	Universidad de León	Universidad de Burgos	Universidad de Salamanca
Universidad Autónoma de Madrid			

En España, el centro pionero en este proyecto fue la Universidad Complutense Madrid durante el curso 2016-2017, con el apoyo de la Sociedad Española de Microbiología (SEM), siendo la primera vez que se implantaba el proyecto en una lengua distinta al inglés²⁴.

Además del amparo de la SEM, MicroMundo cuenta con el respaldo de la Asociación Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) y del Plan Nacional frente a la Resistencia de Antibióticos (PRAN).

Problemas de la resistencia a antibióticos

“La resistencia a antibióticos es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible”³⁴

Debido a la acción de los antibióticos, todas aquellas bacterias que no posean resistencia a estos fármacos se verán mermadas, provocando una mayor prevalencia de aquellas que sí tienen esa información. El buen uso de antibióticos evita la selección de bacterias perjudiciales para nuestra salud.

La OMS lleva alertando de este hecho desde el año 2011, definiéndolo como problema de salud pública más importantes del siglo XXI, advirtiendo que hay muy pocos antibióticos en fase de investigación o de recambio³⁴.

Durante las tres últimas décadas prácticamente no se ha descubierto ningún nuevo antibiótico²⁴. Las inversiones llevadas a cabo han sido mínimas ya que menos del 5% del presupuesto en I+D de las farmacéuticas entre 2003-2013 fue destinado a la investigación en antibióticos, mientras que el NIH dedicó 1,2% de su dotación a investigación en este campo entre los años 2009-2014²⁴.

En el descubrimiento de nuevos antibióticos se pueden separar tres etapas²⁰: 1940-1970; 1970-2000; 2000-actualidad, respondiendo a las formas de investigación llevadas a cabo.

Entre 1940-1970 se hicieron cribados en función del fenotipo. Seleccionaban los microorganismos del suelo y comprobaban si existía la producción de antibióticos. El periodo de 1970-2000 corresponde a los enfoques en función del conocimiento que ya se tenía, se comenzaron a hacer recombinaciones de DNA, mutaciones en los genes implicados en la biosíntesis de antibióticos o target-based approaches (donde se busca inhibidores de diana específicos). En la tercera etapa donde nos encontramos, se basa en las aproximaciones basadas

en la genómica, donde las investigaciones no se centran en un único gen que pueda producir antibióticos, sino el conjunto de genes implicados en la fabricación de estos compuestos¹⁶.

Más de tres cuartas partes de los antibióticos empleados en salud humana son productos naturales o derivados de ellos¹⁴. Desde 2011 hasta diciembre de 2014 se aprobaron nueve moléculas pequeñas para su uso como antibióticos²⁹. Entre 1981 y 2014, el número de nuevos tratamientos contra las bacterias (incluidas vacunas) fue de 140²⁹, entre los cuales, apenas 11 fueron de origen natural (estructura no modificada) y 1 biológico (péptidos largos [>50] o proteínas recogidas de aislamientos de células/organismos o producidos por métodos biotecnológicos en células hospedadoras)²⁹.

En 2015, la OMS redactó un informe en el que aconsejaba los puntos clave que tratar para evitar la propagación de la resistencia a antibióticos e instaba a los estados miembros a tomar otras medidas en diferentes ámbitos para atajar el problema⁴².

La OMS señala que de los 33 antibióticos en proceso de desarrollo para tratar a los patógenos más peligrosos, tan solo nueve cumplen con uno de los criterios para ser clasificados en fármacos innovadores²:

Tabla 2. Criterios para clasificar un fármaco como innovador

Que no tenga resistencia cruzada con algún antibiótico en uso	Que sean una nueva estructura química	Que tengan una diana molecular novedosa	Que presenten un mecanismo de acción nuevo
---	---------------------------------------	---	--

En mayo del 2017, 51 antibióticos (incluidas combinaciones), de los que 11 eran biológicos, estaban en procesos de estudio en 42 terapias diferentes².

La mayoría de los nuevos antibióticos están dirigidos hacia bacterias Gram positivas. En el informe de 2017, la OMS dio una lista de microorganismos a los que es urgente buscar antibióticos, clasificándolos en su orden de prioridad²:

Tabla 3. Clasificación de microorganismos de búsqueda urgente de antibióticos según la OMS

Prioridad global	Prioridad crítica	Alta prioridad
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Salmonella species</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>
		<i>Campylobacter species</i>
		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>

Mecanismos de resistencia a antibióticos

Desde la perspectiva de la evolución, las bacterias emplean dos de las mejores estrategias para adaptarse a los ataques que sufren por el empleo de antibióticos²⁷:

- Mutación de los genes relacionados con el mecanismo de acción del compuesto.
- Adquisición de DNA externo, el cual codifica determinantes de resistencia.

Dentro de la segunda estrategia, para obtener la información genética de otros microorganismos presentes en el medio, las vías de transferencia de información pueden ser tres tipos diferentes, constituyentes de la Transferencia Genética Horizontal (TGH):

Tabla 4. Mecanismos de Transferencia Genética Horizontal		
Conjugación	Transfección	Transformación
Transferencia directa del material genético, promovida por un plásmido, por medio del contacto íntimo entre la célula donadora con la célula receptora.	El material genético es transportado desde una célula donadora a una célula receptora por medio de un virus bacteriano, actuando éste como vector.	Captación y asimilación de DNA libre presente en el medio

Los mecanismos de resistencia de las bacterias son²⁶⁻²⁷:

1. Modificación de la molécula de antibiótico:
 - a. Alteración química del antibiótico:
 - i. Acetilación (aminoglicósidos, cloranfenicol, estreptograminas)
 - ii. Fosforilación (aminoglicósidos, cloranfenicol)
 - iii. Adenilación (aminoglicósidos, licosamidas)

Los AME (por sus siglas en inglés de enzima modificadora de aminoglicósidos) son uno de los ejemplos más característicos de este proceso ya que modifican covalentemente los grupos hidroxilo o aminos en las moléculas aminoglicósidos. Son los mecanismos de resistencia más extendidos²⁷.

- b. Destrucción de la molécula antibiótica

B-lactamasas → Destruyen los enlaces amida de los anillos betalactámicos. Generalmente se les conoce como genes *bla*, seguidos del nombre de la enzima específica (por ejemplo, *bla_{KPC}*). Se separan en 4 grupos (A-B-C-D) en función de la secuencia de aminoácidos

2. Reducción de la penetración del antibiótico y bombas de eflujo
 - a. Bajada de la permeabilidad

Es un mecanismo muy importante en Gram⁻. La membrana externa ejerce de primera línea de defensa ante la entrada de sustancias tóxicas para la célula. Por ejemplo, en la resistencia a vancomicina se produce una reorganización de la pared celular¹⁸. Las bacterias varían su permeabilidad mediante el cambio de porinas que hay en su superficie y así los antibióticos no pueden acceder a su interior¹⁸.

- b. Bombas de eflujo

Afectan a un gran número de antibióticos²⁷, como inhibidores de síntesis proteica, fluoroquinolonas, β-lactámicos, carbapenems y polimixinas. La descripción de un sistema de eflujo capaz de expulsar tetraciclinas al exterior del citoplasma de *E. coli* se dató en los ochenta y fue la primera vez que se observaba un hecho de este tipo²¹.

3. Cambios en los sitios diana
 - a. Protección de la diana

Evita la acción de fármacos como tetraciclinas o fluoroquinolonas. La proteína QnrA protege a la topoisomerasa de la acción de las quinolonas²⁷. Las proteínas Qnr actúan como homólogos que compiten por la unión al DNA en los sitios de DNA girasa o de la topoisomerasa IV. A través de esta reducción de interacciones entre la DNA girasa y el DNA decrece la oportunidad de las quinolonas para formar el complejo entre la girasa-quinolona y DNA escindido que es letal para la célula.

- b. Mutación de enzimas que producen la activación de la molécula pre-antibiótica

Isoniazid es una molécula pre-antibiótica empleada en infecciones de *M. tuberculosis*. Se ha observado que la mutación en el residuo S315G de la catalasa-peroxidasa ofrece resistencia a los efectos de esta molécula¹⁹⁻¹¹.

- c. Alteración enzimática de la diana

Por ejemplo, metilación del ribosoma por una enzima codificada en los genes *erm* confiere resistencia a macrólidos²⁷.

- d. Reemplazo completo o bypass de la diana

La proteína PBP2A realiza la acción de las proteínas PBP en la biosíntesis del peptidoglicano cuando éstas quedan inactivadas por betalactámicos²⁷.

Datos sobre los problemas de la resistencia a antibióticos

El padecer una enfermedad infecciosa multirresistente, como es el caso de M/XDR-TB (Tuberculosis), provoca que se encare una agonía, un sufrimiento prolongado y habitualmente una discapacidad permanente, además de tener que tomar un tratamiento que conlleva una dureza económica devastadora, estigma y discriminación social². El personal médico tiene una gran importancia en la conservación de la capacidad de los antibióticos para realizar su función, dado que son ellos quienes los proporcionan. Realizar todos los cambios necesarios para paliar la resistencia a antibióticos exige voluntad política³⁴.

El aumento de la infecciones de microorganismos resistentes lleva consigo enfermedades más largas, mayor mortalidad, mayores estancias en hospitales, pérdida de protección de los pacientes en operaciones quirúrgicas y un aumento de los costes en sanidad³⁴. Las bacterias farmacorresistentes pueden circular libremente valiéndose de distintos vectores, pudiendo afectar con su transmisión al comercio, los viajes y la migración humana³⁴. En países menos desarrollados, donde ya de por sí es más difícil el acceso a antibióticos y muchos niños mueren anualmente por infecciones, este problema cobra mayor relevancia.

Los progresos en la lucha contra la resistencia han sido lentos, en parte, debidos a unas vigilancia y notificación deficientes por parte de los países³⁴.

El Foro Económico Mundial ya advirtió que todos los países deben actuar conjuntamente porque es imposible gestionar esta situación en solitario¹⁷. Sólo en la Unión Europea, la resistencia a antibióticos produce unos gastos sanitarios adicionales y una bajada de productividad cifrada en al menos 1500 millones de euros³⁴. En EEUU, se gastan entre 21-34 mil millones de dólares para luchar contra los microorganismos multirresistentes, además de los 8 millones de días de atención en hospitales anualmente que esto supone. El PIB invertido en este país para ello ha pasado de 0,4% a 1,6%³⁶.

En España 3000 personas mueren al año como consecuencia de infecciones de bacterias multirresistentes, siendo 33000 a nivel europeo. El coste nacional anual de este problema es de 150 millones de euros³⁵. Se estima que dentro de 35 años, fallezcan 40000 personas en nuestro país cada año, y 390000 en Europa, convirtiéndose en la primera causa de muerte.

Conocimiento del problema por parte de la sociedad

En el Eurobarómetro especial¹ se preguntó a la población sobre su conocimiento de los antibióticos y el uso que les dan a éstos. En la encuesta europea, se preguntó a un total de 1009 españoles entre el 11 y 23 de septiembre de 2018.

Los primeros resultados arrojados es que el 50% de españoles cree que los antibióticos matan a los virus (el 38% dijo que no lo hacen y el 12% se abstuvo) frente al 48% de media europea (43% no lo hace); el 36% lo usaría contra un resfriado (57% no y 7% se abstuvo) en contraposición del 28% de la unión europea; gran parte de los españoles (86%) conoce que un uso innecesario del mismo los vuelve inefectivos, algo muy similar a la media de la UE (85%).

En lo referido al uso de los antibióticos, los datos de España y la UE son iguales a la hora de responder sobre cuándo dejan de tomar antibióticos una vez iniciado el tratamiento (84% cuando se han tomado los antibióticos indicados, 13% cuando se sienten mejor, 3% otro).

La encuesta enseña que los españoles han recibido menos información sobre el uso de los antibióticos con respecto a la UE, ya que tan solo el 23% de españoles lo ha hecho frente al 33% de la comunidad europea.

Antimicrobianos naturales

Pese a no conocerse los antibióticos hasta el siglo XX, a lo largo de la historia se han ido empleando gran cantidad de métodos cuyo fin era evitar el contagio de infecciones o contaminaciones de los alimentos.

Estos hechos se han descubierto excavaciones arqueológicas de Mesopotamia, donde hacían mezclas con vino, enebro y ciruelas. La cultura árabe describía el espíritu del vino, llamado al-Khol, raíz de la que vienen muchas palabras españolas actuales para describir productos contra infecciones. En escritos de Hipócrates en la antigua Grecia se recomendaba usar miel en heridas (pese a que no se conoce su mecanismo de acción²², se sabe que posee vitaminas B6, tiamina, niacina, riboflavina y ácido pantoténico³⁸), tomillo (timol y carvacrol⁴⁰) en enfermedades infecciosas o vinagre para acciones antisépticas²⁵.

Muchas de las plantas aromáticas, como el romero, tomillo, clavo, pimienta... son plantas empleadas para preservar y evitar infecciones y contaminaciones. Incluso en la religión se emplean y se documentan ya el uso de estos compuestos, como son el incienso y la mirra²⁵ (debido a que están formados por diferentes terpenoides).

Estos son algunos ejemplos de cómo la cultura de las diferentes civilizaciones conocía ya el poder de algunas sustancias como antimicrobianos. Si se permite un inciso personal, en la cultura popular de mi zona se conoce al ajo como “la penicilina del pobre”, por su actividad antibacteriana y es por ello muy usado en las recetas. Este compuesto antimicrobiano presente en el ajo se conoce, es la aliína²⁵.

Géneros bacterianos productores de antibióticos que se hay en el suelo

La Penicilina fue el primer antibiótico descubierto, estaba producido por un hongo y tenía una desventaja, y es que solo afecta a los Gram positivos, mientras que los Gram negativos no sufrían sus efectos, debido a la presencia de su membrana externa³³. En 1943 se produjo el segundo gran descubrimiento en la era de los antibióticos cuando se descubrió que *Streptomyces griseus* era capaz de producir estreptomycin, un antibiótico que se dirige contra la síntesis proteica al unirse en la subunidad 30S del rRNA procarionta, afectado de este modo únicamente a bacterias, incluyendo Gram negativas³³.

