



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

## **PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Encapsulación conjunta de microorganismos dentro de microgeles y su análisis con FACS para el descubrimiento de cepas microbianas productoras de antibióticos

### **TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

### **DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. Abraham Ochoa Guerrero

TUTOR

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras  
Facultad de Química, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX, México  
Enero 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**ENCAPSULACIÓN CONJUNTA DE MICROORGANISMOS DENTRO DE  
MICROGELES Y SU ANÁLISIS CON FACS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE  
CEPAS MICROBIANAS PRODUCTORAS DE ANTIBIÓTICOS**

**T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. Abraham Ochoa Guerrero**

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras  
Facultad de Química, UNAM



Ciudad de México, enero del 2024.

# Jurado Asignado

<b>Presidente</b>	Dra. Amelia Guadalupe Farrés González-Sarabia	Facultad de Química, UNAM
<b>Vocal</b>	Dra. María del Pilar Cañizares Macias	Facultad de Química, UNAM
<b>Vocal</b>	Dr. Ernesto Rivera Becerril	Unidad Cuajimalpa, UAM
<b>Vocal</b>	Dr. José Alberto Rivera Chávez	Instituto de Química, UNAM
<b>Secretario</b>	Dra. Corina-Diana Ceapa	Instituto de Química, UNAM

## Lugar donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 326, Edificio F. Facultad de Química, UNAM.

## Sustentante:

M. en C. Abraham Ochoa Guerrero



**Tutor:** *Luis Fernando Olguín* 

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

# Agradecimientos

A CONAHCYT México por la beca otorgado durante mis estudios de doctorado (CVU. 604111).

Al CONAHCYT por el financiamiento del proyecto titulado: “Búsqueda masiva de compuestos antibacterianos producidos por microorganismos no cultivables utilizando una plataforma de microfluídica” (clave: 284249).

A DGAPA-UNAM por el financiamiento del proyecto con número (PAPIIT IN211623) y a partir del cual se obtuvo una beca por concepto Doctorado/Obtención de grado. A la Facultad de Química, UNAM por el Proyecto de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP 5000-9023).

Agradezco a los miembros del comité tutor: la Dra. María del Pilar Cañizares Macias, el Dr. Jorge Rocha Estrada y al Dr. Mathieu Christiane Hautefeuille, quienes siguieron y evaluaron los avances de este proyecto en diferentes momentos y cuyos consejos fueron siempre muy valiosos para alcanzar los objetivos planteados. Particularmente, quiero agradecer al Dr. Jorge Rocha, quien me proporcionó las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo, me permitió trabajar en su laboratorio durante una estancia y me enseñó las técnicas de microbiología que utilicé durante el resto de mis experimentos.

Agradezco al jurado por la revisión de esta tesis y los valiosos comentarios a la misma.

Al posgrado en Ciencias Químicas, UNAM por las facilidades otorgadas durante el desarrollo de este proyecto.

Un agradecimiento muy, pero de verdad muy especial a mi asesor el Dr. Luis Fernando Olguín Contreras por el gran apoyo, las oportunidades y la confianza que ha puesto en mí. Le agradezco mucho todos sus consejos y la inigualable guía que me ha brindado y que sin duda resultan de gran importancia en mi vida profesional. Le agradezco su tiempo y su amistad.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Frida, quien entre tanto tiempo y tanto espacio afortunadamente me toco coincidir con ella durante mis estudios de doctorado, una gran compañera y amiga. A Kenia, siempre muy profesional, un gran ejemplo a seguir. A Joaquín, Luis, Paulina y Yesica por confiar en mí y a para quienes espero haber sido de ayuda en el laboratorio.

Agradezco mucho a mi familia, padres y hermanos a quienes les toca otra cara del doctorado y a pesar de eso siempre me apoyan. A Itzel, el jazz en mi vida y a la Momo, el astro de mis caminatas.

# Resumen

La capacidad de un microorganismo de inhibir el crecimiento de otros a su alrededor se conoce como actividad antagonista. Esta inhibición se puede generar mediante diferentes mecanismos, incluida la producción de moléculas con actividad antimicrobiana. Por lo tanto, los microorganismos antagonistas resultan una fuente prolífica de compuestos con potencial para el descubrimiento y desarrollo de antimicrobianos con estructuras moleculares novedosas. Sin embargo, debido al gran número y diversidad de microorganismos que pueden estar presentes en una muestra ambiental, la búsqueda de cepas antagonistas requiere de técnicas de escrutinio con la capacidad de muestrear una gran cantidad de microorganismos en un intervalo corto de tiempo.

En este trabajo se desarrolló una metodología de alta eficiencia útil para la búsqueda, selección y aislamiento de bacterias con actividad antagonista contra una cepa de *Escherichia coli* con la capacidad de expresar la proteína verde fluorescente (*E. coli*-GFP). La metodología desarrollada permite, mediante la técnica de microfluídica basada en microgotas, la co-encapsulación dentro de esferas de agarosa (denominadas microgeles) de células de *E. coli*-GFP junto con células individuales de diferentes cepas bacterianas aisladas de semillas de maíz. Estos microgeles cargados con bacterias tienen un volumen aproximado de 10 pL y se producen mediante dispositivos de microfluídica a una velocidad de 700 microgeles por segundo, equivalente a preparar 700 ensayos diferentes de microbiología en tan solo un segundo. Después de la formación, los cientos de miles de microgeles producidos se incuban durante periodos desde 18 hasta 48 h. Durante este tiempo las bacterias encapsuladas forman microcolonias dentro de los microgeles y la formación de estas depende del tipo de interacción entre el par de cepas bacterianas que inicialmente quedaron co-encapsuladas en un mismo microgel. Tras la incubación, los microgeles fueron analizados uno a uno y clasificados utilizando un tipo especial de citometría de flujo llamada Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia, comúnmente conocida como FACS por sus siglas en inglés (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). De acuerdo con el crecimiento bacteriano dentro de cada microgel, evaluado mediante el esparcimiento de la luz y la intensidad de fluorescencia obtenido con FACS, se recuperaron aquellos microgeles en los que inicialmente se co-encapsuló una cepa con actividad antagonista contra la cepa diana *E. coli*-GFP. Finalmente, el cultivo sobre placas de agar de los microgeles seleccionados permitió la recuperación a macroescala de las cepas con actividad antagonista caracterizadas mediante la morfología de las colonias que forman.

Para demostrar la utilidad la metodología propuesta para la identificación de microorganismos con actividad antagonista, se utilizaron como controles las tres cepas bacterianas previamente aisladas del maíz: *Bacillus velezensis* (NME26), *Burkholderia sp.* (XM5) y *Peribacillus frigitolerans* (NME255). Antes de realizar los

ensayos en microgeles, la actividad de estas cepas frente a *E. coli*-GFP se evaluó mediante ensayos sobre placas de agar. Estos experimentos permitieron diferenciar a las tres cepas del maíz por su actividad antagonista alta (NME26), moderada (XM5) o nula (NME255) contra la *E. coli*-GFP. Una vez comprobada esta actividad, células únicas de cada cepa control se co-encapsularon y co-incubaron junto con *E. coli*-GFP dentro de los microgeles. Mediante microscopía de fluorescencia y de campo claro, se evaluó el desarrollo de las microcolonias de las bacterias del maíz y el crecimiento o la inhibición de *E. coli*-GFP. Después, estos microgeles fueron analizados mediante FACS y las señales distintivas de esparcimiento de luz y fluorescencia obtenidas para cada grupo de microgeles fueron correlacionadas con las observaciones por microscopía. Este análisis permitió identificar mediante FACS los microgeles cargados con cepas antagonistas y así lograr separarlos de una mezcla de microgeles que contenían encapsuladas a *E. coli*-GFP con alguna de las tres cepas bacterianas aisladas del maíz. Posteriormente, el cultivo sobre placas de agar de los microgeles seleccionados confirmó el aislamiento y la recuperación de las dos cepas antagonistas. Además, se realizaron ensayos de enriquecimiento que demostraron la eficacia de la metodología para aislar cepas antagonistas presentes en una mezcla de microorganismos con abundancias relativas de hasta 0.01%. Finalmente, la metodología se probó con una muestra ambiental tomada de la saliva de un perro. Tras una ronda de co-encapsulación, co-incubación, análisis y selección con FACS se logró aislar de esta muestra una cepa con actividad antagonista frente a *E. coli*-GFP.

En este trabajo se desarrolló una metodología de alta eficiencia para la identificación de microorganismos biológicamente activos en muestras ambientales. Esta metodología elimina la necesidad de un aislamiento previo de microorganismos, cuyo procedimiento es necesario en las técnicas de microbiología a macroescala. De tal forma, mediante esta metodología se reduce significativamente, en el orden de días, el tiempo necesario para realizar escrutinios de muestras ambientales para la identificación de cepas productoras de antibióticos. El análisis de las cepas recuperadas con técnicas de microbiología y analíticas permitirá la caracterización de las cepas recuperadas, así como de los metabolitos que producen. En un futuro, la técnica podría ser útil para realizar ensayos entre pares de microorganismos que presenten interacciones positivas y no solo para el estudio de interacciones negativas. Incluso, mediante el control de la densidad bacteriana inicial se podría llevar a cabo el estudio de comunidades de microorganismos más grandes y diversas que pueden estar presentes en muestras ambientales, cuya área es muy prometedora como fuente potencial de antibióticos con estructuras moleculares novedosas.

# Contenido

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Objetivos e Hipótesis</b> .....	12
2.1. Objetivo Principal.....	12
2.2. Hipótesis.....	12
<b>3. Metodología</b> .....	14
3.1. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano.....	15
3.2. Ensayos de antagonismo sobre placas de agar.....	15
3.3. Diseño de los canales de microfluídica para formación de microgeles.....	15
3.4. Fabricación de dispositivos de microfluídica.....	17
3.5. Preparación de microorganismos para encapsulación en microgeles.....	21
<b>3.5.1.</b> Encapsulación independiente de bacterias en microgeles.....	21
3.5.2. <i>Co-encapsulación de E. coli-GFP con cada una de las cepas bacterianas aisladas del maíz</i> .....	22
3.6. Formación e incubación de microgotas.....	23
3.7. Observación de microgeles por microscopia de fluorescencia.....	24
3.8. Transferencia de los microgeles desde la fase oleosa hacia una fase acuosa.....	26
3.9. Análisis, clasificación y recuperación de microgeles haciendo uso de FACS.....	27
3.10. Manipulación de los microorganismos recuperados por FACS para crecimiento a macroescala o para ciclos consecutivos de encapsulación y selección.....	28
3.11. Muestra de saliva de perro.....	28
<b>4. Resultados</b> .....	30
4.1. Descripción general de la metodología.....	31
4.2. Ensayos a macroescala.....	33
4.3. Caracterización de los canales y producción de microgeles.....	34
4.4. Dinámica de la formación de microgeles en el rango de flujos utilizado.....	35
4.5. Encapsulación y crecimiento de microorganismos en microgeles.....	39
4.5.1. <i>Análisis por microscopía del crecimiento bacteriano dentro de los microgeles</i> .....	39
4.5.2. <i>Distribución de microorganismos encapsulados por microgel (Distribución de Poisson)</i> ...	42
4.6. Transferencia de los microgeles desde la fase oleosa hacia medio líquido 2YT.....	43
4.7. Caracterización del crecimiento bacteriano dentro de microgeles por citometría de flujo.....	44
4.7.1. <i>Señales de esparcimiento de la luz de los microgeles</i> .....	44

4.7.2.	<i>Caracterización de señales de fluorescencia obtenidas con FACS para los microgeles cargados con bacterias</i> .....	47
4.7.3.	<i>Análisis y separación con FACS de una mezcla de microgeles ocupados por bacterias con diferentes propiedades</i> .....	51
4.7.4.	<i>Recuperación a macroescala de los microorganismos encapsulados en los microgeles seleccionados</i> .....	51
4.8.	Co-encapsulación de <i>E. coli</i> -GFP con las cepas bacterianas aisladas del Maíz .....	53
4.8.1.	<i>Análisis por citometría de flujo de los microgeles con bacterias co-encapsuladas</i> .....	56
4.8.2.	<i>Recuperación e identificación de las bacterias recuperadas con FACS partir de muestras de co-encapsulación en microgeles</i> .....	57
4.9.	Enriquecimiento de una cepa con actividad antibiótica .....	59
4.10.	Búsqueda de microorganismos con actividad antibiótica dentro de una muestra de saliva de perro.....	63
<b>5.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>69</b>
5.1.	Perspectivas .....	74
<b>6.</b>	<b>Conclusión</b> .....	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>95</b>