El 60% de los antibióticos producidos por microorganismos son generados por el orden *Actinomycetales*⁹. La mayoría de los antibióticos usados hoy en día con origen en el filo Actinobacteria, concretamente el 80%, están producidos por *Streptomyces*⁴.

En la Tabla 5 se recogen algunos de los antibióticos de uso comercial más extendidos y el microorganismo que los produce:

Tabla 5. Selección de antibióticos de origen natural más empleados en la actualidad y microorganismos productores⁹

Antibiótico	Microorganismo productor	Antibiótico	Microorganismo productor
Cefalosporina	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Daptomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i>
Eritromicina	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Ivermectina	<i>Streptomyces avermitilis</i>
Kanamicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Vancomicina	<i>Anrycolatosis orientalis</i>

Fundamentos del ensayo propuesto en SWI

El ensayo llevado a cabo en el proyecto MicroMundo se basa en la recogida de muestras de tierra para cultivar las bacterias que habitan en ella en un medio de cultivo sólido y posteriormente comprobar si alguna es capaz de producir una sustancia antibiótica frente a los microorganismos testigo.

Es una metodología de la microbiología “clásica” porque es una de las primeras técnicas que se emplearon cuando comenzó el gran auge de la microbiología en los años 40 del siglo XX. Se puede llegar a la conclusión de que si es una técnica sobrexplotada durante tantísimo tiempo y que prácticamente desde los años 80 no han aparecido muchos antibióticos nuevos²⁹ ¿qué hace pensar que con este proyecto las cosas van a cambiar, que encontraremos algo nuevo?

Para entenderlo, hay que pensar en la magnitud de este proyecto y lo importante que es que llegue a la mayor cantidad de sitios posibles. Durante los años donde se descubrieron una gran suma de antibióticos, las zonas registradas para la búsqueda eran una ínfima parte de todas las posibles.

Sin embargo, si pensamos en los cientos de miles de personas que pueden implicarse en la iniciativa, nos lleva a cientos de miles de posibles nuevos lugares y ambientes que todavía no se han analizado, con lo cual, las posibilidades de encontrar una nueva sustancia o especie productora aumentan.

La primera sustancia antibiótica descubierta fue la Penicilina, por Alexander Fleming quien vio que el hongo del pan inhibía el crecimiento de las bacterias de *S. aureus* que él había sembrado,

llamando el posible compuesto Penicilina (el hongo era *Penicillium Notatum*), pero como el efecto inhibitorio era mínimo llegó a pensar que esa sustancia carecía de interés comercial. Fue un pequeño error, debido a que en la década de los 40 se consiguió purificar Penicilina de una cepa que era mejor productora, dando comienzo a la era antibiótica⁵⁻¹⁵.

Objetivos

Con este trabajo se ha intentado aunar todas las muestras y datos recogidos en los centros educativos, con el propósito de poder determinar aquellos que también produjeran sustancias inhibitorias frente a otros microorganismos patógenos y su respectiva identificación. La resistencia a antibióticos es un problema que nos afecta a todos por igual, por lo que se intentaba saber qué información tiene la ciudadanía.

1. Comprobar el conocimiento de la población acerca de la resistencia a antibióticos mediante una encuesta propia, distinguiendo por el nivel de estudios recibidos, algo diferencial respecto la realizada en el Eurobarómetro¹.
2. Verificación de positivos
3. Comprobación de actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos
4. Identificación de microorganismos positivos a partir de la secuenciación de las regiones 16S de rRNA
5. Optimización de la producción y resultados en los ensayos
6. Comprobar el efecto de congelación/descongelación de las muestras para la producción de antibióticos

Materiales y métodos

En este trabajo se han producido muchos ensayos diferentes, con el fin de poder caracterizar lo mejor posible las muestras recogidas en colegios y poder determinar las condiciones óptimas de producción de antibióticos.

Cepas bacterianas y Medios de cultivo

Las cepas empleadas fueron *B. subtilis*, *E. coli* (DH5 α), *Enterobacter faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (CECT794), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Mycobacterium smegmatis* (mc²155) y *Mycobacterium bovis* BCG. Las bacterias ESKAPE son un grupo de aquellas bacterias que en la actualidad dan problemas de resistencia a antibióticos.

Los medios empleados para el crecimiento de las bacterias testigo fueron Brain Heart Infusion (BHI, DIFCO siguiendo las recomendaciones del fabricante), y LB (CULTIMED, elaborado de acuerdo con los protocolos del laboratorio). Para el ensayo de antibiosis frente a *B. subtilis* y *E. coli* se utilizó BHI-A (17% agar según los protocolos del laboratorio, BHI-A con 5% cicloheximida para el aislamiento en los colegios) o Mueller-Hinton (M-H, SCHARLAU, se siguen las recomendaciones del fabricante). En el caso de las bacterias patógenas se utilizó M-H con un suplemento de cationes: 22mg/l CaCl₂ y 12mg/l MgSO₄ en una proporción de 100 μ l/100ml de medio.

Para trabajar con *Klebsiella pneumoniae* se suplementó con 4% de Suero Fetal Bovino (SFB). En el cultivo de *Mycobacterium bovis* BCG se empleó 7H9 y 7H10 (DIFCO™ Middlebrook), los cuales son de BD (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Tanto 7H9 como

7H10 se suplementaron con ADC (BBLTM Middelbook) al 10% y con tween 80 (SCHARLAU) al 0,05%).

Todos los microorganismos crecían ON, con excepción de *M. smegmatis* (48h) y *M. bovis* BCG (1 semana).

Ensayo de Antibiosis

A través de este ensayo se intenta conocer si la muestra que estamos probando genera antimicrobianos frente al microorganismo testigo.

Hacer una cuadrícula sobre la placa de Petri. Siembra de césped bacteriano del microorganismo testigo sobre el medio de cultivo sólido que se ajuste mejor las necesidades de crecimiento de esta bacteria. La siembra se produce utilizando un hisopo, el cual se ha introducido en un medio líquido donde se encuentra el microorganismo testigo en fase estacionaria, el cual había crecido ON a su temperatura de crecimiento óptima correspondiente tras el inóculo realizado el día anterior.

En las celdas de la cuadrícula se ponen las colonias potencialmente productoras de antibióticos que se quieren testar. Las cuadrículas están convenientemente rotuladas para conocer qué muestra es la depositada en ella.

Se deja incubar en las condiciones de temperatura y tiempo necesario para el crecimiento de la bacteria testigo (30°C/24h en *B. subtilis* y 37°C/24h para *E. coli*). En caso de las bacterias patógenas, las antibiosis se incuban a 37°C/24h con excepción de *M. smegmatis* que necesita 48h de crecimiento.

Antibiosis realizada con sobrenadante en agujeros del agar

El concepto es igual a la antibiosis, pero en lugar de realizar la cuadrícula, una vez se ha extendido el césped de *B. subtilis* o *E. coli* (según corresponda) se procede a realizar una serie de agujeros sobre el agar (BHI-A).

En los agujeros se introducen 200µl de sobrenadante, filtrado o no, de los microorganismos que se van a testar y que previamente han crecido en medio líquido LB. Al poner el sobrenadante en el agar, difunde en forma radial y se observan halos de inhibición en caso de haber antibiótico y que los microorganismos lo secreten al medio, como suele ser lo habitual.

Las muestras escogidas para ser testadas con su sobrenadante filtrado fueron escogidas al azar

Tabla 6. Muestras escogidas para ser testadas con su sobrenadante filtrado fueron escogidas al azar

Z/UZ-Bt-C2-11	Z/UZ-Bt-C3-20	Z/RM 1-2	Z/CA 06-21	Z/GO 07-21	Z/RM 1-12
---------------	---------------	----------	------------	------------	-----------

El resto de las cepas testadas, cuyo sobrenadante no fue filtrado, fueron aquellas que habían dado positivo en la antibiosis de verificación de la primera sesión.

Antibiosis con discos

Los microorganismos que se va a testar crecen en eppendorfs de 1,5 ml en medio líquido LB durante 6 días a 25°C. Tras ese tiempo se centrifugan los eppendorfs a 14000 rpm durante 10 minutos.

Se realiza el césped sobre el medio sólido con la bacteria testigo y sobre él se colocan discos de antibiosis, puestos en la misma posición a la cuadrícula de una antibiosis normal. Se toman 20µl de los sobrenadantes de los eppendorfs centrifugados con las muestras y se depositan sobre cada uno de sus correspondientes discos. Posteriormente, se incuba el tiempo y a la temperatura necesarios del microorganismo testigo.

PCR

Se utilizan oligonucleótidos del stock del laboratorio, los cuales amplifican las regiones 16S de los rRNA (una región que permite diferenciar procariontas de eucariotas, que tendrían 18S). Los oligonucleótidos empleados a una concentración 25µM tienen las siguientes secuencias:

- ➔ 16S-F: AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
- ➔ 16S-R: AGGCCCGGAACGTATTCAC

Las mezclas de PCR empleadas en este ensayo están fijadas en protocolos del laboratorio. La enzima empleada es Mytaq polimerasa de la empresa Bioline.

El programa seguido en el termociclador para ensayar los oligonucleótidos es el siguiente:

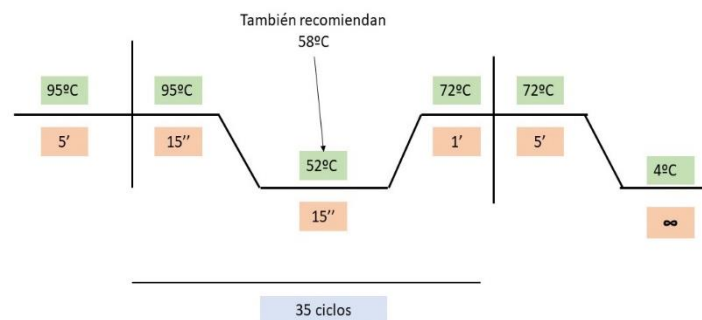


Figura 4. Programa empleado en el termociclador para la amplificación del gen 16S

Los oligonucleótidos se ensayaron en primer lugar con 5 muestras al azar, un control positivo y un control negativo. Se procede a visualizar el resultado sobre geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio para poder observar las bandas con luz ultravioleta. Las muestras corren el aproximadamente durante una hora, empleando un campo eléctrico de 90V.

Resultados

Encuesta de este trabajo

Se realizó una encuesta propia para determinar el conocimiento de la sociedad sobre el problema de la resistencia a antibióticos, diferenciando entre personas con y sin estudios universitarios, dado que MicroMundo es un proyecto enfocado hacia niveles preuniversitarios y de esta forma comprobar si más iniciativas de este tipo son necesarias. Las preguntas que se formularon se encuentran en el Anexo V. La encuesta se realizó entre los días 3-14 de abril de 2020 a un total de 293 personas.

El 33% de los encuestados no poseían estudios universitarios y el 67% sí los tenía.

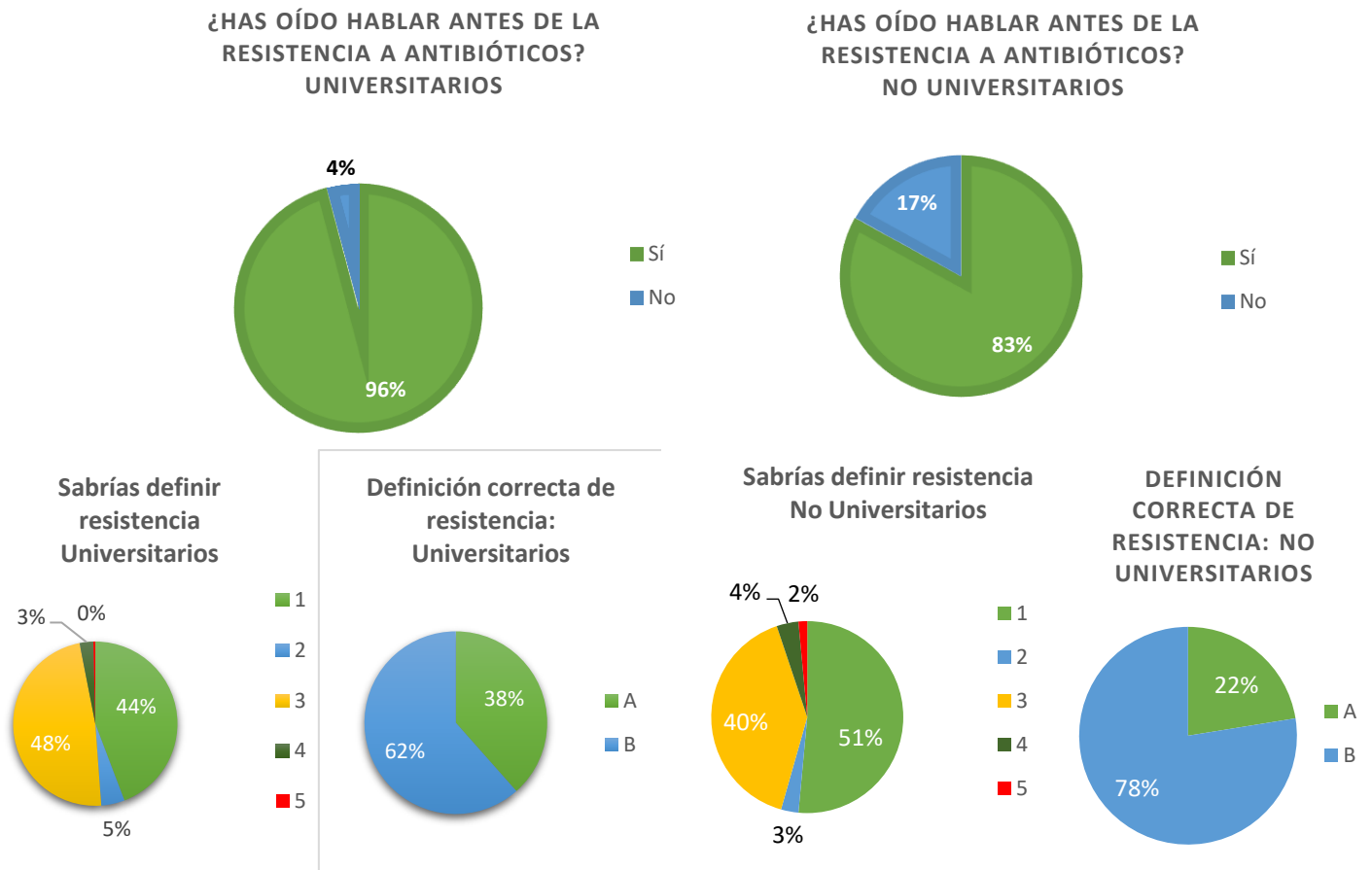


Figura 5. Gráficas representativas de la encuesta realizada en este TFG donde se muestran los conocimientos que la sociedad dice tener acerca de la resistencia a antibióticos. Las respuestas se organizaron en:

1. Nuestro cuerpo se adapta a los antibióticos y cada vez necesitamos más dosis para conseguir el mismo efecto
2. La cantidad de antibióticos que se consumen es mayor a la producción global de antibióticos
3. Un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que era sensible anteriormente
4. La resistencia de una persona a tomar un antibiótico, al igual que los antivacunas
5. Otra
- A. Respuesta única de “un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que era sensible anteriormente”
- B. Haber respondido otra respuesta

Como muestran los gráficos de la Figura 5, un 96% de las personas con estudios universitarios habían oído hablar de la resistencia a antibióticos, aunque sólo el 48% sabía indicar su definición en un respuesta múltiple y sólo el 38% contestó con respuesta única bien, frente al 83% de los no universitarios que habían oído el concepto, 40% que había indicado la respuesta correcta y sólo un 22% dio la respuesta única a la definición exacta.

En la cuestión de dónde habían conseguido los últimos antibióticos que habían tomado, el 88% de los universitarios y el 86% de los no universitarios afirmó que de un personal sanitario (frente al 95% que dice Europa), el 2% y 3% respectivamente aseguraron que no era de personal sanitario y los 10% y 11% restantes (universitarios y no universitarios) no sabían o no contestaban.

En lo referido a cuándo se toman estos medicamentos, el 96% dijo que cuando el médico así lo indica, el 3% con un resfriado y el resto lo toma por precaución o indisposición. Los no universitarios dijeron en un 92% que cuando el médico se lo receta, el 6% con un resfriado y el 2% remanente en caso de precaución o indisposición.

Una de las causas que produce la aparición de microorganismos resistentes se debe a un mal uso de los antibióticos al no acabar el tratamiento. Según nuestra encuesta, el 76% de los universitarios lo acaban mientras que la cifra se reduce al 72% de no universitarios. El 7% de universitarios lo deja cuando se siente mejor (el 13% lo termina a veces y el otro 4% se suele olvidar de tomarlo), que se convierte en el 11% de los no universitarios (13% y 4% respectivamente).

La concienciación de la población se ve si consideran éste un problema o no. Los universitarios dijeron en un 75% que sí lo es, un 3% dijo que no y el 22% que tal vez. El 79% de los no universitarios dijeron que sí, el 1% que no y el 20% que tal vez.

MicroMundo es un proyecto de concienciación sobre la resistencia a antibióticos, pero no el único que se desarrolla en nuestro país, por lo que se les interrogó si alguna vez habían oído hablar de él o alguno parecido. El 82% de universitarios dijo que no había oído nunca nada similar, el 16% sí conocía la existencia de MicroMundo y el 2% restante se repartía entre el PRAN y Anuncios publicitarios. Los no universitarios no conocían nada en un 91% y un 9% sí conocía MicroMundo.

Se les sugirió que diesen propuestas a título personal sobre cómo mejorarían científica o políticamente este problema, obteniéndose los resultados de la Figura 6:



Figura 6. Propuestas generadas por los encuestados para resolver el problema de la resistencia a antibióticos. Se organizaron en 7 grupos: Dar medicamento sólo con receta; Mayor difusión, promoción del problema-dándolo a conocer en la escuela; Mayor inversión en ciencia; Control en la producción de Carne; Concienciación del personal sanitario para dispensar antibióticos; Vender medicamento en dosis justas; No hay solución

Crecimiento, aspecto y morfología de las colonias

Las muestras recogidas en los centros educativos y que habían apuntado como positivos se encuentran en glicerol 15% a -20°C, por lo que era preciso descongelarlas y hacer una siembra por agotamiento, con el fin de conseguir aislar colonias y asegurarse a la vez que se está trabajando con cultivos puros sin contaminar. La siembra de cada una de las muestras se produjo sobre medio sólido BHI-A.

Al descongelar las muestras, algunas de ellas no crecieron a pesar de haber estado incubando durante 5 días a 30°C en BHI-A.

No todas las muestras crecieron en las primeras 24h, sino que algunas tardaron más tiempo en desarrollarse.

Según el aspecto y la morfología observada, la mayor parte de las muestras eran transparentes, habiendo creado biofilms que ocupaban todo el espacio disponible. No todos los biofilms formados eran transparentes, otros eran blancos, como por ejemplo ocurre con la muestra Z/VAL 05-20. Otras muestras, como Z/CA 07-16 se observan colonias que se aíslan con facilidad.

Las morfologías podían ir desde muy rugosas, como Z/RM 1-15 o de aspecto mucoso, como era el caso de Z/RM 2-12.

Caben destacar cuatro casos especiales:

- Z/VAL 03-19 tras una semana de crecimiento desarrollaba una pigmentación azul en un punto muy pequeño en el centro de sus colonias.
- Z/VAL 15-4 desarrollaba una pigmentación que pasaba gradualmente de blanco a negro a medida que avanzaban los días.
- Z/CA 01-4 y Z/CA 10-28 eran colonias transparentes que tiñeron el medio de un color rojizo muy potente, algo que hizo suponer que el antibiótico producido en cuestión era Rifampicina y posiblemente fueran la misma especie. Sin embargo, en los ensayos de antibiosis frente a bacterias patógenas no obtuvieron los mismos resultados.

Comprobación de los microorganismos positivos

Se analizaron un total de 159 microorganismos diferentes que en los colegios se habían catalogado como positivos, pero tan solo 78 fueron verificados en estos ensayos, es decir, el 49,05%. No se valoró la intensidad del positivo como sí se hizo frente a las bacterias patógenas.

Se ensayaron 147 muestras frente a *B. subtilis*, pero tan solo 71 se corroboraron como positivos en el primer ensayo, lo que representa el 48%.

Para *E. coli* el número de muestras analizadas fue de 27 de las cuales 15 también habían sido ensayadas frente a *B. subtilis*. 14 de las muestras volvieron a reafirmarse como verdaderos positivos frente a *E. coli*, lo que les convertía en el 52% del total.

Tabla 7. Resumen de resultados en los ensayos de antibiosis de comprobación				
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	Ambos	Total
Positivos	71	14	7	78
Negativos	76	13	8	81
Porcentaje positivos	48%	52%	46,67%	49,06%
Totales	147	27	15	159

En el anexo II se recogen los resultados todas muestras en las antibiosis de comprobación realizadas. Las muestras están nombradas siguiendo las normas internas de MicroMundo a nivel nacional: X/YY ZZ-W (iniciales de → Provincia/colegio grupo-muestra). Por ejemplo: Z/CA 08-6 (Provincia de Zaragoza/Colegio Alemán Grupo 08- muestra 6). Las iniciales de los colegios en los que se llevó a cabo el proyecto son:

- CA: Colegio Alemán
- RM: Colegio Rosa Molas
- SAL: Colegio Salesianos

- VAL: Colegio Valdespartera
- GO: Colegio Goya

Para descartar todas las muestras que habían dado negativo en la primera antibiosis se ensayaron de nuevo en medio M-H. Ninguna de las muestras analizadas dio positivo por lo que se descartaron de cara a futuros ensayos.

Se hizo un ensayo de antibiosis por duplicado con estas muestras, mostrando que no se repetían los resultados con el fin de ver la fiabilidad de los primeros datos. De los 78 que inicialmente habían dado positivos en *B. subtilis*, se corroboraron 42 en la primera repetición de antibiosis y 51 en la segunda. Para *E. coli* también se iba a probar este ensayo, pero por las circunstancias del estado de alarma no pudo realizarse. Los resultados están en el Anexo II (2ª y 3ª columna).

Comprobación tras la congelación de las muestras

Bastantes muestras que habían sido congeladas no reprodujeron resultados positivos en las antibiosis de comprobación, por lo que se sospechó que la congelación podría influir.

Para saber si éste era un factor determinante que pudiera afectar a las bacterias se necesitaba que no estuvieran congeladas previamente. Se emplearon las muestras aisladas en las prácticas de Biotecnología en Microbiología al no haber sido congeladas. Esas muestras estaban en medio líquido, se cogió 1ml de cada una y se congelaron en glicerol 15% a -20°C.

Se llevó a cabo una antibiosis con *B. subtilis* como bacteria testigo, dado que era la que habían empleado en las prácticas de Microbiología. Se tenía un total de 15 muestras en medio líquido. Las muestras congeladas se sembraron sobre medio sólido BHI-A y las que no había sido congeladas estaban en el medio líquido se emplearon 100µl para realizar la antibiosis. Los resultados mostrados en el Anexo II y III son los correspondientes a las muestras congeladas. Ninguna de las muestras no congeladas dio resultado positivo.

Actividad frente a bacterias patógenas

78 muestras que habían confirmado su positivo en alguna repetición en *B. subtilis* o bien en *E. coli*, se ensayaron frente a otras bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium bovis BCG* (la identificación de las cepas está en Materiales y Métodos). Son un conjunto de microorganismos que causan los mayores problemas de resistencia a antibióticos. Los resultados por muestras con la valoración de su grado de inhibición están en el Anexo III.

Tabla 8. Resultados de las antibiosis realizadas ante bacterias patógenas					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
Nº muestras probadas	78	78	78	78	78
Nº muestras positivas	23	4	25	9	9
% muestras positivas	29,5	5,13	32,05	11,54	11,54

Este ensayo se realizó con BCG no se obtuvieron resultados porque las bacterias crecieron tanto que ocuparon la placa y no dejaron crecer a *M. bovis BCG*.

Este mismo experimento se iba a realizar filtrando las muestras que habían dado positivo en *M. smegmatis*, pero debido al estado de alarma no pudo realizarse el ensayo.

Comprobación de la influencia de los medios

No se observó un patrón claro que permitiese decir qué medio de cultivo sólido era mejor para comprobar los positivos, sino que se vio que era el propio microorganismo el que le resultaba más beneficiado en un medio u otro.

Se realizó un ensayo siguiendo el esquema de la figura 7 para determinar la influencia del medio de cultivo. Las muestras empleadas son aquellas que había sido positivas en la producción de antibióticos frente a los dos microorganismos testigo no patógenos (*B. subtilis* y *E. coli*).

4 de estas antibiosis son sobre medios sólidos BHI-A y M-H, donde se utilizan colonias de los microorganismos productores. A su vez, se realiza el mismo ensayo, pero en lugar de emplear las colonias de los microorganismos productores, éstos crecieron en medio líquido LB y se emplean los sobrenadantes, de los que se pusieron 20µl sobre discos de antibiosis. La razón de este tipo de antibiosis es ver si las recogiendo el sobrenadante y poniéndolo sobre los discos se observarían los mismos resultados (por ejemplo, en *M. bovis* BCG se tiene que hacer sobre discos).

El ensayo queda reflejado en el esquema de la Figura 7, donde se muestran los microorganismos testigo empleados:

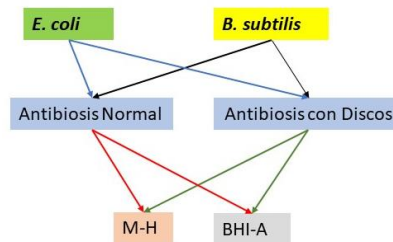


Figura 7. Esquema para comprobar la influencia del medio sobre el microorganismo productor

Tabla 9. Resultados de las antibiosis realizadas para comprobar la influencia del medio								
Antibiosis\muestra	Z/CA 07-16	Z/RM 1-1	Z/VAL 03-19	Z/VAL 05-20	Z/VAL 06-15	Z/VAL 16-15	Z/VAL 21-1C	
BHI-A Normal (<i>B.sub</i>)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
M-H Normal (<i>B.sub</i>)	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
BHI-A Normal (<i>E. coli</i>)	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
M-H Normal (<i>E. coli</i>)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
BHI-A discos (<i>B. sub</i>)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
M-H discos (<i>B. sub</i>)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	
BHI-A discos (<i>E. coli</i>)	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	
M-H discos (<i>E. coli</i>)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	

Esto quiere decir que no es el medio quien determina mejores resultados, sino que depende del microorganismos, sin que podamos predecir en qué medio será más eficaz. Lo que sí se ve es que ensayando con la colonia y no con discos, se observarán más probablemente los resultados positivos.

Comprobación realizada con la difusión del sobrenadante en el agar

Por lo general, los resultados obtenidos con respecto a las antibiosis de verificación de positivos se siguen observando las inhibiciones, aunque sus halos son de menor diámetro. Este hecho no se da en la muestra Z/RM 1-1, donde el halo de inhibición es más grande que en otros ensayos.

En cuanto a las muestras que fueron filtradas, se aprecia que el halo de inhibición es más nítido y grande que aquellas muestras que no fueron filtradas, aunque la diferencia no sea muy grande.

Análisis de la PCR

En este ensayo únicamente se llegó a comprobar la viabilidad de todo el proceso. Se comprobó que el proceso funcionaba, debido a la observación de una única banda por muestra analizada, lo que significa que habían amplificado correcta y específicamente la región de interés.