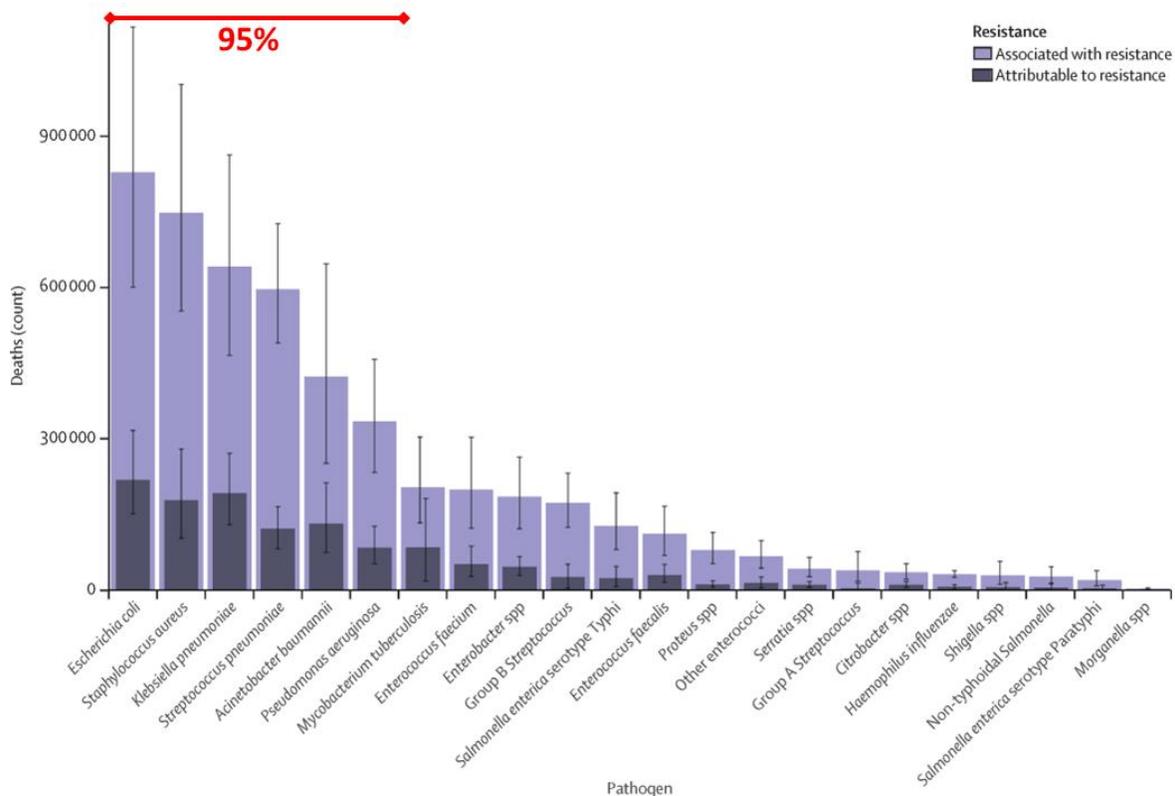
# Lista de abreviaturas

2YT	Two Yeast Tryptone
AMR	Antimicrobial resistance
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADS	Fluorescence Activated Droplet Sorting
FSC	Forward Scatter
FSC-A	Forward Scatter- Area
FSC-H	Forward Scatter-Height
GFP	Green Flurescent Protein
Kan	Kanamicina
LabNalCit	Laboratorio Nacional de Citometría
PBS	Phosphate buffer solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDMS	Polidimetil Siloxano
PFO	1H, 1H, 2H, 2H-Perfluorooctanol
rpm	Revoluciones Por Minuto
SCS	Side Scatter
SCS-A	Side Scatter-Area
SCS-H	Side Scatter-Height
SCS-W	Side Scatter-Width
UA	Unidades Arbitrarias
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

# 1. Introducción

Los antimicrobianos son sustancias químicas que tienen la capacidad de evitar o inhibir el crecimiento de microorganismos, como bacterias, virus, hongos y parásitos. Estos microorganismos pueden causar una variedad de infecciones en humanos, animales y plantas. Dependiendo del tipo de microorganismo que cause la infección, se utilizan diferentes tipos de antimicrobianos: antibióticos, para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias; antivirales, para combatir virus; antifúngicos, para hongos; y antiparasitarios para parásitos. La resistencia antimicrobiana (AMR, por sus siglas en inglés) ocurre cuando alguno de estos microorganismos, mediante alguna modificación genética, desarrolla la capacidad de resistir los efectos de los antimicrobianos que antes solían ser efectivos contra ellos.<sup>1</sup>

En particular, la incidencia a la cual las bacterias patógenas presentan resistencia a los antibióticos de uso común es un problema de salud pública a nivel mundial.<sup>2</sup> Por ejemplo, en 2019, globalmente se identificaron 1.27 millones de muertes asociadas a la AMR en bacterias. De este total, el 95% fue ocasionado por seis patógenos diferentes: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, por orden descendente del número de muertes humanas ocasionadas (Figura 1).<sup>2</sup>

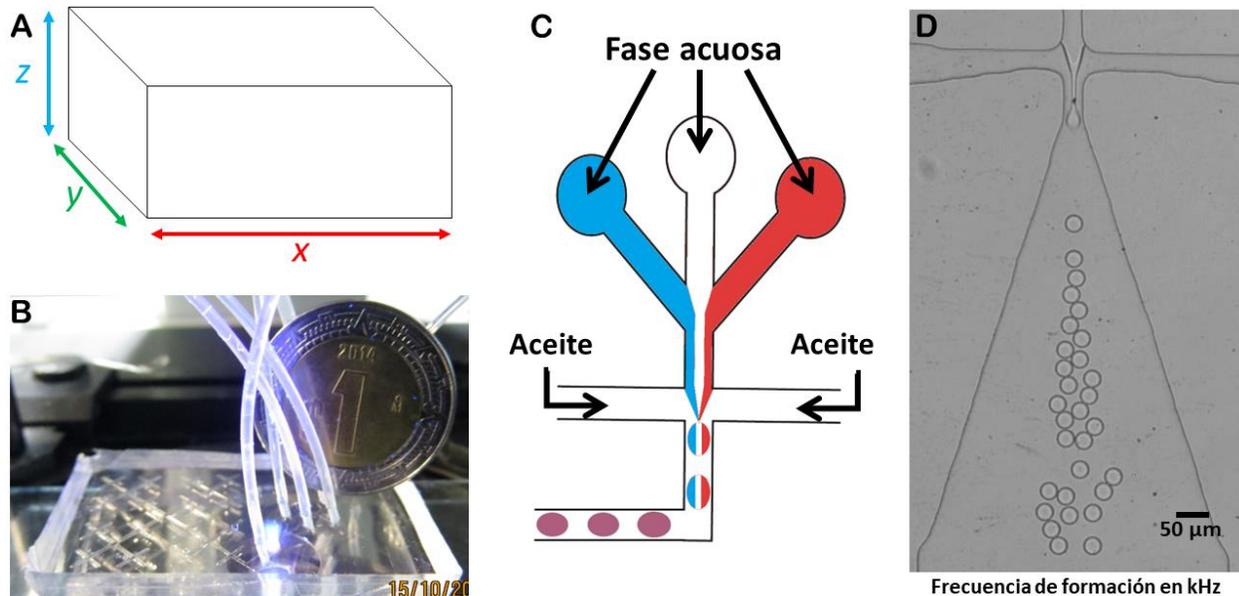


**Figura 1.** Número de muertes globales en el año 2019 atribuibles y asociadas con la AMR bacteriana. Los datos se presentan por patógeno causante de la muerte y en orden descendente de izquierda a derecha. Las barras de error muestran intervalos de incertidumbre del 95%. La imagen fue tomada y modificada de la referencia número 2: The Lancet 2022 (DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0).

Entre las estrategias que se han sugerido para combatir la AMR está la búsqueda de moléculas con estructuras moleculares novedosas y que presenten actividad antibiótica.<sup>3</sup> En la naturaleza existe una gran diversidad de microorganismos que interactúan químicamente a través de la excreción de metabolitos secundarios.<sup>4</sup> Estos microorganismos representan una fuente muy prolífica de compuestos con actividad biológica útiles para aplicaciones en diferentes industrias y áreas de investigación.<sup>4-6</sup> En particular, la búsqueda de microorganismos con interacciones antagonistas es muy relevante para la identificación de nuevos compuestos útiles para combatir la AMR.<sup>7</sup>

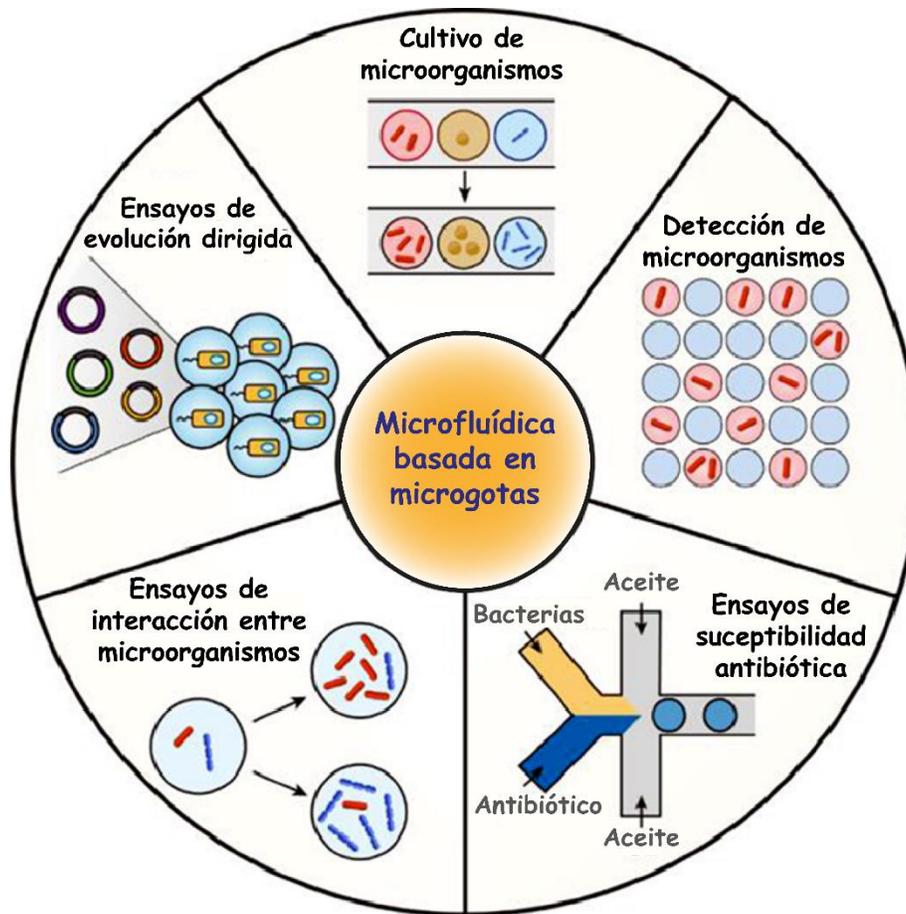
Sin embargo, debido a la gran cantidad y diversidad de microorganismos que pueden estar presentes en una muestra ambiental (p. ej.,  $10^6$  microorganismos por  $\text{cm}^2$ /hoja o  $10^{12}$  microorganismos por gramo en el intestino humano),<sup>8,9</sup> la identificación de microorganismos con actividad antagonista dentro de una muestra ambiental resulta una actividad con alto consumo de tiempo y recursos. Por lo general, estos ensayos microbiológicos comienzan con el aislamiento de todos los microorganismos cultivables presentes en una muestra, seguido de ensayos de antagonismo entre cada microorganismo aislado frente a uno o más patógenos. Mientras mayor sea el número de microorganismos aislados y de patógenos probados, mayor será el número de ensayos a realizar. Por lo tanto, para poder realizar una gran cantidad de estos ensayos en un intervalo pequeño de tiempo, es decir con una alta eficiencia, se requieren automatizaciones que puede llegar a ser muy costosas si se incluye el uso de robots.<sup>10</sup>

Bajo este contexto, hoy en día la microfluídica basada en microgotas se ha consolidado como una alternativa para la miniaturización (volúmenes desde los nano hasta los picolitros) y la automatización de una gran variedad de ensayos químicos, físicos y biológicos en formato de alta eficiencia.<sup>11-13</sup> La microfluídica basada en microgotas, permite la intersección de dos fases inmiscibles, una fase acuosa y una oleosa, dentro de canales de dimensiones micrométricas (Figura 2-A). Las fases se introducen en los microcanales a través de jeringas, tubería PTFE y bombas de jeringa utilizando flujos de inyección del orden de los microlitros por hora (Figura 2-B). De tal forma, la composición de ambas fases se puede modificar fácilmente permitiendo la formación de microgotas de agua en aceite con frecuencias de formación en el orden de los kHz (Figura 2-C y D). Los dispositivos para la producción de estas microgotas comúnmente se fabrican en vidrio o con el polímero polidimetilsiloxano (PDMS), ambos materiales permiten que la técnica sea adecuada para técnicas de análisis dentro del campo UV-Vis (Figura 2-B).<sup>14</sup>



**Figura 2.** (A) Esquema de los canales tridimensionales utilizados por la técnica de microfluídica. Las dimensiones 'y' y 'z' comúnmente están en el orden de las decimas a cientos de micrómetros. La longitud del canal, 'x', puede llegar a los centímetros dependiendo del diseño de cada experimento. (B) Dispositivo típico de microfluídica con un diseño de canales fabricados sobre una superficie de PDMS y sellados con un portaobjetos de vidrio ambos materiales son transparentes en el espectro visible y a altas longitudes de onda dentro del UV. Las dimensiones de estos dispositivos son comparables con una moneda de un peso mexicano. Las diferentes fases se inyectan dentro de los microcanales a través de tuberías PTFE que a su vez están unidos a jeringas colocadas sobre bombas de jeringas. (C) Para la microfluídica basada en microgotas, se utilizan dos fases inmiscibles que se introducen dentro de los microcanales cuyo diseño permite la intersección de ambas fases generando cintos de miles de microgotas de agua en aceite. Durante su formación la composición de las microgotas se puede modificar mediante cambios en la relación de flujos de las diferentes fases inyectadas. (D) El volumen de estas microgotas puede variar entre los nanolitros y los femtolitros y producirse a frecuencias del orden de los kHz.

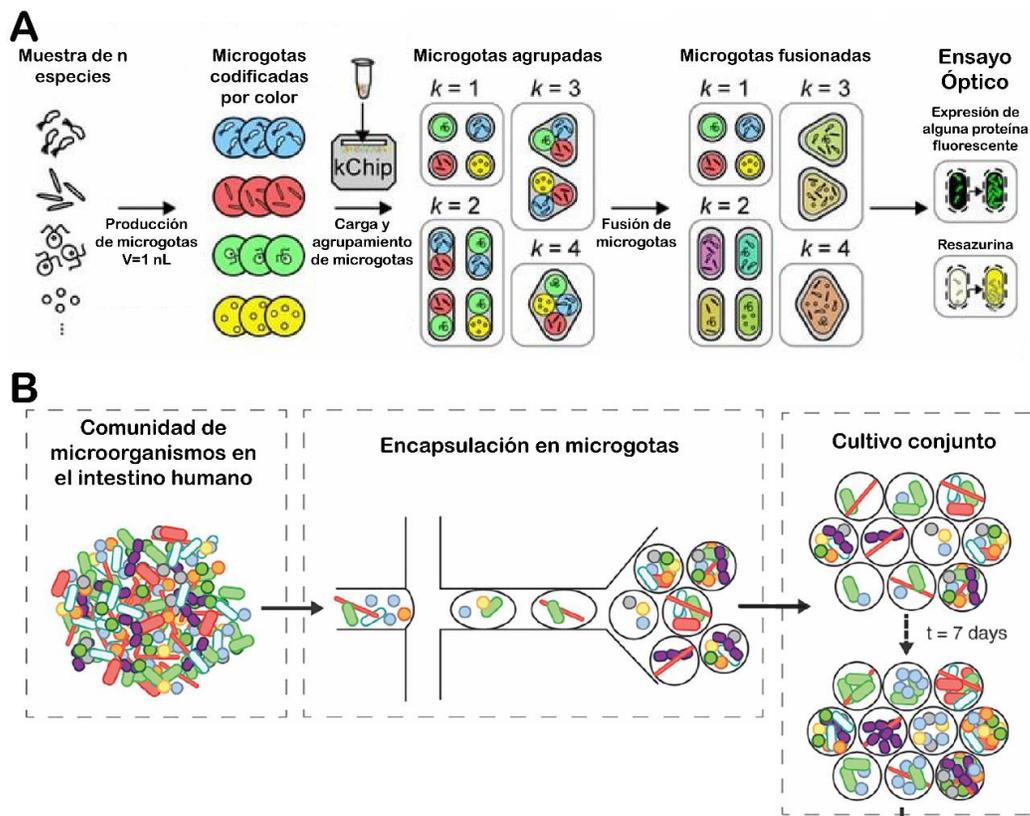
Dentro del campo de la microbiología, la microfluídica ha sido utilizada para el cultivo y la detección de microorganismos dentro de microgotas, para llevar ensayos de susceptibilidad antibiótica, así como diferentes estudios de interacción microbiana y aplicaciones biotecnológicas (Figura 3).<sup>13,15</sup> Comúnmente, los ensayos en microgotas con microorganismos comienzan con la encapsulación de una o más células dentro de las microgotas.<sup>16</sup> Para detectar la presencia y el crecimiento de los microorganismos encapsulados, frecuentemente se utilizan cepas modificadas para la expresión de proteínas fluorescentes.<sup>17,18</sup> También, se han utilizado marcadores de células vivas y muertas o el indicador del metabolismo celular resazurina para realizar pruebas de susceptibilidad antibiótica.<sup>19,20</sup> Incluso, utilizando mediciones de absorbancia de microgotas individuales, se ha reportado una metodología para la evaluación y aislamiento de bacterias resistentes a los antibióticos o para realizar ensayos de evolución dirigida.<sup>21,22</sup>



**Figura 3.** Aplicaciones de la microfluídica basada en microgotas en los diferentes campos de la microbiología. La imagen se tomó y modificó de la referencia número 15.

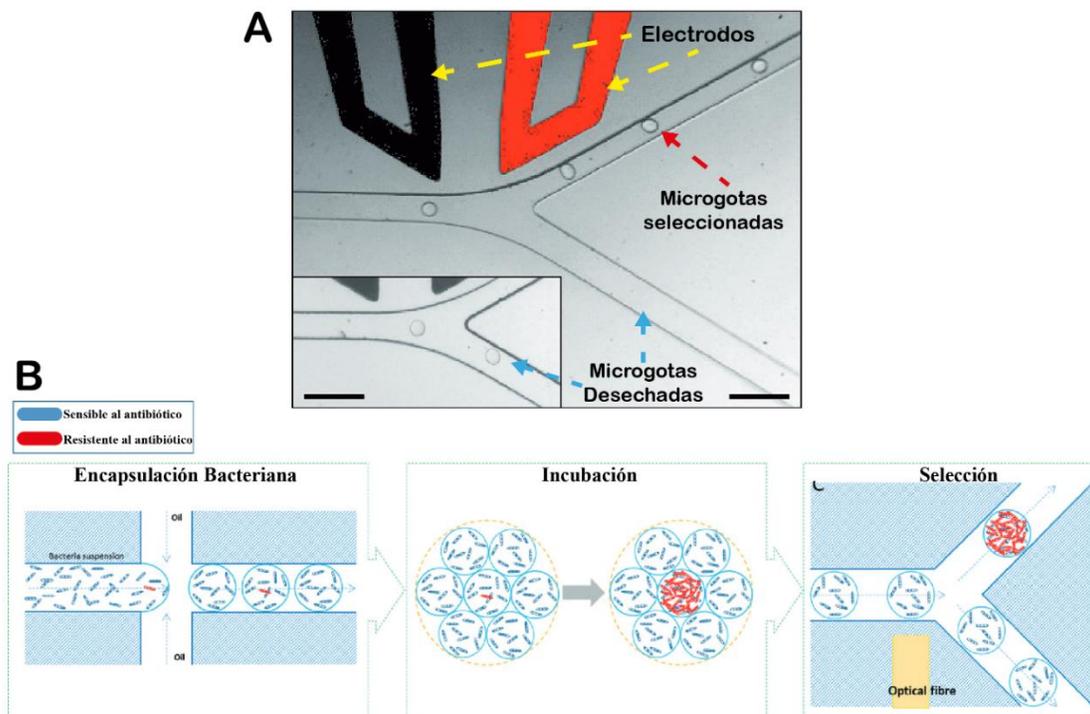
La co-encapsulación microbiana dentro de microgotas de agua en aceite se ha utilizado para el estudio de interacciones entre diferentes cepas. Por ejemplo, para probar interacciones bacterianas de una cepa frente a otra, se han co-encapsulado diferentes pares de microorganismos para evaluar los cambios positivos y/o negativos en el crecimiento celular debido a las condiciones de incubación conjunta dentro de microgotas.<sup>23-26</sup> Además, para el estudio de las interacciones entre más de dos cepas bacterianas diferentes, se ha reportado el desarrollo del dispositivo llamado *kChip* (Figura 4-A).<sup>27</sup> Este dispositivo consiste en una matriz con una densidad máxima de 2000 micro pozos por  $\text{cm}^2$ , cada pozo tiene un volumen del orden de los nanolitros. En estos micro pozos se logran capturar de 2 a 4 microgotas, donde cada una encapsula bacterias diferentes previamente identificadas. Después, las microgotas dentro de los pozos se fusionan para dar paso a la interacción entre las diferentes cepas encapsuladas y su estudio mediante microscopía.<sup>27</sup> Otro ejemplo interesante de la interacción de múltiples cepas en microgotas ha sido reportado para la cuantificación de microorganismos aislados de muestras fecales del intestino humano (Figura 4-B), este estudio permitió la identificación de microorganismos con baja abundancia en

la muestra o bien la caracterización de microorganismos que no habían sido reportados.<sup>28</sup> Sin embargo, en estos últimos ejemplos, las interacciones microbianas se estudiaron mediante una análisis automatizado de las imágenes de microscopía o mediante el conteo de las colonias que crecieron sobre placas de agar inoculadas con las microgotas cargadas de microorganismos. Por lo tanto, el número de microgotas que se pueden analizar mediante estas metodologías está limitado a la automatización de la toma de imágenes y a la capacidad de cómputo para el análisis de estas. De tal forma, estos ensayos se restringen al análisis de muestras pequeñas y con una baja diversidad de las cepas que se pueden estudiar en un solo experimento.



**Figura 4.** Descripción general de dos metodologías reportadas y que son relevantes en el estudio de interacciones microbianas dentro de microgotas. **(A)** El *kChip* es un dispositivo de microfluídica que permite el estudio de comunidades microbianas. Para hacer uso de este dispositivo, primero se producen gotas de 1 nL, cada gota contiene un código de color que indica la especie previamente aislada y encapsulada. La mezcla de estas gotas con código de colores se carga en el *kChip* y se agrupan aleatoriamente dentro del arreglo de pozos del *kChip*, los pozos están diseñados para agrupar con precisión  $k$  número de gotas. Se toman imágenes del *kChip* para identificar el contenido en cada pozo a partir de los códigos de color de las gotas. Luego, las gotas se fusionan dentro de sus respectivos pozos mediante la exposición a un campo eléctrico, generando así comunidades sintéticas de microorganismos. Los fenotipos comunitarios se pueden rastrear mediante ensayos ópticos, incluida la expresión de proteínas fluorescentes y la reducción de la resazurina. La imagen fue tomada y modificada de la referencia número 27 **(B)** Estudio de las interacciones entre los microorganismos presentes en muestras fecales. Izquierda, se prepara una suspensión microbiana derivada de una muestra fecal humana. En medio, mediante la formación de microgotas de agua en aceite, se encapsulan combinaciones aleatorias de bacterias en microgotas. Derecha, estas microgotas se incuban anaeróbicamente durante una semana para permitir la co-incubación de las subcomunidades y su posterior identificación mediante el cultivo en placas de agar. La imagen se tomó y modificó de la referencia número 28.