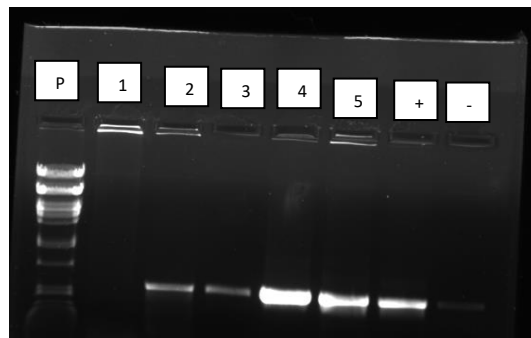


Figura 8. Gel de Agarosa 1% con Bromuro de Etidio. Productos de amplificación de la PCR en la comprobación de Oligonucleótidos. Por carriles, las muestras son, de izquierda a derecha:

P. Marcador de pesos moleculares; 1.Z/CA 01-8; 2. Z/CA 07-16; 3. Z/CA 09-21; 4. Z/RM 1-1; 5. Z/RM 1-2; (+) Control positivo; (-) Control negativo

En cuanto al control negativo, tal como se ve en la Figura 8, se aprecia una banda de menor intensidad.

Discusión

A pesar de no poder haber realizado todos los ensayos previstos, se pudieron conseguir un gran número de resultados.

Los datos obtenidos de las encuestas son de utilidad. Comparando con los datos de la Unión Europea los de la encuesta de este trabajo se ve cómo el porcentaje de gente que acaba el tratamiento antibiótico desciende entre el 5% y el 10% (dependiendo si han recibido estudios universitarios o no), el 84% de los españoles según el Eurobarómetro lo terminan, según nuestra propia encuesta, lo finalizan el 76% de los universitarios y el 72% de los no universitarios. El problema puede ser mayor de lo que se piensa.

Mayor proporción de universitarios han oído hablar de la resistencia a antibióticos respecto a los no universitarios, pero en ambos casos ninguno supera el 40% respondiendo la definición correcta y única del problema. En los no universitarios se queda en el 22%, por lo que, aunque se hayan llevado a cabo campañas, no se han producido para toda la población por igual y no han sido efectivas.

No se han promocionado muchos proyectos tan importantes como MicroMundo pese a que el 31% de las propuestas de solución es dar mayor difusión, incluso ir a los centros educativos.

En la recogida de muestras en los colegios, se hicieron los análisis con dos microorganismos testigo, un Gram positivo (*B. subtilis*) y un Gram negativo (*E. coli*). Era de interés ensayar con una Gram negativa, porque las Gram negativas son las bacterias frente a las que se encuentran antibióticos con mayor dificultad³³.

Los medios utilizados en el aislamiento en los colegios y en las primeras antibiosis de comprobación fue BHI-A, un medio rico en nutrientes, que facilita el crecimiento de bacterias aerobias. Como se comprobó que las muestras crecían bien en este medio sólido y habían dado resultados positivos, se decidió volver a usar en las antibiosis de comprobación.

Sin embargo, en las primeras comprobaciones hechas con medio BHI-A, tan solo el 35,3% de las muestras analizadas verificaron que fuesen positivas. Se pensó que podía ser debido en parte a la congelación y también al medio. A partir de la segunda sesión de comprobación se empleó el medio sólido M-H, un medio pobre en nutrientes.

Los antibióticos son productos secundarios, las bacterias lo producen en la fase estacionaria de crecimiento, donde los nutrientes comienzan a escasear y es la causa de que las bacterias no aumentan en número. Con el medio M-H se intentó recrear este ambiente para comprobar si de esta forma el porcentaje de verificación aumentaba. Se puede observar en el anexo IV que muestras fueron probadas primero sobre BHI-A y cuáles sobre M-H.

La primera antibiosis realizada con medio M-H dio una mayor cantidad de positivos respecto del medio BHI-A, por lo que se quiso comprobar si el medio era realmente el factor determinante en la producción de antibióticos. Los ensayos de comprobación de influencia del medio, como se muestra en los resultados, determinaron que el medio no era por sí mismo un factor determinante.

En otros ensayos de repetición de antibiosis con las muestras que habían dado positivo anteriormente, se vio que no todas repetían los resultados (y al hacerlo por triplicado, en algunas no se repetía en ninguna de las repeticiones).

Para comprobar si la influencia de las condiciones de almacenamiento jugaba algún papel relevante en la producción de antibióticos, se diseñó un experimento a través del cual se realizaban diferentes pases a las muestras y también se guardaban a temperaturas diferentes, como se muestra en el apartado de "Plan de trabajo a seguir". En las muestras de los colegios se observaron grandes halos de inhibición que no se vieron en las antibiosis de comprobación.

Podría ser que los procesos de congelación-descongelación produjesen un aletargamiento de los microorganismos y por lo tanto les costase más producir los antibióticos. Para refutar esta teoría se diseñó un ensayo de influencia de la congelación/descongelación, similar al realizado con las muestras de las prácticas de Unizar, pero pasando de medio líquido a sólido en primer lugar las muestras antes de realizar la antibiosis.

Los resultados de las antibiosis de bacterias patógenas muestran que:

- ➔ Todas las muestras positivas para 4 patógenos habían dado positivo en las tres antibiosis de comprobación.
- ➔ Todas las muestras positivas para 3 patógenos habían dado positivo en las tres antibiosis de comprobación.
- ➔ El 85% de las muestras positivas para 2 patógenos habían dado positivo en las tres antibiosis de comprobación y el 15% lo había hecho en dos antibiosis de comprobación.
- ➔ El 39% de las muestras positivas para 1 patógeno habían dado positivo en las tres antibiosis de comprobación, el 31% lo había hecho en dos antibiosis y el 30% sólo en la primera.
- ➔ El 39% de las muestras que no fueron positivas para ningún patógeno había dado positivo en las 3 antibiosis de comprobación, el 29% los había hecho en dos antibiosis y el 32% sólo en la primera.

Hay una correlación en que los microorganismos que habían dado positivo en mayor número de antibiosis, el halo de inhibición en las bacterias patógenas era más grande, como se pueden ver en las tablas del Anexo III. Esto puede significar que estas muestras son buenos productores de antibióticos.

Se quería comprobar más características de la producción de antibióticos, como si la presencia del microorganismo favorecía a ver un efecto inhibitorio en el ensayo de difusión del sobrenadante, donde se vio, por ejemplo, que Z/RM 1-1 producían un halo inhibitorio bastante grande, mientras que en otros ensayos con crecimiento de la muestra, estos halos eran mínimos, algo que podría suceder lo mismo con otras muestras.

En el ensayo de difusión del sobrenadante se observó también que aquellas muestras que habían sido filtradas daban halos positivos mayores.

Por último, el ensayo realizado para comprobación del proceso PCR se validó para trabajar posteriormente con de esta forma al dar una única banda en el gel de agarosa 1% una vez que corrieron los productos. Por lo tanto, aquellos productos que se secuenciasen serían únicos de las 16S rRNA y permitirían identificar las bacterias de las muestras.

Plan de trabajo que se hubiera seguido

Dadas las circunstancias, no se han podido llevar a cabo todos los experimentos diseñados, por lo que se exponen a continuación aquellos que no se hicieron

Antibiosis frente a SARM

Con las muestras positivas frente a *Staphylococcus aureus*, se quería hacer una antibiosis frente a *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM), dado que es una de las principales bacterias causantes de infecciones resistentes a antibióticos y una de las más habituales que se contagian en hospitales.

Identificación

Se pensó en la identificación de aquellos microorganismos que habían dado resultados positivos frente a un mayor número de bacterias patógenas, mediante los productos de la amplificación de la secuencia 16S del rRNA. Los primers que se iban a emplear son los que anteriormente se habían comprobado en los ensayos descritos.

En varias de las muestras aisladas de los colegios se observó una bacteria filamentosa, con características peculiares, creando una forma enramada. No era positiva ante ningún microorganismo, aunque sí muy prevalente. Ésta también se iba a secuenciar para determinar qué era.

Todas estas secuencias, una vez obtenidas, se identificarían con la aplicación BLAST que reconoce las ya conocidas e indicaría qué microorganismo es el de la muestra, o en algún caso, si hay alguno desconocido, indicando su lugar en el árbol filogenético.

Repetición de ensayo con *M. bovis* BCG

El ensayo no salió bien, por lo que se iba a realizar la antibiosis frente a *M. bovis* BCG, empleando únicamente aquellos microorganismos que habían dado resultados positivos frente a *M. smegmatis* (dada su relación) y filtrando el sobrenadante, evitando de esta forma que crecieran las colonias de los microorganismos, inhibiendo el crecimiento del césped bacteriano.

Las muestras frente a las que se probaría BCG crecen en medio LB líquido durante 6 días a 25°C. Posteriormente se realizaría el ensayo. La incubación con BCG se desarrollaría a 25°C durante 2 semanas.

Influencia de la temperatura

Es posible que los microorganismos tengan una temperatura óptima para la producción de antibióticos, por lo que se iba a realizar el crecimiento en medio líquido de las cepas en un intervalo de temperaturas entre 20°C y 36°C, tras los cuales se cogerían los sobrenadantes, se filtrarían y se harían ensayos de antibiosis con discos de antibiosis.

A su vez, la temperatura también puede afectar a los resultados, por lo que se realizarían antibiosis entre los mismos intervalos de 20°C y 36°C. La hipótesis es que puede haber una temperatura óptima de producción de antibiótico, pero también es posible que haya una temperatura óptima de actuación, lo cual se determinaría con este ensayo.

Influencia de las condiciones de almacenamiento

Es probable que las condiciones en las que se conservan las muestras pudieran influir en la mayor o menor producción de antibióticos. Para comprobarlo se harían varios pases, variando también la temperatura de almacenamiento entre los distintos ensayos.

Un ensayo organizado en 4 semanas para comprobar cómo afecta el número de pases de un microorganismo a la hora de producir el antibiótico.

Se sacarían las muestras el día -1 del congelador a -20°C y se ponen sobre medio BHI-A a crecer en 24h a 30°C, haciendo este paso por duplicado. Al día siguiente se procedería a hacer el ensayo de antibiosis con los dos duplicados. Las muestras que están crecidas en medio sólido se almacenan una a 4°C y otra a temperatura ambiente sobre la poyata.

Al cabo de una semana se procedería a hacer una pase de cada una a medio BHI-A de nuevo y se harían antibiosis de todos los casos. Se almacenaría las correspondientes de nuevo a 4°C o temperatura ambiente. Cada semana se haría otro pase y repetición de antibiosis hasta la cuarta semana y se vería cómo influyen estas circunstancias y cuál de ellas es óptima para la producción de antibióticos.

Conclusiones

1. La sociedad reclama más información, que se de en edades tempranas de aprendizaje y que se conozca más y mejor el problema de la resistencia a antibióticos.
2. Un grupo numeroso de la población admite haber oído algo al respecto de la resistencia a antibióticos, pero pocos de ellos son capaces de definirlo correctamente independientemente del nivel de estudios.
3. Aquellos microorganismos que tienen amplia reproducibilidad producen antibióticos frente a un mayor número de bacterias patógenas y con halos de inhibición más grandes.
4. El medio de cultivo sólido no es determinante para la producción de antibióticos.
5. Hay microorganismos en el que el crecimiento de la colonia no permite observar correctamente la inhibición que producen en la bacteria testigo, pero si se trabaja con el sobrenadante, los halos son más claros, como se observa con la muestra Z/RM 1-1 en el ensayo de difusión del sobrenadante.
6. Es necesario utilizar filtrados de sobrenadantes para ensayar antibiosis frente a patógenos de crecimiento lento como *M. bovis* BCG.
7. Las muestras Z/VAL 01-24 y Z/VAL 05-20 son interesantes para seguir trabajando con ellas. La muestra Z/VAL 21-1C ha demostrado servir como buen control positivo tanto para *B. subtilis* como *E. coli*.

Conclusions

1. Society demands more information, that it be given at an early learning age and that problem of resistance to antibiotics be known more and better.
2. A large group of the population admits to having heard something about antibiotic resistance, but few of them can define it correctly regardless of educational level.
3. Those microorganisms that have broad reproducibility produce antibiotics against a greater number of pathogenic bacteria and with larger inhibition halos.
4. The solid culture medium is not decisive to produce antibiotics.
5. There are microorganisms in which the growth of the colony does not allow correctly observe the inhibition that they produce in the control bacteria, but if one works with the supernatant, the halos are clearer, as observed with sample Z/RM 1-1 in the supernatant diffusion assay.
6. It is necessary to use supernatant filtrates to test antibiosis against slow growing pathogens such as *M. bovis* BCG.
7. Samples Z/VAL 01-24 and Z/VAL 05-20 are interesting in continue working with. Sample Z/VAL 21-1C has been shown to serve as good positive control for both *B. subtilis* and *E. coli*.