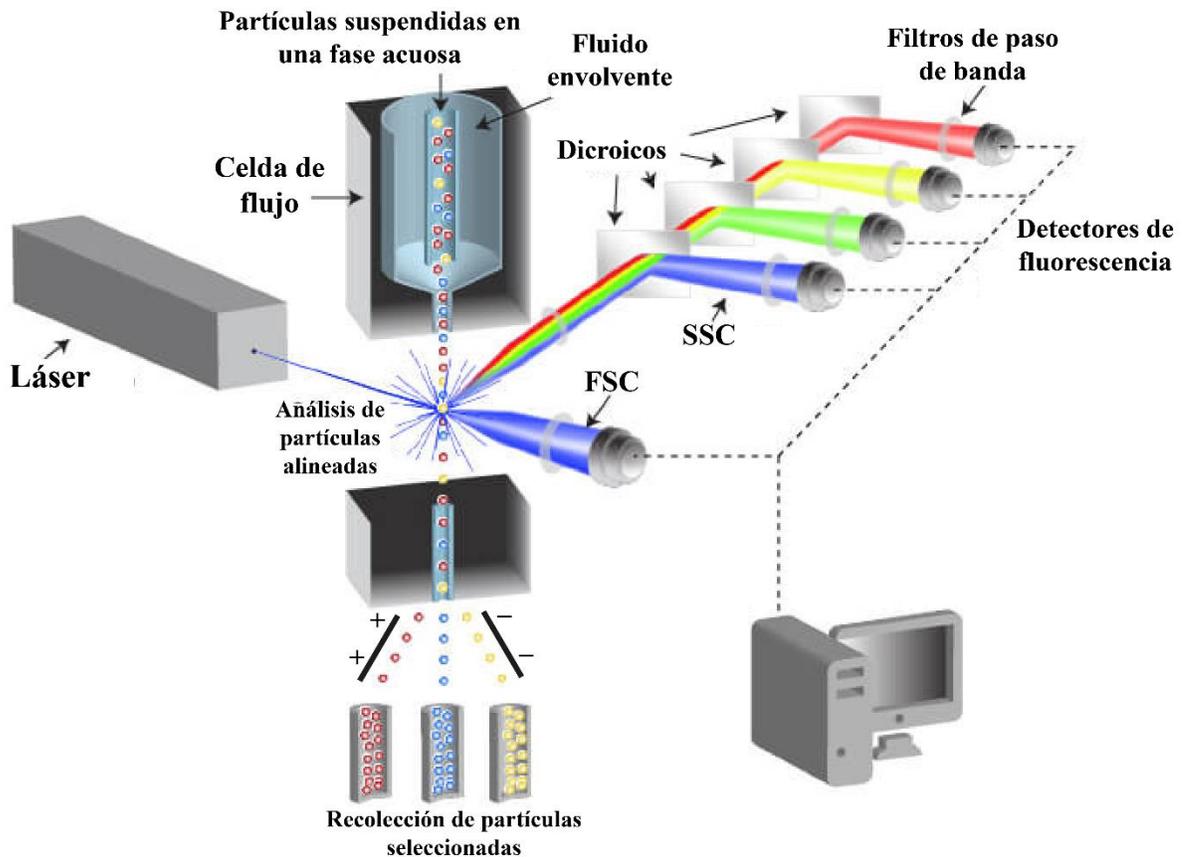
Una alternativa para mejorar la eficiencia de los ensayos en microgotas es la manipulación y selección automatizada de microgotas individuales de acuerdo con las propiedades ópticas de su contenido. Un enfoque que se ha desarrollado con estos fines es un sistema microfluídica conocido como FADS, *Fluorescence Activated Droplet Sorting* (Figura 5).<sup>29</sup> Esta técnica permite la selección de microgotas de agua en aceite basado en la intensidad de fluorescencia emitida por cada microgota que viaja a través del arreglo de canales dentro de un dispositivo de microfluídica. Las microgotas con las propiedades fluorescentes deseadas son seleccionadas mediante la aplicación de un pulso electromagnético que genera una polarización de las cargas en la superficie de la microgota y como consecuencia cambia su dirección y es enviada hacia un canal diferente del que fluyen las microgotas sin las propiedades deseadas (Figura 5-A). FADS resulta una metodología de alta eficiencia, se han reportado frecuencias de selección de hasta 2000 microgotas por segundo.<sup>29</sup> Esta técnica ha utilizado en proyectos de evolución dirigida para la selección de mutantes de enzimas que presentan una mayor eficiencia catalítica.<sup>30-33</sup> También, esta técnica ha sido modificada para la selección de microgotas sin la necesidad de marcadores fluorescentes.<sup>34</sup>



**Figura 5. (A)** Arreglo de electrodos y canales para la selección de microgotas dentro de un dispositivo de microfluídica mediante la técnica FADS. En la imagen principal, los electrodos se encuentran prendidos generando un campo eléctrico que polariza la superficie de las microgotas y las manda por el canal de selección. En el inserto de la figura, los electrodos se encuentran apagados y las gotas siguen el flujo de menor resistencia. Las barras de escala corresponden a 100  $\mu$ m. La imagen se tomó y modificó de la referencia número 29. **(B)** Esquema del flujo seguido por una metodología reportada para la detección de mutantes resistentes haciendo uso de FADS. Primero, se llevó a cabo la encapsulación de múltiples bacterias en microgotas junto con una concentración letal de antibiótico disuelto, solo algunas pocas de las microgotas formadas contenían células mutantes individuales resistentes al antibiótico. Después, sólo las células mutantes resistentes a los antibióticos proliferaron en presencia del antibiótico. De tal forma, las microgotas en las que se observó crecimiento bacteriano fueron seleccionadas con FADS La imagen ha sido tomada y modificada de la referencia número 21.

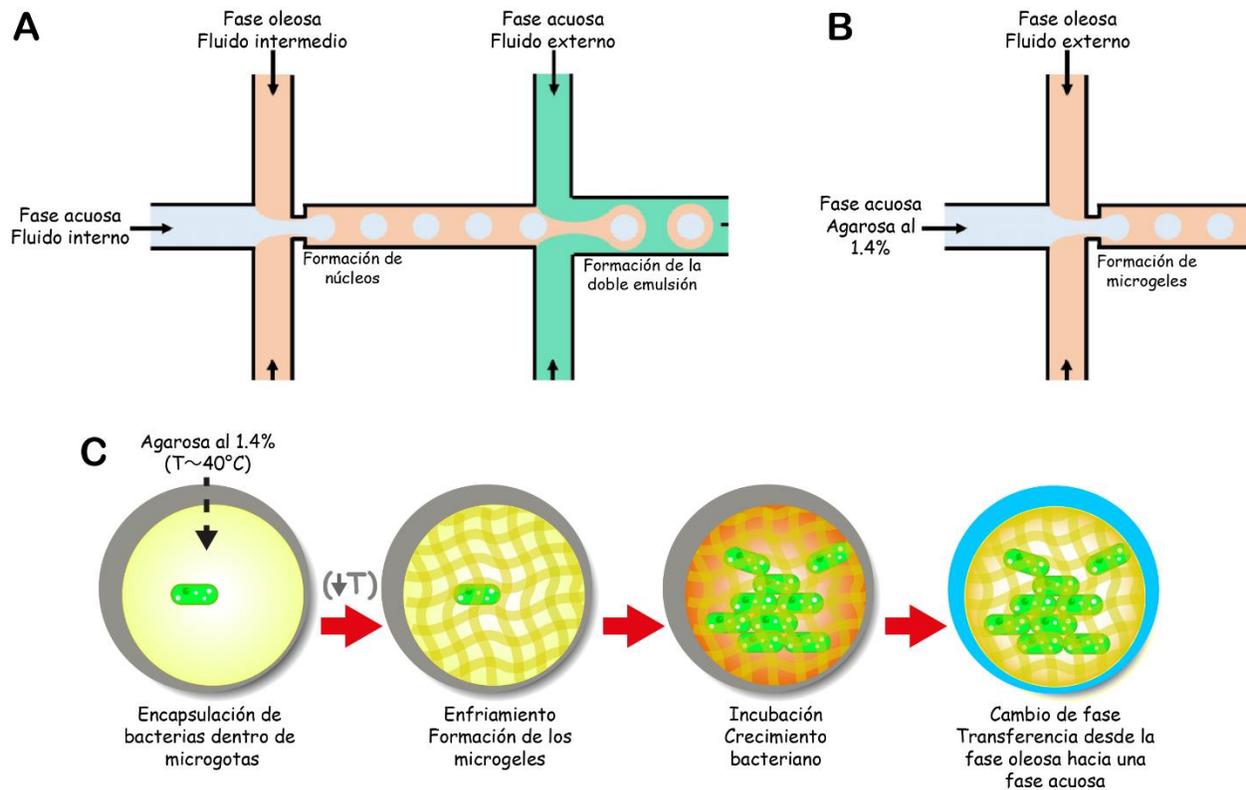
En estudios de interacción microbiana, FADS se ha utilizado para la detección de cepas bacterianas con resistencia antibiótica (Figura 5-B).<sup>21</sup> Así como para el análisis la diversidad de bacterias productoras de antibióticos de diferentes hábitats naturales.<sup>35</sup> Este estudio demostró que el cultivo unicelular dentro de microgotas de agua en aceite produce una mayor selectividad bacteriana que el cultivo estándar en placas de agar. Sin embargo, a pesar de esta capacidad demostrada de la técnica FADS para realizar ensayos biológicos, la implementación de esta técnica requiere una amplia experiencia en optofluídica, programación y múltiples instrumentos, lo que ha limitado su uso a algunos cuantos laboratorios especializados alrededor del mundo y hasta el día de hoy no ha habido una comercialización de estos sistemas.

Debido a esta limitación en la accesibilidad a la técnica de FADS, se ha reportado la selección de partículas de microfluídica mediante la técnica de citometría de flujo conocida como *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS).<sup>36-40</sup> Esta técnica puede seleccionar partículas dispersas en una solución amortiguadora con una eficiencia superior a  $10^7$  eventos por hora y está disponible mediante instrumentos comerciales presentes en muchas universidades y centros de investigación. En la UNAM el Laboratorio Nacional de Citometría (LabNaCit) cuenta con tres equipos diferentes de FACS disponibles como un servicio para la investigación.<sup>41</sup> Todos los instrumentos de FACS tienen detectores de esparcimiento de luz frontal y lateral, FSC y SSC por sus siglas en inglés, respectivamente. También, cada equipo de FACS cuenta con al menos tres láseres de longitud de onda diferentes que permiten analizar y seleccionar simultáneamente partículas individuales según su tamaño (FSC), la complejidad (SSC) y el espectro de emisión y la intensidad de la fluorescencia (Figura 6).<sup>42,43</sup>



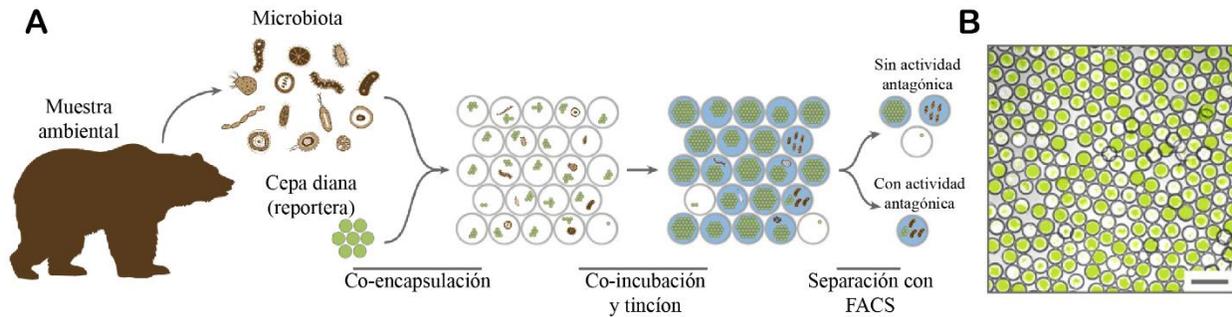
**Figura 6.** Esquema del arreglo óptico y electrónico de los instrumentos de FACS. Esta técnica permite el análisis y selección de partículas suspendidas en una fase acuosa. Las partículas se inyectan en el equipo y se alinean mediante un fluido envolvente que se mueve a alta velocidad. Cada partícula es analizada mediante uno o más láseres de diferentes longitudes de onda que permiten clasificar a las partículas de acuerdo con su tamaño (FSC), la complejidad del contenido de la partícula (SSC) y su espectro de emisión e intensidad de fluorescencia, todos estos parámetros de manera simultánea. Los grupos de partículas con las propiedades deseadas se logran recuperar mediante la aplicación de pulsos eléctricos que direccionan a las partículas en reservorios independientes.