Bibliografía

1. [Internet]. Animalshealth.es. 2020 [cited 26 May 2020]. Available from: <https://www.animalshealth.es/fileuploads/user/en%20Espana.pdf>
2. [Internet]. Apps.who.int. 2020 [cited 25 May 2020]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258965/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf;jsessionid=6040F8969CD011C5E148F60412941EA7?sequence=1>
3. Aprendizaje-Servicio I Roser Batlle- Blog de aprendizaje-servicio de Roser Batlle [Internet]. Roserbatlle.net.2020 [cited 25 May 2020]. Available from: <https://roserbatlle.net/aprendizaje-servicio/>
4. Barka E, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [Internet]. 2015 [cited 25 May 2020];80(1):1-43. Available from: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15.Address>
5. Blaser, M. J. (2014). *Missing Microbes: How the Overabuse of Antibiotics is Fueling our Modern Plagues*. (DEBATE, Ed.) (2019th ed.). DEBATE. ISBN: 978-84-9992-890-6
6. Camcioglu Y, Sener Okur D, Aksaray N, Darendeliler F, Hasanoglu E. Factors affecting physicians' perception of the overuse of antibiotics [Internet]. 2020 [cited 26 May 2020]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.01.006>
7. Caruso J, Rowland K, Lovelace M, Saunders M, Israel N. Citizen Science: The Small World Initiative Improved Lecture Grades and California Critical Thinking Skills Test Scores of Nonscience Major Students at Florida Atlantic University. *Journal of Microbiology & Biology Education* [Internet]. 2016 [cited 26 May 2020];17(1):156-162. Available from: <https://www.asmscience.org/content/journal/jmbe/10.1128/jmbe.v17i1.1011>
8. Charlop-Powers Z, Pregitzer C, Lemetre C, Ternei M, Maniko J, Hover B et al. Urban park soil microbiomes are a rich reservoir of natural product biosynthetic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2016 [cited 26 May 2020];113(51):14811-14816. Available from: <https://www.pnas.org/content/113/51/14811>
9. Civjan., Natanya. *Natural Products in Chemical Biology*. NJ, USA: John Wiley & Sons; 2012.
10. Cragg G, Newman D. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [Internet]. 2013 [cited 26 May 2020];1830(6):3670-3695. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416513000512?via%3DIihub>
11. D. van Soolingen, P. de Haas, H. van Doorn, E. Kuijper, H. Rinder and M. Borgdorff, "Mutations at Amino Acid Position 315 of thekatGGene Are Associated with High-Level Resistance to Isoniazid, Other Drug Resistance, and Successful Transmission ofMycobacterium tuberculosisin The Netherlands", *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 182, no. 6, pp. 1788-1790, 2000. Available: <https://doi.org/10.1086/317598>
12. Davis E, Sloan T, Aurelius K, Barbour A, Bodey E, Clark B et al. Antibiotic discovery throughout the Small World Initiative: A molecular strategy to identify biosynthetic gene clusters involved in antagonistic activity. *MicrobiologyOpen* [Internet]. 2017 [cited 26 May 2020];6(3):e00435. Available from: <https://doi.org/10.1002/mbo3.435>
13. DeLuca M, King R, Morsy M. Bioprospecting saline gradient of a Wildlife Sanctuary for bacterial diversity and antimicrobial activities. *BMC Research Notes* [Internet]. 2017 [cited 26 May 2020];10(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2711-9>
14. Durand G, Raoult D, Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* [Internet]. 2019 [cited 26 May 2020];53(4):371-382. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>

15. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929. [Internet]. PubMed Central (PMC). 2020 [cited 25 May 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566493/>
16. H. Ikeda, K. Shin-ya and S. Omura, "Genome mining of the Streptomyces avermitilis genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 41, no. 2, pp. 233-250, 2014. [Accessed 16 June 2020]. Available: <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1327-x>
17. Howell L. Global risks 2013: octava edición [Internet]. Ieee.es. 2013 [cited 26 May 2020]. Available from: http://www.ieee.es/Galerias/fichero/docs_informativos/2013/DIEEEI08-2013_InformeRiesgosGlobales2013_FEM_MJC.pdf
18. J. Pagès, C. James and M. Winterhalter, "The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria", *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, no. 12, pp. 893-903, 2008. Available: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>
19. J. Suarez, K. Ranguelova, J. Schelvis and R. Magliozzo, "Antibiotic Resistance in Mycobacterium tuberculosis", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 24, pp. 16146-16155, 2009. Available: <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.005546> [Accessed 16 June 2020].
20. Katz L, Baltz R. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [Internet]. 2016 [cited 26 May 2020];43(2-3):155-176. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>
21. L. McMurry, R. Petrucci and S. Levy, "Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia coli.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 77, no. 7, pp. 3974-3977, 1980. Available: <https://doi.org/10.1073/pnas.77.7.3974>
22. La miel puede combatir superbacterias [Internet]. BBC News Mundo. 2011 [cited 26 May 2020]. Available from: <https://www.bbc.com/mundo/noticias/2011/04/110413>
23. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. Who.int. 2020 [cited 25 May 2020]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
24. Lau, P. (2017). Small World Initiative: Educando para combatir la Resistencia a los antibióticos, 58–64.
25. Letosa J. Antimicrobianos naturales [Internet]. Dialnet. 2000 [cited 26 May 2020]. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=202443>
26. Martinez J. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies* [Internet]. 2014 [cited 26 May 2020];11:33-39. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
27. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance, 1–24. Available from: <https://doi.org/10.1128/9781555819286.ch17>
28. NETTLES C, BAREFOOT S. Biochemical and Genetic Characteristics of Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection* [Internet]. 1993 [cited 26 May 2020];56(4):338-356. Available from: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-56.4.338>
29. Newman D, Cragg G. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* [Internet]. 2016 [cited 26 May 2020];79(3):629-661. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
30. Our Approach — Small World Initiative [Internet]. Small World Initiative. 2020 [cited 25 May 2020]. Available from: <http://www.smallworldinitiative.org/about>
31. Our Network [Internet]. Tiny Earth. 2020 [cited 25 May 2020]. Available from: <https://tinyearth.wisc.edu/about-us/our-network/>
32. Pathak A, Kett S, Marvasi M. Resisting Antimicrobial Resistance: Lessons from Fungus Farming Ants. *Trends in Ecology & Evolution* [Internet]. 2019 [cited 26 May 2020];34(11):974-976. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.007>

33. Peterson E, Kaur P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2018 [cited 26 May 2020];9. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
34. Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2020 [cited 26 May 2020]. Available from: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/es/>
35. Plan nacional frente a la resistencia a antibióticos 2019-2021 [Internet]. Resistenciaantibioticos.es. 2020 [cited 26 May 2020]. Available from: http://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/pran_2019-2021_0.pdf?file=1&type=node&id=497&force=0
36. Report, G. Antimicrobial Resistance [Internet]. Apps.who.int. 2014 [cited 26 May 2020]. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf
37. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2020 [cited 25 May 2020]. Available from: https://www.who.int/topics/antimicrobial_resistance/es/
38. Sanford N. [Internet]. CuidatePlus. 2004 [cited 26 May 2020]. Available from: <https://cuidateplus.marca.com/alimentacion/nutricion/2004/10/20/miel-antibiotico-natural-3301.html>
39. Sempere García J, Zorrilla Navarrete A, Vázquez Estévez C. Transmisión del problema de la resistencia a los antibióticos a dos niveles educativos en el contexto del proyecto SWI Micromundo: evaluación por Socrative. *Aula, Museos y Colecciones de Ciencias Naturales*. 2019;:177-184. Available from: <https://doi.org/10.29077/aula/6/sempere>
40. Tomillo. Propiedades, beneficios y contraindicaciones - La Botica de Verena [Internet]. La Botica de Verena. 2020 [cited 26 May 2020]. Available from: <https://www.laboticadeverena.com/tomillo-uno-de-los-mejores-antibioticos-naturales/>
41. Un informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos [Internet]. Who.int. 2020 [cited 25 May 2020]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/detail/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>
42. WHO | World Health Day 2011: policy briefs [Internet]. Who.int. 2011 [cited 26 May 2020]. Available from: <http://www.who.int/world-health-day/2011/policybriefs/en/index.html>

Anexo I. Abreviaturas

- **AEMPS:** Asociación Española del Medicamento y Productos Sanitarios
- **AME:** Aminoglycoside Modifying Enzyme (Enzimas Modificadoras de Aminoglicósidos)
- **BCG:** Bacillus Calmette-Guérin
- **BHI-A:** Brain Heart Infusion Agar (medio de cultivo)
- **ESKAPE:** Grupo bacteriano formado por las especies: *E. coli*- *Staphylococcus aureus*-
Klebsiella pneumoniae- *Acinetobacter baumannii*- *Pseudomonas aeruginosa*-
Enterobacter
- **M-H:** Mueller-Hinton (medio de cultivo)
- **MM:** MicroMundo (Versión española)
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **ON:** Over Night (lenguaje científico para expresar durante toda la noche)
- **PCR:** Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
- **PRAN:** Plan Nacional frente a la Resistencia de Antibióticos
- **RPM:** Revoluciones por minuto
- **RNA:** Ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
- **rRNA:** RNA ribosómico
- **SARM:** *Staphylococcus aureus* Resistente a *Meticilina*
- **SEM:** Sociedad Española de Microbiología
- **SFB:** Suero Fetal Bovino
- **SWI:** Small World Initiative (Versión original estadounidense)
- **SWIPI:** Small World Initiative Partner Instructor
- **SWITA:** Small World Initiative Teaching Assistant
- **TFG:** Trabajo de Fin de Grado
- **TGH:** Transferencia genética horizontal
- **TyE:** Tiny Earth
- **UE:** Unión Europea

Anexo II. Antibiosis de comprobación

ID	B.sub	B. sub	B.sub	E.coli	ID	B.sub	B. sub	B.sub	E.coli
Z/CA-01-8	Sí	Sí	Sí	No	Z/VAL-21-2B	No	NE	NE	NE
Z/CA-07-16	Sí	Sí	Sí	Sí	Z/VAL-21-3B	No	NE	NE	NE
Z/CA-09-21	Sí	No	Sí	No	Z/VAL-21-5D	No	NE	NE	NE
Z/RM-1-1	Sí	No	Sí	Sí	Z/RM-1-7	No	NE	NE	NE
Z/RM-1-2	Sí	No	Sí	No	Z/RM-1-9	No	NE	NE	NE
Z/RM-2-7	Sí	Sí	Sí	No	Z/RM-1-11	Sí	No	No	NE
Z/RM-2-12	Sí	Sí	Sí	No	Z/RM-1-12	Sí	No	Sí	NE
Z/RM-3-11	No	NE	NE	No	Z/RM-1-13	Sí	No	Sí	NE
Z/RM-4-8	Sí	No	No	No	Z/RM-1-14	No	NE	NE	NE
Z/CA-01-4	Sí	Sí	Sí	NE	Z/RM-1-15	Sí	Sí	Sí	NE
Z/CA-01-5	No	NE	NE	NE	Z/RM-1-16	Sí	Sí	Sí	NE
Z/CA-01-14	No	NE	NE	NE	Z/RM-1-18	Sí	Sí	Sí	NE
Z/CA-01-25	No	NE	NE	NE	Z/RM-1-22	Sí	Sí	Sí	NE
Z/CA-01-28	Sí	Sí	No	NE	Z/RM-1-23	No	NE	NE	NE
Z/CA-02-32	No	NE	NE	NE	Z/RM-1-24	No	NE	NE	NE
Z/CA-02-36	No	NE	NE	NE	Z/RM-2-2	No	NE	NE	NE
Z/CA-03-21	No	NE	NE	NE	Z/RM-2-14	No	NE	NE	NE
Z/CA-03-27	No	NE	NE	NE	Z/RM-3-4	No	NE	NE	NE
Z/CA-03-31	No	NE	NE	NE	Z/RM-3-8	No	NE	NE	NE
Z/CA-05-23	No	NE	NE	NE	Z/RM-3-10	No	NE	NE	NE
Z/CA-06-21	Sí	Sí	Sí	NE	Z/RM-3-13	No	NE	NE	NE
Z/CA-07-23	No	NE	NE	NE	Z/RM-4-6	No	NE	NE	NE
Z/CA-07-32	No	NE	NE	NE	Z/RM-4-17	Sí	No	No	NE
Z/CA-08-13	No	NE	NE	NE	Z/RM-4-21	No	NE	NE	NE
Z/CA-08-25	No	NE	NE	NE	Z/GO-1-4	No	NE	NE	NE
Z/CA-10-25	No	NE	NE	NE	Z/GO-1-8	No	NE	NE	NE
Z/CA 10-28	Sí	Sí	Sí	NE	Z/GO-07-10	Sí	Sí	Sí	NE
Z/CA-10-29	Sí	Sí	Sí	NE	Z/VAL-01-3	Sí	Sí	Sí	NE
Z/SAL-02-7	No	NE	NE	NE	Z/VAL-01-7	Sí	Sí	Sí	NE
Z/SAL-02-17	No	NE	NE	NE	Z/VAL-01-9	Sí	No	No	NE
Z/SAL-02-20	No	NE	NE	NE	Z/VAL-01-11	Sí	Sí	Sí	NE
Z/SAL-03-20	No	NE	NE	NE	Z/VAL-01-12	Sí	No	No	NE
Z/SAL 06-6	Sí	No	No	NE	Z/VAL-01-13	Sí	Sí	Sí	NE
Z/SAL-06-23	No	NE	NE	NE	Z/VAL-01-15	Sí	Sí	Sí	NE
Z/SAL-12-7	No	NE	NE	NE	Z/VAL-01-17	Sí	Sí	Sí	NE
Z/SAL-12-9	No	NE	NE	NE	Z/VAL-01-21	Sí	No	No	NE
Z/SAL-12-17	No	NE	NE	NE	Z/VAL-01-24	Sí	Sí	Sí	NE
Z/SAL-12-19	No	NE	NE	NE	Z/VAL-02-15	No	NE	NE	NE
Z/SAL-13-6	No	NE	NE	NE	Z/VAL-02-22	Sí	Sí	Sí	NE
Z/SAL-14-2	Sí	No	No	NE	Z/VAL-02-24	No	NE	NE	NE
Z/SAL-14-7	No	NE	NE	NE	Z/VAL-02-25	Sí	Sí	Sí	NE
Z/SAL-15-1	No	NE	NE	NE	Z/VAL-04-3	Sí	Sí	Sí	NE
Z/SAL-15-2	No	NE	NE	NE	Z/VAL-03-4	No	NE	NE	NE

Caracterización de microorganismos productores de antibióticos aislados en el proyecto
Micromundo-UZ | Alumno: Asier Dominguez San Pedro

ID	B.sub	B. sub	B.sub	E.coli	ID	B.sub	B. sub	B.sub	E.coli
Z/VAL-03-15	Sí	No	Sí	No	Z/UZ-B2-11	Sí	Sí	Sí	NE
Z/VAL-03-22	No	NE	NE	NE	Z/UZ-B3-17	Sí	Sí	Sí	NE
Z/VAL-04-7	No	NE	NE	NE	Z/UZ-B4-4	Sí	Sí	Sí	NE
Z/VAL-04-8	No	NE	NE	NE	Z/UZ-B4-20	Sí	No	No	NE
Z/VAL-04-9	Sí	No	No	NE	Z/UZ-B4-20	No	NE	NE	NE
Z/VAL-04-13	Sí	No	No	NE	Z/UZ-C1-12	No	NE	NE	NE
Z/VAL-04-14	NE	NE	NE	NE	Z/UZ-C1-15	No	NE	NE	NE
Z/VAL-04-19	NE	NE	NE	NE	Z/UZ-C2-11	No	NE	NE	NE
Z/VAL-05-23	NE	NE	NE	NE	Z/UZ-C2-24	No	NE	NE	NE
Z/VAL-06-5	Sí	No	No	NE	Z/UZ-C3-20	No	NE	NE	NE
Z/VAL-06-6	No	NE	NE	NE	Z/UZ-C4-7	No	NE	NE	NE
Z/VAL-08-11	Sí	No	No	NE	Z/UZ-C4-23	No	NE	NE	NE
Z/VAL-08-23	Sí	No	Sí	NE	Z/CA-06-23	NE	NE	NE	No
Z/VAL-11-3	Sí	No	Sí	NE	Z/CA-06-24	NE	NE	NE	Sí
Z/VAL-11-17	Sí	No	Sí	NE	Z/CA-03-16	NE	NE	NE	No
Z/VAL-11-18	Sí	No	Sí	NE	Z/SAL-06-12	NE	NE	NE	Sí
Z/VAL-12-3	Sí	No	Sí	NE	Z/RM-03-6	NE	NE	NE	Sí
Z/VAL-12-10	Sí	No	Sí	NE	Z/RM-4-3	NE	NE	NE	No
Z/VAL-12-18	Sí	No	No	NE	Z/VAL-03-14	NE	NE	NE	Sí
Z/VAL-12-21	Sí	Sí	No	NE	Z/VAL-03-18	NE	NE	NE	No
Z/VAL-12-23	Sí	No	No	NE	Z/VAL-03-21	NE	NE	NE	Sí
Z/VAL-14-7	No	NE	NE	NE	Z/VAL-08-15	NE	NE	NE	No
Z/VAL-14-9	Sí	No	No	NE	Z/VAL-14-11	NE	NE	NE	Sí
Z/VAL-15-4	Sí	Sí	Sí	NE	Z/VAL-14-4	NE	NE	NE	Sí
Z/VAL-15-5	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/VAL-15-11	Sí	No	Sí	NE					
Z/VAL-16-23	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-16-25	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-18-3	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/VAL-18-7	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-18-22	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-19-5	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/VAL-19-7	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-19-19	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-20-8	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-21-1D	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-14-4	Sí	Sí	No	NE					
Z/VAL-03-8	Sí	Sí	Sí	No					
Z/VAL-03-19	Sí	Sí	Sí	Sí					
Z/VAL-05-20	Sí	Sí	Sí	Sí					
Z/VAL-06-15	Sí	Sí	Sí	Sí					
Z/VAL-16-15	Sí	Sí	Sí	Sí					
Z/VAL-21-1C	Sí	Sí	Sí	Sí					
Z/GO-1-14	No	NE	NE	NE					
Z/GO-2-6	No	NE	NE	NE					
Z/GO-2-7	No	NE	NE	NE					
Z/UZ-B1-20	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/UZ-B1-21	Sí	Sí	No	NE					
Z/UZ-B1-14	Sí	Sí	Sí	NE					

Sí= positivo
No= negativo
NE= No Ensayado

Anexo III. Resultados de Antibiosis Completos

ID	B.sub	B. sub	B.sub	E.coli	Entero	Kleb	S. aur	Smeg	P. aeru
Z/CA-01-8	Sí	Sí	Sí	No				(++)	(+)
Z/CA-07-16	Sí	Sí	Sí	Sí		(+++)	(++)	(+++)	
Z/CA-09-21	Sí	No	Sí	No		(++)			
Z/RM-1-1	Sí	No	Sí	Sí					
Z/RM-1-2	Sí	No	Sí	No					
Z/RM-2-7	Sí	Sí	Sí	No					
Z/RM-2-12	Sí	Sí	Sí	No	(+++)			(+++)	
Z/RM-3-11	No	No	No	No					
Z/RM-4-8	Sí	No	No	No		(++)			
Z/CA-01-4	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/CA-01-5	No	NE	NE	NE					
Z/CA-01-14	No	NE	NE	NE					
Z/CA-01-25	No	NE	NE	NE					
Z/CA-01-28	Sí	Sí	No	NE					
Z/CA-02-32	No	NE	NE	NE					
Z/CA-02-36	No	NE	NE	NE					
Z/CA-03-21	No	NE	NE	NE					
Z/CA-03-27	No	NE	NE	NE					
Z/CA-03-31	No	NE	NE	NE					
Z/CA-05-23	No	NE	NE	NE					
Z/CA-06-21	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/CA-07-23	No	NE	NE	NE					
Z/CA-07-32	No	NE	NE	NE					
Z/CA-08-13	No	NE	NE	NE					
Z/CA-08-25	No	NE	NE	NE					
Z/CA-10-25	No	NE	NE	NE					
Z/CA 10-28	Sí	Sí	Sí	NE				(+++)	
Z/CA-10-29	Sí	Sí	Sí	NE			(+++)		
Z/SAL-02-7	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-02-17	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-02-20	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-03-20	No	NE	NE	NE					
Z/SAL 06-6	Sí	No	No	NE		(+)			
Z/SAL-06-23	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-12-7	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-12-9	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-12-17	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-12-19	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-13-6	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-14-2	Sí	No	No	NE					
Z/SAL-14-7	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-15-1	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-15-2	No	NE	NE	NE					

ID	B.sub	B. sub	B.sub	E.coli	Entero	Kleb	S. aur	Smeg	P. aeru
Z/VAL-21-2B	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-21-3B	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-21-5D	No	NE	NE	NE					
Z/RM-1-7	No	NE	NE	NE					
Z/RM-1-9	No	NE	NE	NE					
Z/RM-1-11	Sí	No	No	NE			(+)		
Z/RM-1-12	Sí	No	Sí	NE			(+)		
Z/RM-1-13	Sí	No	Sí	NE			(+)		
Z/RM-1-14	No	No	No	NE					
Z/RM-1-15	Sí	Sí	Sí	NE			(+)		
Z/RM-1-16	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/RM-1-18	Sí	Sí	Sí	NE			(+)		
Z/RM-1-22	Sí	Sí	Sí	NE			(+)		
Z/RM-1-23	No	NE	NE	NE					
Z/RM-1-24	No	NE	NE	NE					
Z/RM-2-2	No	NE	NE	NE					
Z/RM-2-14	No	NE	NE	NE					
Z/RM-3-4	No	NE	NE	NE					
Z/RM-3-8	No	NE	NE	NE					
Z/RM-3-10	No	NE	NE	NE					
Z/RM-3-13	No	NE	NE	NE					
Z/RM-4-6	No	NE	NE	NE					
Z/RM-4-17	Sí	No	No	NE					
Z/RM-4-21	No	NE	NE	NE					
Z/GO-1-4	No	NE	NE	NE					
Z/GO-1-8	No	NE	NE	NE					
Z/GO-07-10	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/VAL-01-3	Sí	Sí	Sí	NE		(+++)			(+++)
Z/VAL-01-7	Sí	Sí	Sí	NE		(+++)			(+++)
Z/VAL-01-9	Sí	No	No	NE		(++)			
Z/VAL-01-11	Sí	Sí	Sí	NE		(+++)			(+)
Z/VAL-01-12	Sí	No	No	NE			(++)		
Z/VAL-01-13	Sí	Sí	Sí	NE		(+++)			(++)
Z/VAL-01-15	Sí	Sí	Sí	NE		(+++)			(+)
Z/VAL-01-17	Sí	Sí	Sí	NE		(++)	(++)	(+++)	
Z/VAL-01-21	Sí	No	No	NE		(++)			
Z/VAL-01-24	Sí	Sí	Sí	NE	(+)	(++)	(+++)	(+++)	
Z/VAL-02-15	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-02-22	Sí	Sí	Sí	NE		(++)			(+)
Z/VAL-02-24	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-02-25	Sí	Sí	Sí	NE		(+)	(++)	(+++)	
Z/VAL-04-3	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/VAL-03-4	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-03-15	Sí	No	Sí	NE					
Z/VAL-03-22	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-04-7	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-04-8	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-04-9	Sí	No	No	NE					
Z/VAL-04-13	Sí	No	No	NE					

ID	B.sub	B. sub	B.sub	E.coli	Entero	Kleb	S. aur	Smeg	P. aeru
Z/VAL-04-14	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-04-19	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-05-23	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-06-5	Sí	No	No	NE					
Z/VAL-06-6	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-08-11	Sí	No	No	NE		(++)			
Z/VAL-08-23	Sí	No	Sí	NE		(++)			
Z/VAL-11-3	Sí	No	Sí	NE			(++)		
Z/VAL-11-17	Sí	No	Sí	NE		(+)	(+)		
Z/VAL-11-18	Sí	No	Sí	NE		(++)	(+)		
Z/VAL-12-3	Sí	No	Sí	NE			(++)		
Z/VAL-12-10	Sí	No	Sí	NE					
Z/VAL-12-18	Sí	No	No	NE					
Z/VAL-12-21	Sí	Sí	No	NE					
Z/VAL-12-23	Sí	No	No	NE					
Z/VAL-14-7	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-14-9	Sí	No	No	NE					
Z/VAL-15-4	Sí	Sí	Sí	NE		(++)			
Z/VAL-15-5	Sí	Sí	Sí	NE		(+)			
Z/VAL-15-11	Sí	No	Sí	NE					
Z/VAL-16-23	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-16-25	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-18-3	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/VAL-18-7	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-18-22	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-19-5	Sí	Sí	Sí	NE	(+++)		(+++)		
Z/VAL-19-7	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-19-19	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-20-8	No	NE	NE	NE					
Z/VAL-21-1D	No	NE	NE	NE					
Z/SAL-14-4	Sí	Sí	No	NE	(+++)				
Z/VAL-03-8	Sí	Sí	Sí	No	(+++)		(+++)		
Z/VAL-03-19	Sí	Sí	Sí	Sí					
Z/VAL-05-20	Sí	Sí	Sí	Sí		(++)	(++)	(+++)	(++)
Z/VAL-06-15	Sí	Sí	Sí	Sí			(+)	(+++)	
Z/VAL-16-15	Sí	Sí	Sí	Sí		(+++)	(++)		(+)
Z/VAL-21-1C	Sí	Sí	Sí	Sí			(+++)		
Z/GO-1-14	No	NE	NE	NE					
Z/GO-2-6	No	NE	NE	NE					
Z/GO-2-7	No	NE	NE	NE					
Z/UZ-B1-20	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/UZ-B1-21	Sí	Sí	No	NE					
Z/UZ-B1-14	Sí	Sí	Sí	NE				(++)	
Z/UZ-B2-11	Sí	Sí	Sí	NE			(+++)		
Z/UZ-B3-17	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/UZ-B4-4	Sí	Sí	Sí	NE					
Z/UZ-B4-20	Sí	No	No	NE					
Z/UZ-B4-20	No	No	No	NE					
Z/UZ-C1-12	No	No	No	NE					

ID	B.sub	B. sub	B.sub	E.coli	Entero	Kleb	S. aur	Smeg	P. aeru
Z/UZ-C1-15	No	NE	NE	NE					
Z/UZ-C2-11	No	NE	NE	NE					
Z/UZ-C2-24	No	NE	NE	NE					
Z/UZ-C3-20	No	NE	NE	NE					
Z/UZ-C4-7	No	NE	NE	NE					
Z/UZ-C4-23	No	NE	NE	NE					
Z/CA-06-23	NE	NE	NE	No		(++)			
Z/CA-06-24	NE	NE	NE	Sí					
Z/CA-03-16	NE	NE	NE	No					
Z/SAL-06-12	NE	NE	NE	Sí		(+++)			
Z/RM-03-6	NE	NE	NE	Sí					
Z/RM-4-3	NE	NE	NE	No					
Z/VAL-03-14	NE	NE	NE	Sí					
Z/VAL-03-18	NE	NE	NE	No					
Z/VAL-03-21	NE	NE	NE	Sí					
Z/VAL-08-15	NE	NE	NE	No					
Z/VAL-14-11	NE	NE	NE	Sí			(++)		
Z/VAL-14-4	NE	NE	NE	Sí			(+++)		

Distancia borde del microorganismo-borde del halo (cm)

(+++) <0,2

(++) 0,1-0,2

(+) 0-0,1

Entero *Enterobacter faeci*
 Kleb *Klebsiella pneumoniae*
 S. aur *Staphylococcus aureus*
 Smeg *Mycobacterium smegmatis*
 P. aeru *Pseudomonas aeruginosa*

Si no aparece nada en el recuadro de bacteria patógena, no se ha ensayado ese Microorganismo o no se ha apreciado inhibición