Para lograr el análisis de las microgotas de microfluídica mediante la técnica de FACS, las microgotas de agua en aceite se deben de sacar de la fase oleosa y mantener su estructura suspendidas en una fase acuosa necesaria para el análisis por citometría de flujo. Para ello, se ha reportado el uso de las dobles emulsiones agua-aceite-agua<sup>37,44</sup> o bien la adición de un agente gelificante en la fase acuosa para dar paso a la formación de microgeles (Figura 7-A y B).<sup>45,46</sup> Las dobles emulsiones y los microgeles se pueden formar dentro de los dispositivos comunes de microfluídica basada en microgotas y logran encapsular e incubar microorganismos dentro de estos sistemas. En el caso de los microgeles la incubación se puede realizar con los geles suspendidos en el aceite favoreciendo así la concentración de los metabolitos que excretan las bacterias encapsuladas en cada microgota. En este punto los microgeles se pueden transferir fácilmente desde la fase oleosa hacia una fase acuosa para su posterior análisis, clasificación y recuperación mediante la técnica de FACS (Figura 7-C).



**Figura 7.** Esquema del arreglo típico de los canales de microfluidica para la formación de (A) emulsiones dobles agua-aceite-agua y (B) microgeles de agarosa. (C) Esquema de encapsulación e incubación de microorganismos dentro de microgeles producidos mediante dispositivos básicos de microfluidica basada en microgotas.

Específicamente en el área del descubrimiento de nuevos antibióticos, el grupo de investigación de Alexander Gabibov ha utilizado las dobles emulsiones para la búsqueda de microorganismos antagonistas y los compuestos que excretan. Para ello, se tomaron muestras de saliva de humanos<sup>36</sup> o de un oso siberiano (Figura 8).<sup>47</sup> Mediante diluciones, cada microorganismo presente en estas muestras se logró co-encapsular junto con células del patógeno *S. aureus* (cepa diana) modificado para expresar alguna proteína fluorescente (Figura 8-B). Después de un tiempo de co-incubación, se llevó a cabo la tinción de todas las células dentro de las emulsiones dobles para discriminar los diferentes eventos que surgieron tras esta estrategia de co-incubación. Haciendo uso de la técnica de FACS se seleccionaron aquellas emulsiones dobles en las que se identificó que la cepa co-encapsulada junto con *S. aureus* presentó actividad antagonista (Figura 8-A). Mediante este enfoque se logró recuperar una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* y otra de *Bacillus pumilus*, ambas con actividad inhibidora contra *S. aureus*.<sup>36,47</sup> La misma metodología se utilizó para identificar *Paenibacillus polymyxa*, una cepa del suelo con actividad antimicrobiana contra *E. coli*.<sup>48</sup>



**Figura 8. (A)** Esquema de una estrategia utilizada para el aislamiento de bacterias con actividad antagonista contra una cepa diana cuyo crecimiento se puede seguir mediante la capacidad de esta cepa de expresar la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés). Los microorganismos presentes en una muestra ambiental se separan y se encapsulan de manera independiente con la cepa diana mediante la formación de emulsiones dobles. Tras un tiempo de co-incubación las bacterias se tiñen y se separan mediante la técnica de FACS. **(B)** Foto representativa de emulsiones dobles co-encapsulando la cepa diana, en este caso *S. aureus* con la capacidad de expresar la GFP, junto con microorganismos presentes en la microbiota de la saliva de un oso siberiano. La imagen fue tomada y modificada de la referencia número 47.

Algunas de las desventajas que presentan los estudios mencionados con dobles emulsiones y FACS para la selección de los microorganismos antagonistas es que se requieren hasta dos marcadores fluorescentes diferentes además de una cepa reportera que expresara una proteína fluorescente. En estos trabajos no se reportó el uso de las señales de esparcimiento de la luz (FSC y SSC) que FACS obtiene para cada una de las partículas analizadas cargadas con microorganismos. Sin embargo, se ha demostrado que las señales de esparcimiento pueden ayudar a diferenciar entre microgeles que contienen células individuales de aquellos en los que han crecido microcolonias bacterianas dentro del microgel.<sup>49</sup> Por lo tanto, el estudio de las señales de esparcimiento emitidas por partículas de microfluídica cargadas con microorganismos podría permitir una disminución en el uso de marcadores fluorescentes necesarios para la selección de microorganismos antagonistas. Además, estas metodologías tampoco reportaron sus resultados de citometría de flujo que les permitieron discriminar y seleccionar a las partículas de microfluídica cargadas con microorganismos antagonistas.<sup>36,47,48,50</sup> Por lo tanto, aún es necesario realizar ensayos control mediante la co-encapsulación de microorganismos con actividad antagonista previamente comprobada, y poder así tener un panorama más amplio y un mejor entendimiento de los resultados que se pueden obtener con las técnicas de análisis y selección con FACS de partículas de microfluídica cargadas con microorganismos.

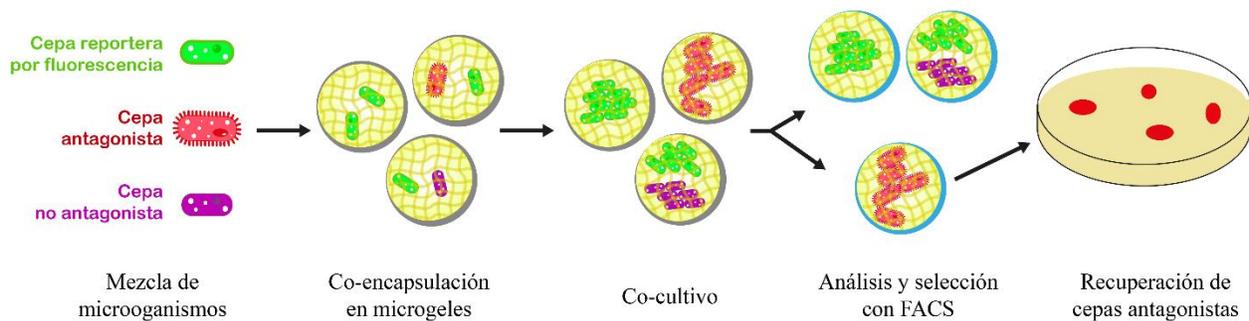
## 2. Objetivos e Hipótesis

### 2.1. Objetivo Principal

Desarrollar una plataforma de microfluídica basada en la co-encapsulación y el co-cultivo de microorganismos dentro de microgeles, seguido de su análisis mediante FACS para la identificación de especies con actividad antagonista contra una cepa reportera fluorescente.

### 2.2. Hipótesis

Si una cepa reportera fluorescente se co-incuba dentro de microgeles junto con una cepa antagonista el crecimiento de la reportera no se llevará a cabo. En cambio, si el microorganismo co-encapsulado no es antagonista la cepa fluorescente si proliferará. Haciendo uso de FACS, esta diferencia en el crecimiento de la cepa fluorescente permitirá separar los microgeles de acuerdo con la intensidad de fluorescencia y entonces recuperar los microorganismos que presenten actividad antagonista.



**Figura 9.** Esquema del objetivo e hipótesis del proyecto.

## Objetivos particulares

- A partir de cepas bacterianas previamente aisladas realizar ensayos de microbiología que permitan identificar y seleccionar cepas bacterianas con y sin actividad antibiótica contra una cepa bacteriana reportera con propiedades fluorescentes.
- Optimizar la encapsulación y cultivo dentro de microgeles tanto de la cepa reportera fluorescente, así como de las diferentes cepas bacterianas seleccionadas de acuerdo con su actividad antibiótica.
- Empleando técnicas de microscopía y citometría de flujo, caracterizar el crecimiento de la cepa reportera dentro de microgeles, tanto cuando se encapsula de manera individual como en conjunto con una cepa bacteriana dotada de actividad antibiótica, o junto a una cepa carente de dicha actividad.
- Haciendo uso de FACS, dentro de una mezcla de microgeles con diferentes microorganismos encapsulados identificar y recuperar aquellos cargados con las cepas productoras de antibióticos contra la cepa reportera.
- Realizar ensayos con muestras ambientales que demuestren la funcionalidad de la metodología para la recuperación de microorganismos antagonistas en mezclas complejas de microorganismos.
- Recuperación a macroescala y caracterización de microorganismos antagonistas seleccionados mediante la metodología propuesta.

# 3. Metodología

### 3.1. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

La manipulación de todas las cepas bacterianas se realizó en condiciones estériles dentro de una campana de bioseguridad. Todas las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Dr. Jorge Rocha Estrada (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S. 23096, México). Se utilizó la cepa fluorescente de *Escherichia coli*-GFP como cepa reportera para la detección de cepas con actividad antagonista. La cepa *E. coli*-GFP se obtuvo a partir de la transformación de la cepa *E. coli*-TOP10 a la cual se le insertó el plásmido *pHT315-Pspac'gfp*, para expresar de manera constitutiva la proteína verde fluorescente,<sup>51</sup> GFP por sus siglas en inglés. Las cepas *Bacillus velezensis* (NME26), *Burkholderia sp.* (XM5) y *Peribacillus frigiditolerans* (NME255), se aislaron de semillas de maíz mexicano y fueron identificadas en un estudio previo.<sup>52</sup> Estas bacterias se seleccionaron en función de su actividad antagonista contra la *E. coli*-GFP.

### 3.2. Ensayos de antagonismo sobre placas de agar

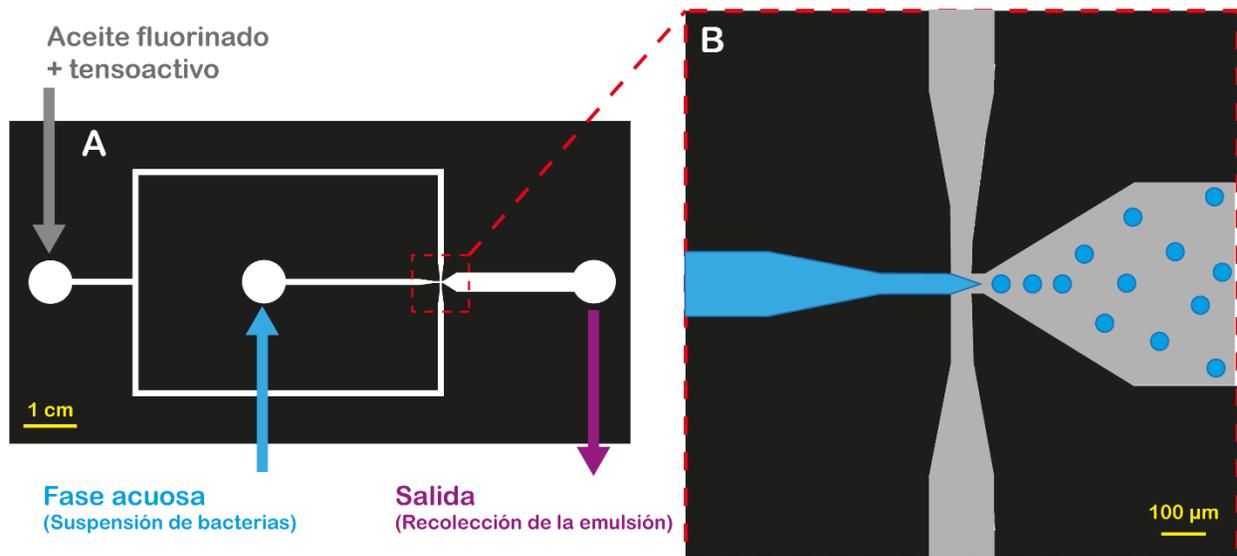
La actividad antagonista se determinó mediante ensayos sobre placas de agar con la técnica *spot-on-lawn*. Para ello, a partir de un stock de *E. coli*-GFP en glicerol al 15% conservado a -80 °C se estiró esta cepa sobre la superficie de una placa de 2YT-agar. Después de 24 h de incubación a 27 °C, se tomó una colonia aislada y se utilizó para inocular 2 mL de medio 2YT líquido, limpio y estéril. Tras incubar este cultivo durante 18 h a 27 °C y 200 rpm, cultivo de una noche, este se centrifugó y lavó 2 veces con medio 2YT líquido. Después, se realizó una dilución 1 en 100 y de este se tomaron 15 µL para inocular la superficie completa de una placa de agar. Sobre la superficie del agar inoculada con *E. coli*-GFP se inocularon las diferentes cepas del maíz, esto de manera independiente con ayuda de un palillo tomando las cepas directamente de un stock de glicerol al 15%. Las placas se incubaron durante 48 h a 27 °C y entonces se evaluó la actividad antagonista mediante el siguiente parámetro:

$$\text{Capacidad antagonista} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición}}{\text{Diámetro de la colonia que forma el halo}}$$