Sí= positivo
 No= negativo
 NE= No Ensayado

*Anexo IV. Diferenciación primera antibiosis sobre
BHI o M-H*

ID	B.sub BHI-A	B. sub M-H	E. coli BHI-A	E. coli M-H
Z/CA-01-8	Sí		No	
Z/CA-07-16	Sí		Sí	
Z/CA-09-21	Sí		No	
Z/RM-1-1	Sí		Sí	
Z/RM-1-2	Sí		No	
Z/RM-2-7	Sí		No	
Z/RM-2-12	Sí		No	
Z/RM-3-11	No		No	
Z/RM-4-8	Sí		No	
Z/CA-01-4	Sí			
Z/CA-01-5	No			
Z/CA-01-14	No			
Z/CA-01-25	No			
Z/CA-01-28	Sí			
Z/CA-02-32	No			
Z/CA-02-36	No			
Z/CA-03-21	No			
Z/CA-03-27	No			
Z/CA-03-31	No			
Z/CA-05-23	No			
Z/CA-06-21	Sí			
Z/CA-07-23	No			
Z/CA-07-32	No			
Z/CA-08-13	No			
Z/CA-08-25	No			
Z/CA-10-25	No			
Z/CA 10-28	Sí			
Z/CA-10-29	Sí			
Z/SAL-02-7	No			
Z/SAL-02-17	No			
Z/SAL-02-20	No			
Z/SAL-03-20	No			
Z/SAL 06-6	Sí			
Z/SAL-06-23	No			
Z/SAL-12-7	No			
Z/SAL-12-9	No			
Z/SAL-12-17	No			
Z/SAL-12-19	No			
Z/SAL-13-6	No			
Z/SAL-14-2	Sí			
Z/SAL-14-7	No			
Z/SAL-15-1	No			
Z/SAL-15-2	No			

Caracterización de microorganismos productores de antibióticos aislados en el proyecto
Micromundo-UZ | Alumno: Asier Dominguez San Pedro

ID	B.sub BHI-A	B. sub M-H	E. coli BHI-A	E. coli M-H
Z/VAL-21-2B	No			
Z/VAL-21-3B	No			
Z/VAL-21-5D	No			
Z/RM-1-7	No			
Z/RM-1-9	No			
Z/RM-1-11	Sí			
Z/RM-1-12	Sí			
Z/RM-1-13	Sí			
Z/RM-1-14	No			
Z/RM-1-15	Sí			
Z/RM-1-16	Sí			
Z/RM-1-18	Sí			
Z/RM-1-22	Sí			
Z/RM-1-23	No			
Z/RM-1-24	No			
Z/RM-2-2	No			
Z/RM-2-14	No			
Z/RM-3-4	No			
Z/RM-3-8	No			
Z/RM-3-10	No			
Z/RM-3-13	No			
Z/RM-4-6	No			
Z/RM-4-17	Sí			
Z/RM-4-21	No			
Z/GO-1-4	No			
Z/GO-1-8	No			
Z/GO-07-10	Sí			
Z/VAL-01-3		Sí		
Z/VAL-01-7		Sí		
Z/VAL-01-9		Sí		
Z/VAL-01-11		Sí		
Z/VAL-01-12		Sí		
Z/VAL-01-13		Sí		
Z/VAL-01-15		Sí		
Z/VAL-01-17		Sí		
Z/VAL-01-21		Sí		
Z/VAL-01-24		Sí		
Z/VAL-02-15		No		
Z/VAL-02-22		Sí		
Z/VAL-02-24		No		
Z/VAL-02-25		Sí		
Z/VAL-04-3		Sí		
Z/VAL-03-4		No		
Z/VAL-03-15		Sí		
Z/VAL-03-22		No		
Z/VAL-04-7		No		
Z/VAL-04-8		No		
Z/VAL-04-9		Sí		
Z/VAL-04-13		Sí		

Caracterización de microorganismos productores de antibióticos aislados en el proyecto
Micromundo-UZ | Alumno: Asier Dominguez San Pedro

ID	B.sub BHI-A	B. sub M-H	E. coli BHI-A	E. coli M-H
Z/VAL-04-14		No		
Z/VAL-04-19		No		
Z/VAL-05-23		No		
Z/VAL-06-5		Sí		
Z/VAL-06-6		No		
Z/VAL-08-11		Sí		
Z/VAL-08-23		Sí		
Z/VAL-11-3		Sí		
Z/VAL-11-17		Sí		
Z/VAL-11-18		Sí		
Z/VAL-12-3		Sí		
Z/VAL-12-10		Sí		
Z/VAL-12-18		Sí		
Z/VAL-12-21		Sí		
Z/VAL-12-23		Sí		
Z/VAL-14-7		No		
Z/VAL-14-9		Sí		
Z/VAL-15-4		Sí		
Z/VAL-15-5		Sí		
Z/VAL-15-11		Sí		
Z/VAL-16-23		No		
Z/VAL-16-25		No		
Z/VAL-18-3		Sí		
Z/VAL-18-7		No		
Z/VAL-18-22		No		
Z/VAL-19-5		Sí		
Z/VAL-19-7		No		
Z/VAL-19-19		No		
Z/VAL-20-8		No		
Z/VAL-21-1D		No		
Z/SAL-14-4		Sí		
Z/VAL-03-8		Sí		No
Z/VAL-03-19		Sí		Sí
Z/VAL-05-20		Sí		Sí
Z/VAL-06-15		Sí		Sí
Z/VAL-16-15		Sí		Sí
Z/VAL-21-1C		Sí		Sí
Z/GO-1-14		No		
Z/GO-2-6		No		
Z/GO-2-7		No		
Z/UZ-B1-20		Sí		
Z/UZ-B1-21		Sí		
Z/UZ-B1-14		Sí		
Z/UZ-B2-11		Sí		
Z/UZ-B3-17		Sí		
Z/UZ-B4-4		Sí		
Z/UZ-B4-20		Sí		
Z/UZ-B4-20		No		
Z/UZ-C1-12		No		

ID	B.sub BHI-A	B. sub M-H	E. coli BHI-A	E. coli M-H
Z/UZ-C1-15		No		
Z/UZ-C2-11		No		
Z/UZ-C2-24		No		
Z/UZ-C3-20		No		
Z/UZ-C4-7		No		
Z/UZ-C4-23		No		
Z/CA-06-23	No			
Z/CA-06-24	Sí			
Z/CA-03-16	No			
Z/SAL-06-12	Sí			
Z/RM-03-6	Sí			
Z/RM-4-3	No			
Z/VAL-03-14		Sí		
Z/VAL-03-18		No		
Z/VAL-03-21		Sí		
Z/VAL-08-15		No		
Z/VAL-14-11		Sí		
Z/VAL-14-4		Sí		

Sí= positivo
 No= negativo

*Anexo V. Preguntas realizadas en la encuesta de
este trabajo*

Caracterización de microorganismos pro ductores de antibióticos aislados en el proyecto Mi cromundo-UZ

Encuesta del TFG "Caracterización de microorganismos productores de
antibióticos aislados en el proyecto Micromundo-UZ"

***Obligatorio**

1. Provincia *

2. ¿Podrías indicar estudios? *

Marca solo un óvalo.

- Estudios universitarios
 Estudios no universitarios

3. ¿Has oído hablar de la resistencia a antibióticos con anterioridad? *

Marca solo un óvalo.

- Sí
 No

4. ¿Sabrías decirme a qué se debe la resistencia a antibióticos? Señala todo aquello que consideres correcto *

Selecciona todos los que correspondan.

- Nuestro cuerpo se adapta a los antibióticos y cada vez necesitamos más dosis para conseguir el mismo efecto
- La cantidad de antibióticos que se consumen es mayor a la producción global de antibióticos
- Un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que era sensible anteriormente
- Es la resistencia de una persona a tomar antibióticos, del mismo modo que existe el movimiento antivacunas
- Otro: _____

5. ¿En qué casos tomas antibióticos? *

Marca solo un óvalo.

- Cuando tengo un resfriado
- Cuando me siento indispuest@
- Cuando me lo receta el médico
- Cuando veo que mucha gente a mi alrededor está enferma, por prevención

6. ¿Cómo obtuviste el último antibiótico que tomaste? *

Marca solo un óvalo.

- Profesional sanitario
- No de un profesional sanitario
- No lo recuerda
- NS/NC

7. ¿Crees que la resistencia a antibióticos es un problema a nivel mundial? *

Marca solo un óvalo.

- Sí
 No
 Tal vez

8. ¿En qué momentos crees que puede ser peligrosa la resistencia a antibióticos? *

Selecciona todos los que correspondan.

- En operaciones quirúrgicas
 En una infección normal que anteriormente se curaba sin problema
 Complicaciones en animales (ganado, animales domésticos...)
 No se corre tanto peligro

Otro: _____

9. ¿Sueles terminar los tratamientos con antibióticos cuando el médico te lo receta? *

Marca solo un óvalo.

- Sí, siempre
 No, una vez que me siento mejor dejo de tomarlos
 No, hay días que me olvido y no me lo tomo
 A veces sí y a veces no

10. En muchos países se utilizan antibióticos para el engorde del ganado, ¿qué opinas de esta situación? *

Marca solo un óvalo.

- Creo que es una técnica que debe detenerse de inmediato para evitar el problema de la resistencia a antibióticos
 Es un problema que se produzca esto, pero no se puede evitar ya que sino no habría suficiente producción de carne para la población
 A mi no me incumbe porque no como carne

11. ¿Qué factores crees que han provocado la resistencia a antibióticos? *

Selecciona todos los que correspondan.

- Mutaciones en las bacterias
- El uso excesivo de los antibióticos
- Mal uso de los antibióticos
- El hombre ha tenido algo que ver con todo esto
- Son procesos naturales, es normal que aparezca

12. ¿Sabrías decirme como se llama el grupo de bacterias que se consideran de mayor riesgo para la salud por su resistencia los antibióticos? *

Marca solo un óvalo.

- ESKAPE
- HUYDA
- RUNAWAY
- COVID
- No creo que haya un grupo de bacterias en concreto

13. Este trabajo analiza las muestras del proyecto Micromundo en la Universidad de Zaragoza. ¿habías oído hablar antes de este proyecto o alguno parecido para la concienciación y búsqueda de soluciones en la Resistencia a Antibióticos? Si es así, marca en la casilla de "otros" el nombre de tal proyecto *

Marca solo un óvalo.

- Sí
- No
- Otro: _____

14. Propón una medida, científica o política que ayude a controlar y tratar la resistencia a los antibióticos

Anexo VI. Hoja de recogida de datos y plantilla



Proyecto de Innovación
Aprendizaje - Servicio
Universidad Zaragoza

Curso 2019-2020

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS SOBRE LA MUESTRA DE SUELO

(adaptada de la original elaborada por Kristen Butela (Seton Hill University, EEUU))

Muestra recogida por:	
Peso de la muestra (gramos):	
Referencia:	
Centro Educativo:	IES
Fecha de recolección (día/mes/año)	
Localidad (Municipio y provincia)	
Coordenadas geográficas (consultar GPS)	
Profundidad (cm)	
Tipo de suelo (arcilloso, arenoso, rico en humus...)	
Temperatura en el momento de la toma	
Condiciones meteorológicas	

Observaciones sobre el terreno (tipo de vegetación, uso agrícola, características destacables del entorno si procede, etc.)	
Datos adicionales (opcional, en laboratorio): pH, contenido en agua, materia orgánica...	

TABLA DE RESULTADOS

Nº colonias cultivadas / gramo de muestra	
Nº de colonias en ensayo de antibiosis	
Nº de positivos frente a.....	
Nº de positivos frente a.....	
Referencias de los aislamientos positivos	