### 3.3. Diseño de los canales de microfluídica para formación de microgeles

Basado en reportes previos,<sup>53</sup> se diseñó un arreglo de microcanales con una geometría de enfoque de flujo que permitiera la formación de microgotas de agua en aceite con un diámetro menor a 30 µm. El tamaño máximo de la microgota fue seleccionado para asegurar la compatibilidad de análisis de estas partículas

haciendo uso de FACS. El diseño de canales de microfluídica para la producción de microgotas se realizó mediante el software de dibujo Adobe Illustrator® 2020 (Adobe). Los microcanales están configurados como un arreglo de enfoque de flujo, con dos entradas y una salida (Figura 10-A). La primera entrada, ubicada en la parte superior del diseño, se utiliza para inyectar la fase oleosa, mientras que la segunda entrada, en el centro del arreglo, se emplea para introducir la fase acuosa (suspensión de bacterias). Ambas fases fluyen a través de sus respectivos canales hacia la zona de intersección, donde los canales disminuyen gradualmente su ancho desde 150  $\mu\text{m}$  hasta 45  $\mu\text{m}$  (Figura 10-B). En esta región de intersección, las fuerzas interfaciales entre las fases acuosa y oleosa provocan la emulsificación de la fase acuosa en gotas monodispersas, que luego fluyen hacia la salida del diseño de microcanales (Figura 10-A). Este diseño de microcanales a computadora se imprime sobre un acetato. De tal forma, la luz solo pasa a través de los canales dibujados en blanco y no a través de las zonas oscuras (Figura 10-A). Este acetato funciona como una fotomáscara que se utiliza más adelante en el proceso de fabricación de dispositivos de microfluídica.



**Figura 10.** (A) Diseño de microcanales para la formación de microgotas de agua en aceite. El diseño cuenta con una entrada para la fase oleosa (aceite fluorinado con tensoactivo) y una entrada para la fase acuosa (suspensión de bacterias). Ambas fases se inyectan dentro del dispositivo y viajan hacia la zona de intersección. (B) En esta zona (magnificación 10 $\times$ ), ambas fases se juntan y por fuerzas interfaciales la fase acuosa segrega en microgotas monodispersas de agua en aceite con un volumen aproximado de 10 pL cada una. La emulsión viaja hacia el canal de salida. El diseño se imprime sobre acetato y se utiliza para la fabricación de dispositivos de microfluídica.

### 3.4. Fabricación de dispositivos de microfluídica.

La fabricación de los dispositivos de microfluídica se lleva a cabo en dos fases claramente diferenciadas. La primera, mediante el uso de fotolitografía, se realiza la fabricación de un molde maestro que contiene un relieve positivo con el diseño deseado de los canales de microfluídica. La segunda fase, haciendo uso de la técnica de litografía suave se obtienen réplicas del molde maestro con un relieve negativo sobre el polímero suave polidimetilsiloxano (PDMS), Figura 11.

Primera fase. Fabricación del molde maestro (fotolitografía):

- I. Se colocó una oblea de silicio (76 mm de diámetro, Silicon Valley Microelectronics Inc.) dentro de un equipo Spin coater (WS-650, Laurell Technologies Corp. La oblea se centró y se fijó con vacío dentro del Spin coater. Después, se colocaron alrededor de 3 mL de la resina fotosensible (SU-8 3035, Microchem) sobre la oblea de silicio. El volumen es aproximado porque si se intenta medir el volumen exacto de resina, la probabilidad de formación de burbujas aumenta y afecta gravemente el resultado deseado. Una vez depositada la resina sobre la oblea, se llevó a cabo un programa de giro de dos pasos: Primero, girar la oblea a una velocidad de 500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 s con una aceleración de 100 rpm/s. Este paso permite distribuir de manera homogénea la resina sobre toda la superficie de la oblea de silicio. El segundo paso del programa de giro consistió en aumentar la velocidad hasta 5000 rpm con una aceleración de 350 rpm/s y mantener esa velocidad durante 30 s, así se generó una capa uniforme de resina con un grosor de 20  $\mu\text{m}$ , que corresponde a la altura deseada de los canales de microfluídica (Figura 11-A).
- II. La oblea de silicio con la capa homogénea de resina se colocó sobre una parrilla de calentamiento a 105 °C durante 15 minutos. Este paso permitió evaporar la mayor parte de los disolventes presentes en la resina, permitiendo que disminuyera la capacidad de la resina de fluir sobre la superficie de la oblea (Figura 11-B).
- III. Sobre la oblea recubierta con resina se colocó y centró la máscara de acetato que contenía impreso, en negativo, el diseño deseado de los canales de microfluídica. Ambas piezas alineadas, se colocaron en medio de dos vidrios cuadrados (6 mm de espesor) asegurando así que la máscara se mantuviera plana y en total contacto con la capa de resina. Así, la oblea con la máscara se expuso durante 45 s bajo una lámpara de luz ultravioleta (100 W, B100AP, Analytik Jena, US, LLC). De tal forma, la luz que pasa a través del diseño de canales logra iniciar una reacción de

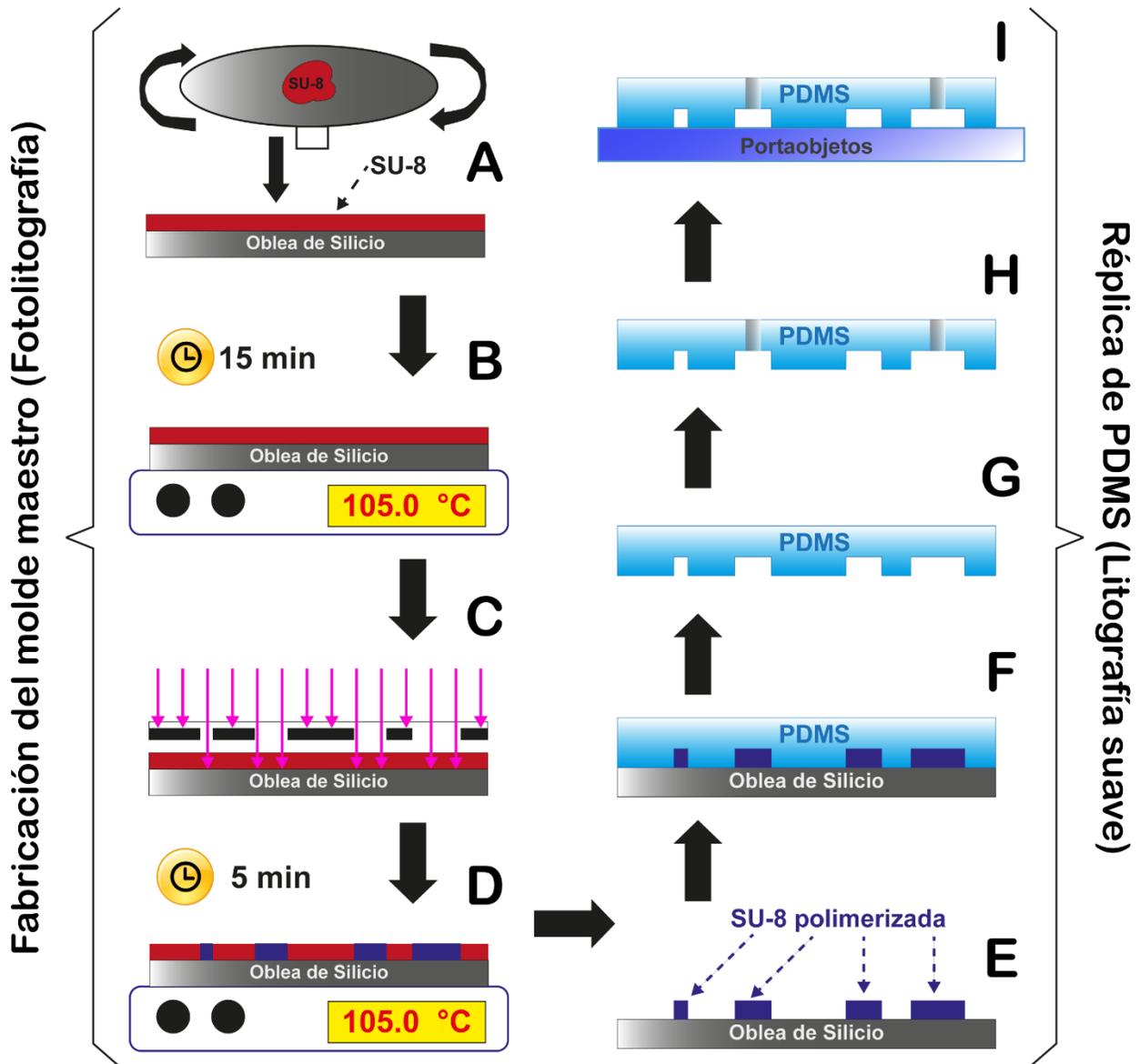
polimerización de la resina que solidifica y se adhiere covalentemente a la oblea de silicio y forma paredes de resina sólida con la altura y grosor deseados (Figura 11-C).

- IV. Después de la exposición a la luz ultravioleta, se retiró la máscara de acetato y la oblea de silicio se colocó durante 1 min sobre una parrilla de calentamiento a 75 °C. Inmediatamente después se calentó durante 5 min sobre una parrilla a 105 °C. Este paso permitió que terminara la reacción de polimerización iniciada durante la exposición a luz ultravioleta (Figura 11-D).
- V. Tras este calentamiento post exposición, la oblea con la capa de resina se sumergió durante 5 min dentro del disolvente revelador (Acetato de 1-Metoxi-2-propilo, Sigma-Aldrich). Pasado este tiempo se retiró la oblea del disolvente y se secó con aire comprimido. El disolvente utilizado permitió remover toda la resina que no fue expuesta a la luz y por lo tanto no polimerizó, dejando sobre la oblea un relieve positivo de SU-8 polimerizada con el diseño de canales de microfluídica con la altura y grosor deseados (Figura 11-E).

Segunda fase. Obtención y sellado de los microcanales de microfluídica (litografía suave).

- I. Dentro de un vaso de plástico desechable se pesaron 25 g del pre-polímero de PDMS (Sylgard 184; Dow Corning Corp.), esta masa solo se utiliza para la primera vez que se llena el molde, después se utiliza una masa menor de PDMS dependiendo del tamaño del diseño. A continuación, en el mismo vaso se agregó una masa del agente entrelazante (Sylgard 184; Dow Corning Corp.) equivalente al 8.5% en masa (en este caso 2.125 g) del pre-polímero de PDMS. Ambos componentes se mezclaron manualmente durante 2 min con ayuda de un agitador desechable. Finalmente, el vaso con la mezcla se colocó dentro de un desecador con vacío durante 30 min o hasta observar que ya no existan más burbujas dentro de la mezcla aún líquida.
- II. El molde maestro con el diseño del microchip se colocó dentro de una caja de Petri y sobre este se vertió la mezcla aún no polimerizada y sin burbujas de PDMS. La caja de Petri se introdujo en un horno a 65 °C durante una noche. Este calentamiento permitió que se llevara a cabo la polimerización del PDMS, obteniendo así un sólido suave (elastómero) y transparente sobre toda la superficie del molde maestro (Figura 11-F).
- III. Con ayuda de un bisturí, se cortó alrededor de la sección del molde maestro que contenía el diseño de canales y se retiró auxiliándose de una espátula. De tal forma se obtuvo una réplica de PDMS con el relieve negativo del diseño de los canales (Figura 11-G).