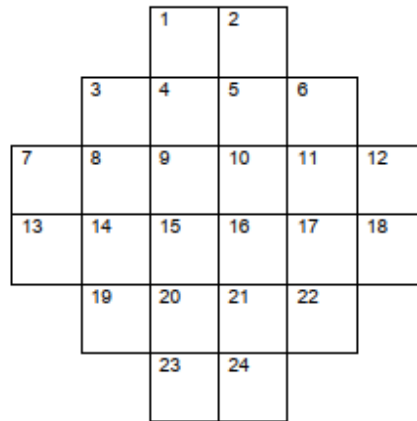
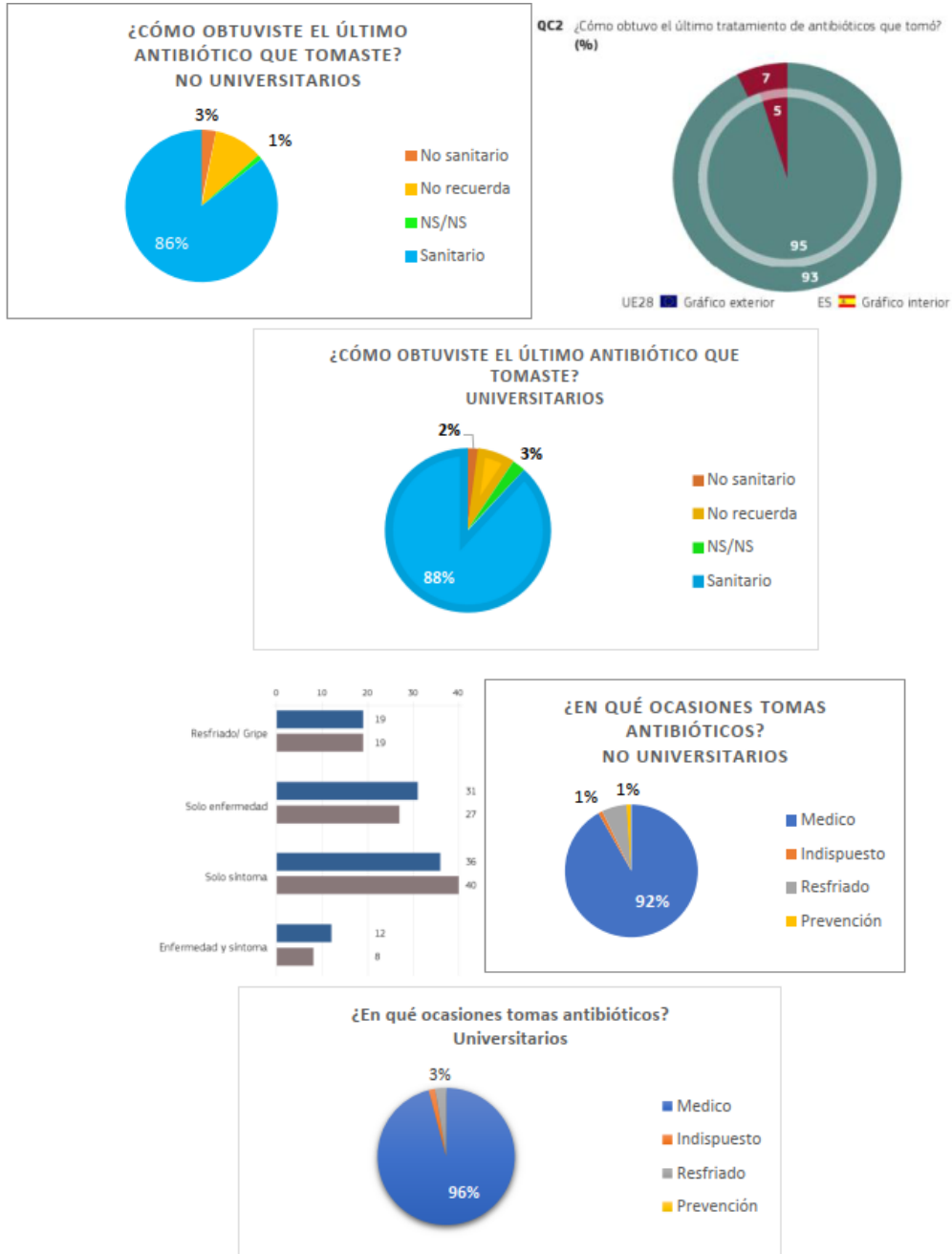
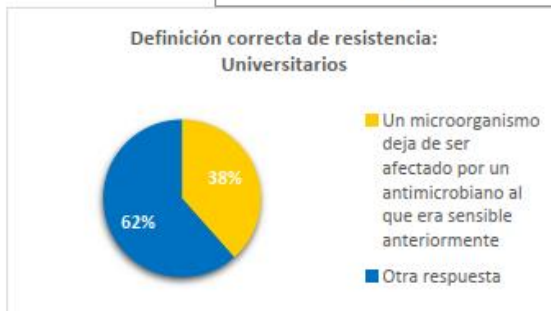
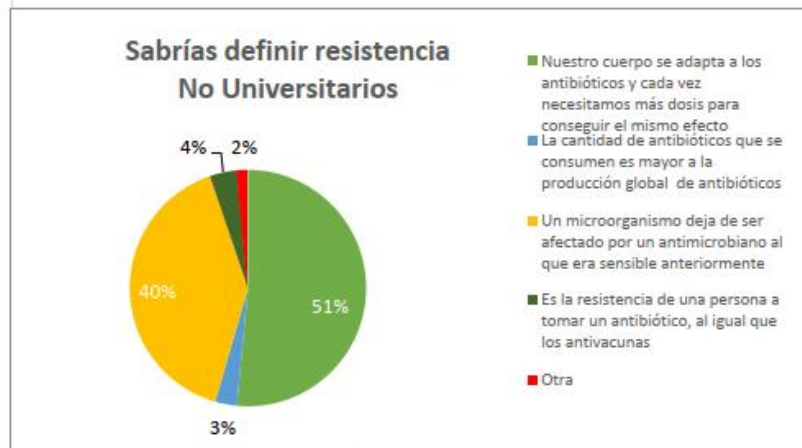
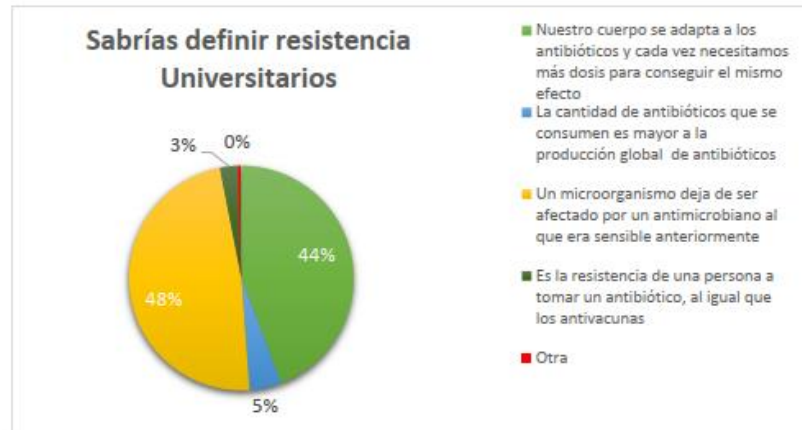
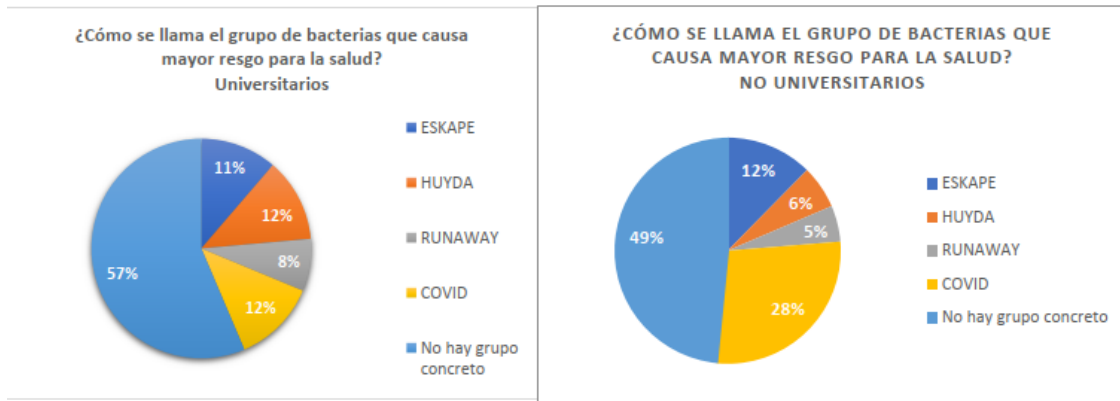
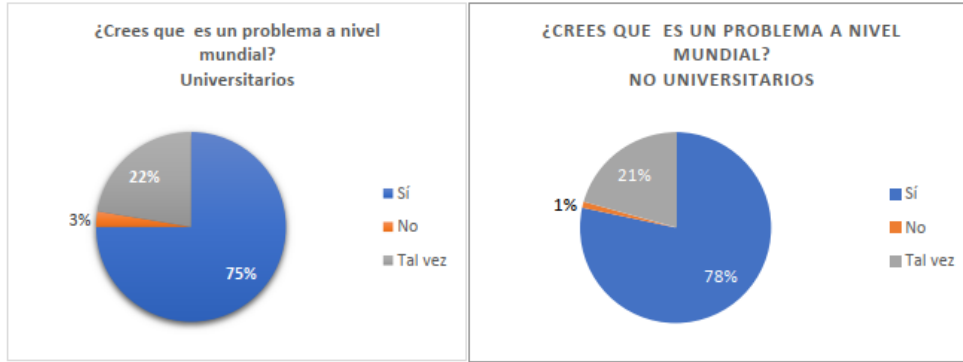


Figura 1.A VI: Plantilla empleada por los SWIPs para marcar en la placa de Petri las celdas donde depositar los posibles microorganismos productores

Anexo VII. Gráficas de la encuesta realizada en este TFG y por el Eurobarómetro







Anexo VIII. Imágenes de ensayos

Comparación de medios

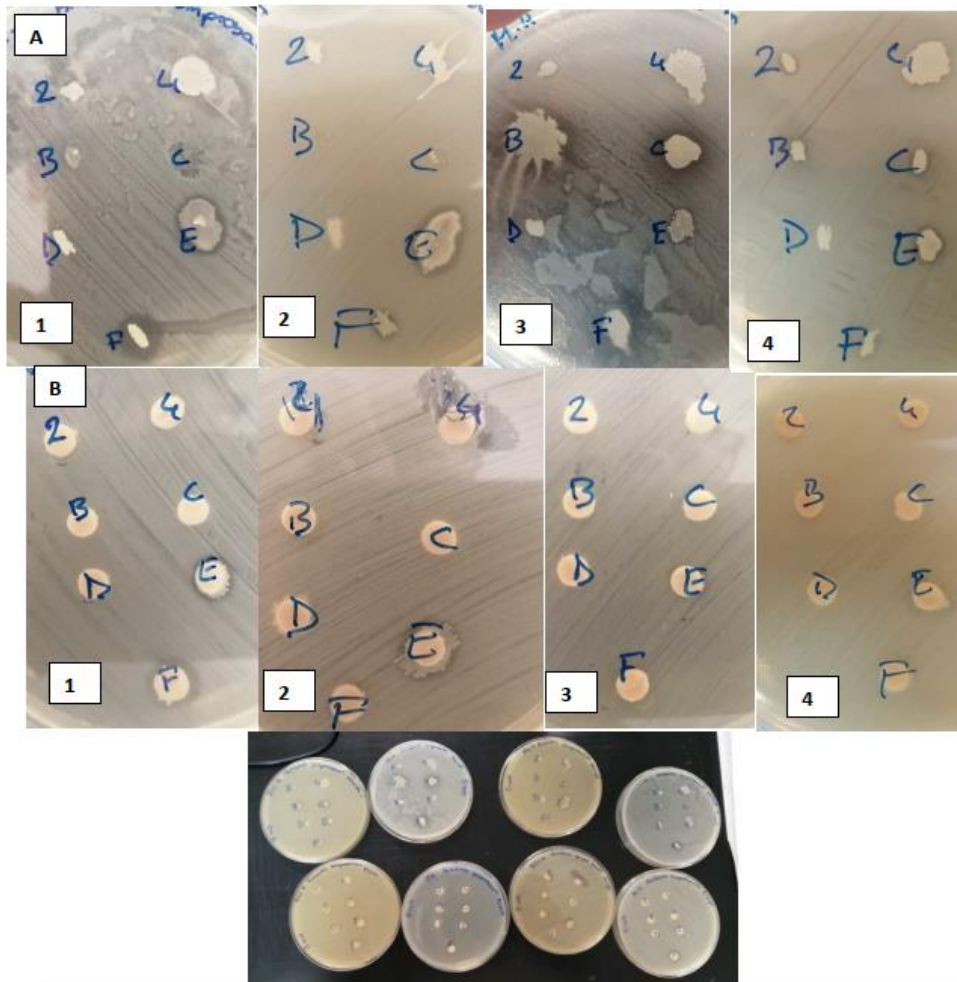


Figura 1. A VIII. Antibiosis de comparación de los medios de cultivo y con discos dispensadores.

- A. Antibiosis normal
- B. Antibiosis con discos.
 - 1. *E. coli* M-H
 - 2. *E. coli* BHI-A
 - 3. *B. subtilis* M-H

Antibiosis difusión del sobrenadante

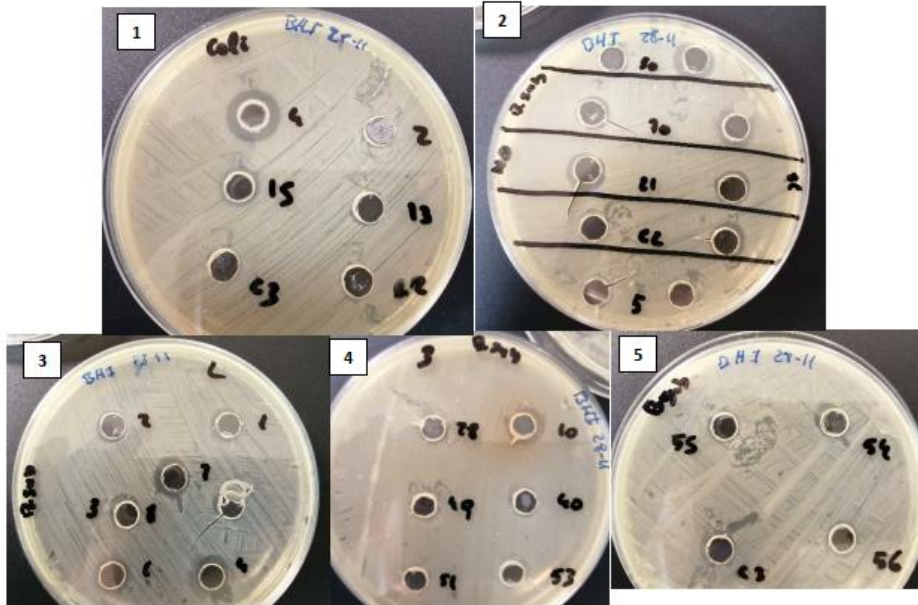


Figura 2. A VIII. Antibiosis de difusión del sobrenadante. 1) Antibiosis frente a *E. coli* con muestras filtradas; 2) Antibiosis frente a *B. subtilis* con muestras filtradas (dcha) y sin filtrar (izda) 3)4)5) Antibiosis frente a *B. subtilis* con muestras sin filtrar. Muestras escogidas al azar

Halos de inhibición más significativos ante bacterias patógenas

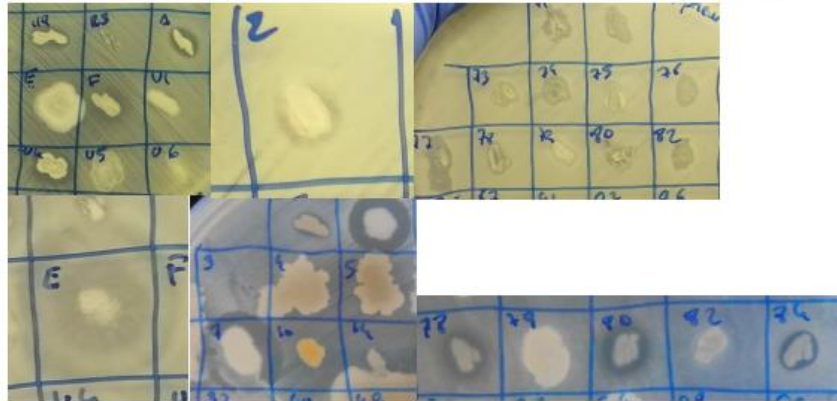


Figura 3. A VIII. Halos de inhibición más representativos ante bacterias patógenas. (1) *S. aureus*; (2-3-4) *K. pneumoniae*; (5-6) *M. smegmatis*