- IV. Con un punzón para biopsia de 0.75 mm de diámetro (Electron Microscopy Sciences) se perforaron todas las entradas y la salida de los canales en el diseño (Figura 11-H). La superficie de PDMS con el relieve de canales se puede cubrir con cinta mágica Scotch para evitar que el polvo se deposite sobre los canales.
- V. Con aire comprimido se retiró todo el polvo presente en la superficie de un portaobjetos de vidrio (75 mm de largo, 25 mm de ancho y 0.8 mm de grosor, MADESA). Después, utilizando un *Corona Treater* (BD-20AC, Electro Technic Products), se realizó una descarga de plasma sobre la superficie del portaobjetos durante 60 s. Inmediatamente después, la superficie de PDMS, con el relieve de los microcanales hacia arriba, se expuso durante 15 s a la descarga de plasma. Entonces, ambas superficies se pusieron en contacto presionando ligeramente para sacar las burbujas de aire que queden atrapadas en la interfase. Finalmente, el portaobjetos adherido a la réplica de PDMS se colocó dentro de un horno a 65 °C durante una noche. Este proceso permitió que los radicales libres, que se formaron en ambas superficies tras las descargas de plasma, se unieran y formaran enlaces covalentes entre el PDMS y el vidrio del portaobjetos. De esta forma se obtuvo un arreglo de canales cuadrados, donde tres paredes son de PDMS y la cuarta es de vidrio (Figura 11-I).



**Figura 11.** Esquema de fabricación de los dispositivos de microfluídica. A la izquierda, se describe la fabricación del molde maestro mediante fotolitografía, y a la derecha, se explica el proceso de obtención de réplicas de PDMS mediante litografía suave. **(A)** Sobre una oblea de silicio se coloca una capa con grosor homogéneo de resina fotosensible SU-8. **(B)** Un calentamiento permite evaporar los disolventes en la resina. **(C)** Se alinea la oblea de silicio con una máscara de acetato, la cual contiene impreso el diseño deseado de microcanales, y se exponen a luz UV para iniciar la reacción de polimerización de la resina depositada sobre la oblea. **(D)** Posterior a la exposición a luz UV, la oblea se calienta para finalizar la reacción de polimerización de la resina SU-8. **(E)** Con ayuda de un disolvente se revelan los canales construidos sobre la oblea. **(F)** Sobre este molde maestro se vierte una mezcla fluida del pre-polímero de PDMS con su agente entrecruzante. **(G)** Después de una noche dentro de un horno a 65 °C, el PDMS polimeriza y forma un sólido suave y transparente que contiene en una de sus superficies una copia, en relieve negativo, de los canales construidos en el molde maestro. **(H)** Las entradas y salidas del arreglo de microcanales se perforan con un punzón de biopsia. **(I)** Mediante un tratamiento de plasma, la superficie de PDMS se une covalentemente a la superficie de un portaobjetos de vidrio, quedando así la construcción de microcanales rectangulares con el diseño deseado.

### 3.5. Preparación de microorganismos para encapsulación en microgeles

Para el cultivo dentro de microgeles, cada cepa se cultivó partiendo de stocks de glicerol al 15% conservados a -80 °C. Estos stocks se utilizaron para inocular las diferentes cepas en placas independientes de medio 2YT con agar al 15% m/m y se incubaron a 27 °C durante 24 o 48 h dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada cepa. Después, de forma independiente para cada cepa bacteriana se seleccionaron de una o dos colonias y se utilizaron para inocular 2 mL de medio líquido 2YT, que fue incubado durante 18 h a 27 °C y 200 rpm, cultivos de una noche. Para mantener una presión selectiva y asegurar la estabilidad del plásmido en las células de *E. coli*-GFP, en los medios de cultivo de esta cepa se disolvió ampicilina a una concentración de 100 µg/mL. Para las cepas del maíz el cultivo se realizó sin la presencia de antibióticos ya que estos no han sido modificados genéticamente para su selección con antibióticos y por lo tanto, la presencia de ampicilina podría inhibir o impedir su crecimiento. Después del tiempo de incubación, cada cultivo de una noche se centrifugó y se lavó dos veces con PBS y, posteriormente, los microorganismos fueron resuspendidos en medio estéril 2YT. Finalmente, para eliminar los cúmulos bacterianos y obtener una mejor eficiencia de encapsulación, cada suspensión bacteriana se filtró a través de coladores bacterianos con un tamaño de poro de 40 µm (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

#### 3.5.1. Encapsulación independiente de bacterias en microgeles

Para lograr encapsular en promedio 5 células de *E. coli*-GFP por microgel ( $\lambda = 5$ ), experimentalmente los cultivos de una noche para *E. coli*-GFP, descritos en la sección 3.5, se diluyeron hasta obtener una densidad bacteriana de  $4.9 \times 10^8$  CFU/mL (ANEXO II) en la solución de trabajo para encapsulación. De tal forma y de acuerdo con cálculos teóricos empleando la distribución de Poisson (ANEXO I), el 99.3% de los microgeles que se forman a partir de esta suspensión resultan ocupados por al menos una célula de *E. coli*-GFP mientras que el 0.07 restante serían microgeles vacíos.

Para la encapsulación independiente de cada cepa del maíz en microgeles, de manera independiente cada cultivo de estas cepas se diluyó con medio 2YT hasta obtener una densidad bacteriana de  $9.7 \times 10^6$  CFU/mL (ANEXO II), correspondiente a un promedio de encapsulación de 0.1 células de cada cepa por microgel. Así, tras la emulsificación de esta suspensión de trabajo, el 90 % de los microgeles formados resultan vacíos, el 9% encapsulará a lo más una célula por microgel, y el resto (1%) logrará encapsular dos o más células (ANEXO I).

Para encapsular cada cepa de forma independiente en microgeles, se siguió el siguiente procedimiento: se tomaron 300  $\mu$ L de la suspensión de trabajo correspondiente y se colocaron en un microtubo de 1.5 mL, después se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente, se eliminó el volumen necesario para dejar solo 150  $\mu$ L del sobrenadante en el microtubo, que se utilizaron para resuspender el pellet bacteriano. A esta suspensión bacteriana se le añadieron 150  $\mu$ L de medio de cultivo 2YT estéril con agarosa de bajo punto de fusión (Sigma-Aldrich) disuelta al 2.8 %m/v y previamente calentado a 40 °C. La mezcla resultante se agitó vigorosamente con un vortex durante 45 segundos y el volumen completo se cargó en una jeringa de 1 mL evitando dejar burbujas atrapadas.

### 3.5.2. Co-encapsulación de *E. coli*-GFP con cada una de las cepas bacterianas aisladas del maíz

Para llevar a cabo la co-encapsulación de *E. coli*-GFP con las diferentes cepas aisladas del maíz, se realizaron las siguientes mezclas en microtubos individuales:

**Tabla 1.** Volúmenes de cada cepa utilizados para preparar las diferentes mezclas de bacterias utilizadas para la producción de microgeles cargados con células de *E. coli*-GFP junto con alguna cepa de las bacterias aisladas del maíz.

Muestra	Volumen en $\mu$ L agregado de la suspensión de trabajo de:			
	<i>E. coli</i> -GFP	NME255	XM5	NME26
<i>E. coli</i> -GFP/NME255	300	300	0	0
<i>E. coli</i> -GFP/XM5	300	0	300	0
<i>E. coli</i> -GFP/NME26	300	0	0	300
<i>E. coli</i> -GFP/Todas	300	300	300	300

Después, cada una de las mezclas obtenidas fue sometida al mismo proceso de centrifugación y pasos posteriores descritos al final de la sección 3.5.1.

De tal forma, y de acuerdo con las probabilidades obtenidas con la distribución de Poisson (ANEXO I), para los microgeles formados a partir de las mezclas de *E. coli*-GFP con solo una cepa aislada del maíz, el 9.3% de los microgeles formados lograrán encapsular una o más células de *E. coli*-GFP junto con solo una célula de la cepa del maíz presente en la mezcla; el resto de los microgeles formados estará ocupado exclusivamente por células *E. coli*-GFP (90.1%) o una mínima fracción (0.6%) podrían resultar como microgeles vacíos. Cuando en la suspensión bacteriana se mezclan todas las cepas aisladas del maíz junto con *E. coli*-GFP, entonces la proporción de microgotas que logra co-encapsular *E. coli*-GFP junto con una célula de alguna de las cepas aisladas del maíz aumenta al 25.4%.

### 3.6. Formación e incubación de microgotas

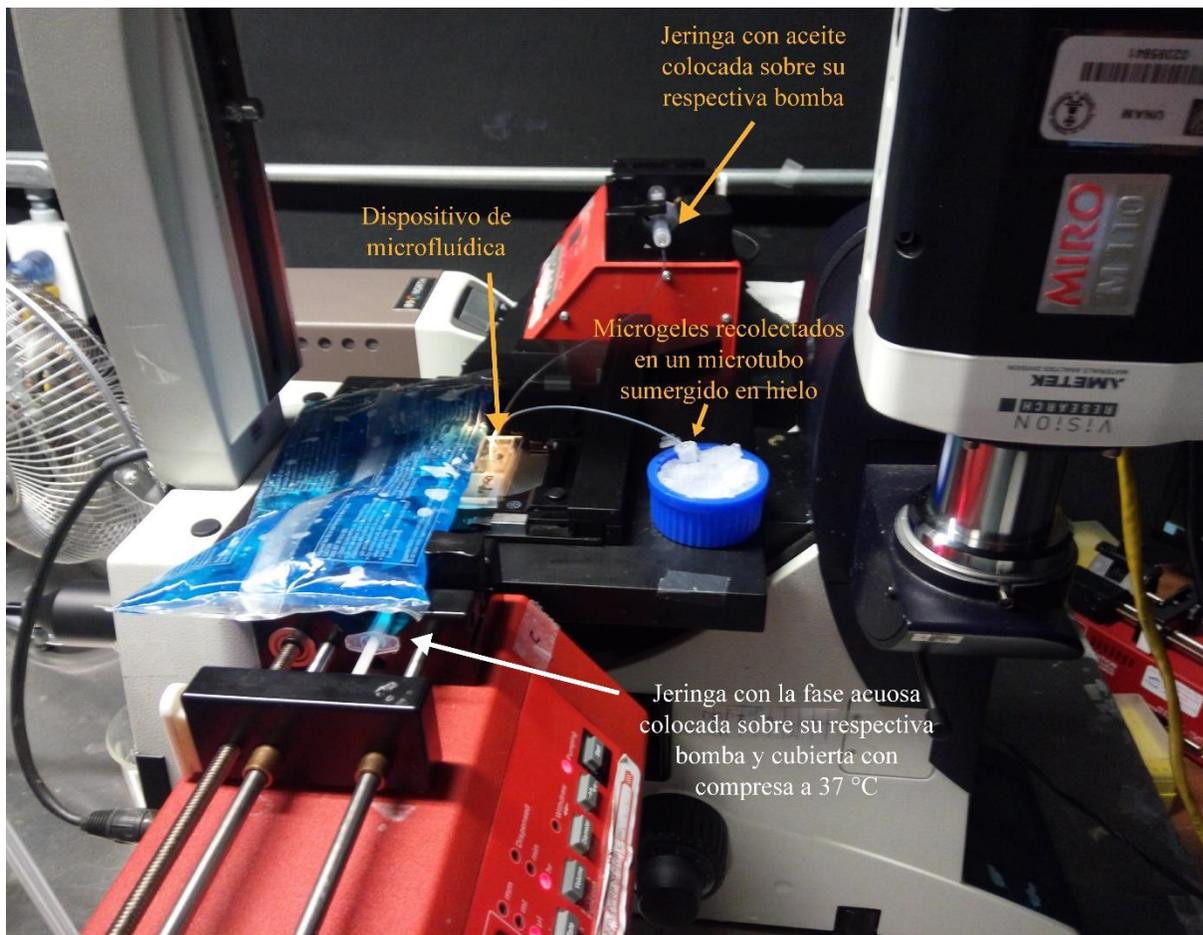
De acuerdo con el diseño descrito en la sección 2.3, tanto la fase oleosa como la fase acuosa se introdujeron dentro del dispositivo de microfluídica a través de jeringas independientes conectadas a bombas de jeringa (New Era-1000) (Figura 12).

La fase oleosa se compuso de aceite fluorinado HFE-7500 (3M™, Novec™) con un tensoactivo igualmente fluorinado (RAN-Biotechnologies) disuelto al 0.5% m/m. Tres mililitros de esta fase se cargaron en una jeringa de la misma capacidad, se colocaron sobre la bomba y se inyectaron dentro del dispositivo de microfluídica a 1200  $\mu\text{L}/\text{h}$  e excepción de los experimentos descritos en la sección 4.4 en la cual se indican las condiciones de flujo para cada experimento.

La fase acuosa en los distintos ensayos fue cada una de las suspensiones de cepas y mezcla de cepas bacterianas descritas en la sección 1.4. En jeringas independientes, se cargó el volumen total de cada suspensión dentro de una jeringa desechable de 1 mL (BD), se colocó sobre la bomba e inyectó a un flujo de 30  $\mu\text{L}/\text{h}$  (con excepción de los experimentos descritos en la sección 4.4). Durante la formación de microgotas, la jeringa con la fase acuosa se mantuvo a una temperatura de 37 °C con ayuda de compresas de gel recargadas sobre la jeringa y la bomba sin obstruir el funcionamiento de esta última (Figura 12).

La formación de microgotas dentro del microchip se supervisó mediante una cámara rápida (AMETEK, MIRO M11, Vision Research). Durante la formación de microgotas con esta cámara se tomaron videos con una velocidad de captura de 10 000 cuadros/s, un tiempo de exposición de 200  $\mu\text{s}$  y una resolución de 570×120 pixeles. El análisis de estos videos con el software PCC 2.2 (AMETEK) permitió determinar la frecuencia de formación de las microgotas.

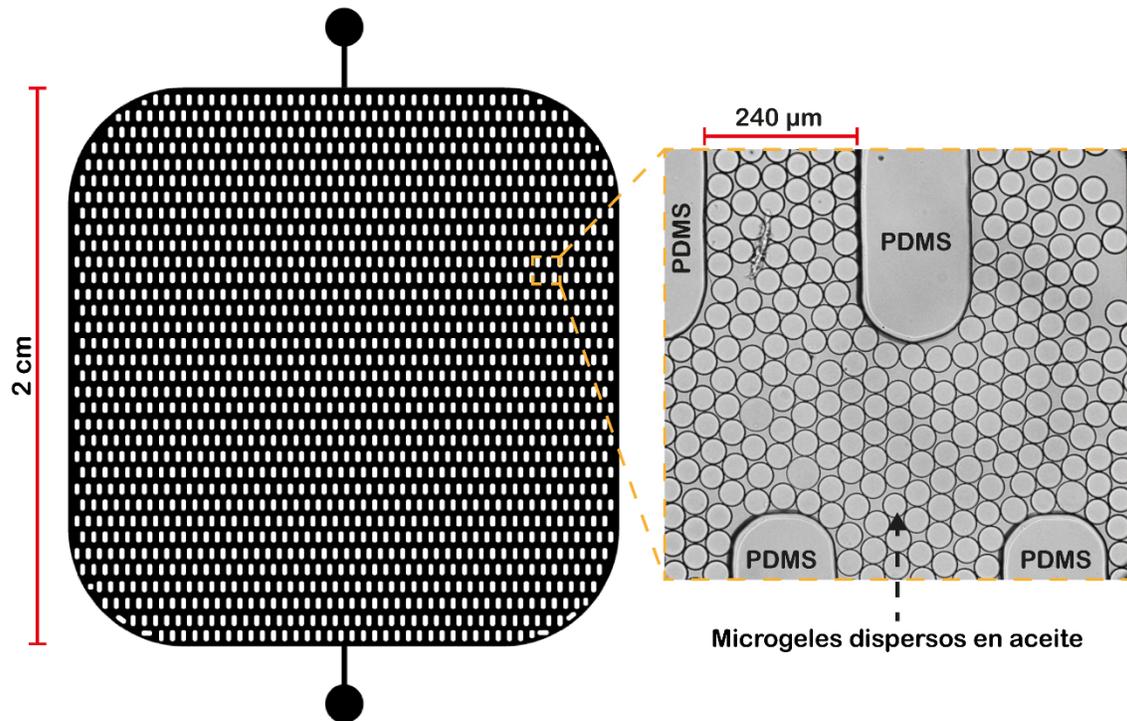
Las microgotas formadas dentro del dispositivo de microfluídica se recolectaron a través de una tubería de PTFE (Cole Parmer, ID = 0.56 mm) dentro de un tubo de 1.5 mL sumergido en hielo (Figura 12). La disminución de la temperatura favoreció la transición de la fase acuosa desde una fase fluida hacia una fase gel, formando así una emulsión de microgeles que encapsulan bacterias y que están dispersos en la fase de aceite fluorinado. En todos los casos las gotas se recolectaron durante 20 minutos y se mantuvieron sumergidas en hielo hasta comenzar el tiempo de incubación. Para la incubación, los microtubos con la emulsión se transfirieron desde el hielo hacia una incubadora (Excella E24, New Brunswick Scientific) y se mantuvieron dentro durante 18 h a 27 °C con una agitación de 200 rpm.



**Figura 12.** Fotografía del arreglo de bombas y jeringas para la formación de microgotas.

### 3.7. Observación de microgeles por microscopia de fluorescencia

Para el análisis por microscopía, se tomaron muestras independientes de 10  $\mu\text{L}$  de las diferentes muestras de microgeles producidos. Estos microgeles, aún dispersos en aceite, se inyectaron en un dispositivo de microfluídica con una geometría cuadrangular (Figura 13). El diseño del dispositivo consta de una cámara de observación con lados de 2 cm y una altura de 60  $\mu\text{m}$ . Dentro de esta cámara, se colocaron pilares de PDMS para evitar la deformación de la pared superior de PDMS.



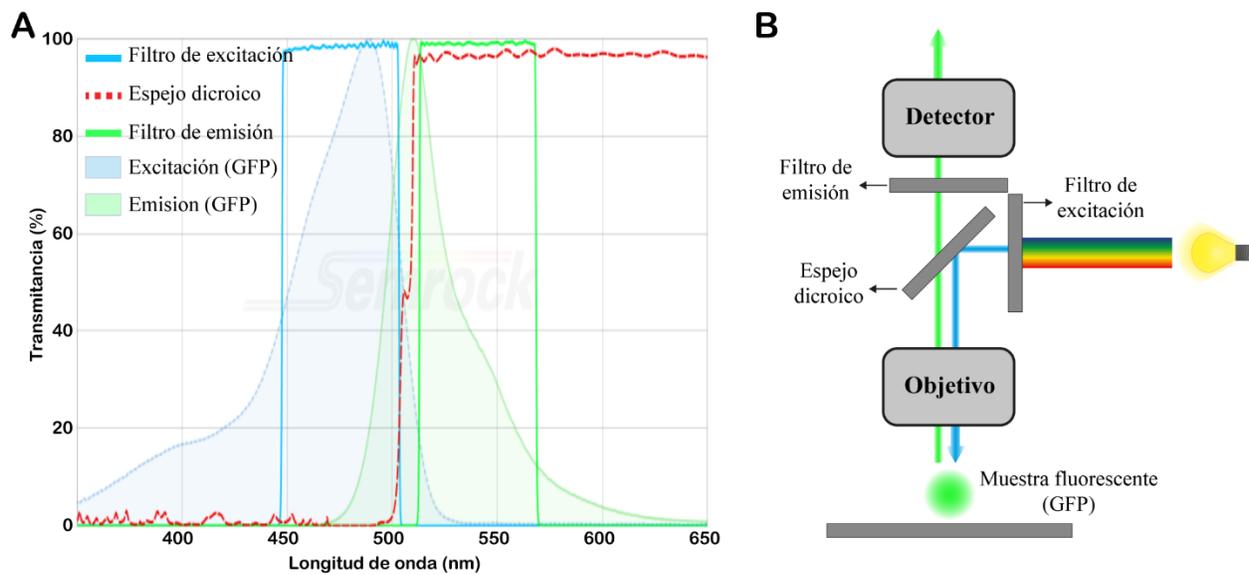
**Figura 13.** Diseño de la cámara de observación utilizada para el análisis de microgeles por microscopía de fluorescencia.

La cámara de observación fue colocada sobre la platina de un microscopio de fluorescencia invertido (LEICA, DMI3000-B). Para la observación de los microgeles, se emplearon objetivos de 60× (LEICA, NA=0.3) o 20× (LEICA, NA=0.3), según se requiriera. La excitación de la proteína GFP se logró mediante una lámpara de halógeno (PhotoFluor II, 89 North). La luz emitida por la lámpara se dirigió al arreglo óptico del microscopio a través de un cable de fibra óptica. Este arreglo consta de dos filtros y un espejo dicróico (Semrock, FITC-5050A/LP-C), permitiendo generar y observar la fluorescencia emitida por la GFP, la cual fue utilizada como fluoróforo para indicar el crecimiento bacteriano en este estudio. A continuación, se detallan los elementos que componen el conjunto de filtros en el microscopio.

- Filtro de excitación (FF02-475/50). Este filtro permite el paso de luz azul, a través de una franja que va de los 450 nm a los 500 nm. Estas longitudes de onda se encuentran dentro del espectro de absorción de la GFP, centrado en los 475 nm (Figura 14-A).
- Espejo dicróico (FF506-Di03). Los espejos dicróicos tienen la capacidad de reflejar luz con longitudes de onda por debajo de un punto crítico y permitir el paso de la luz por encima del mismo. En este trabajo, se utilizó un espejo que refleja la luz por debajo de los 506 nm y la transmite por encima del mismo (Figura 14-A).

- Filtro de emisión. (FF01-540/50). Este filtro solo permite el paso de luz entre los 515 nm y los 565 nm. De tal forma, permite filtrar toda la luz excepto la correspondiente a la emitida por la fluorescencia de GFP, la cual tiene un espectro de emisión centrado en los 510 nm (Figura 14-A).

Para generar y observar la fluorescencia de la GFP, la luz emitida por la lámpara de halógeno llega al microscopio y se encuentra con el filtro de emisión, la luz azul que pasa a través del filtro choca con el espejo dicroico y se refleja hacia el objetivo del microscopio llegando así a la cámara de incubación que contiene los microgeles con bacterias. Entonces, se excita el fluoróforo presente en la GFP y genera el fenómeno de fluorescencia. La GFP emite luz verde, parte de esta luz regresa a través del mismo objetivo del microscopio, atraviesa el espejo dicroico y se interseca con el filtro de emisión. Este último impide el paso de la luz remanente de los alrededores y selecciona solo la luz de fluorescencia, la cual sigue su camino hacia los lentes del microscopio o hacia algún detector (Figura 14-B). En este trabajo los microgeles fueron fotografiados haciendo uso de una cámara (Canon EOS Rebel T7) acoplada al microscopio.



**Figura 14. (A)** Espectros de transmitancia para cada uno de los componentes del arreglo de filtros y espejos utilizados en el microscopio de fluorescencia, así como espectro de absorción y emisión para la GFP expresada por las células de *E. coli*-GFP. **(B)** Esquema de la trayectoria que sigue la luz en un microscopio de fluorescencia.

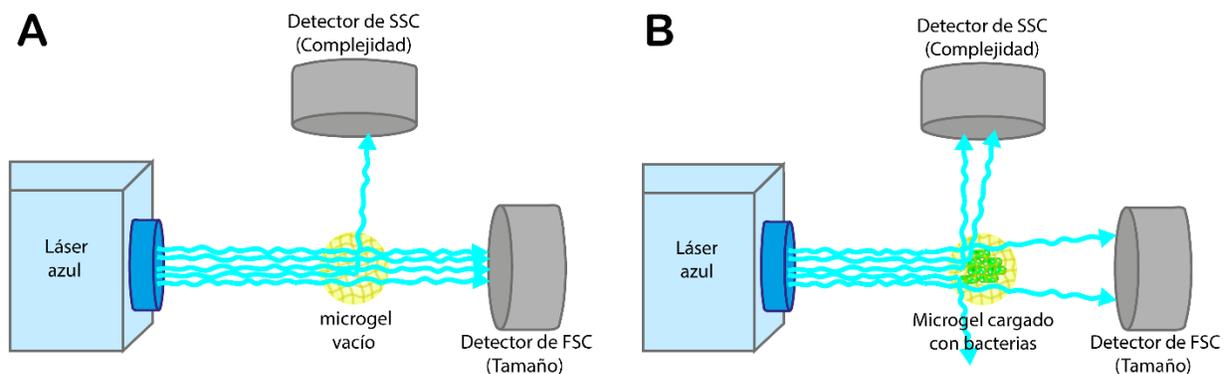
### 3.8. Transferencia de los microgeles desde la fase oleosa hacia una fase acuosa

Una vez que los microgeles han sido formados, incubados y analizados por microscopía, estos son transferidos desde la fase oleosa hacia la fase acuosa compuesta por medio de cultivo líquido 2YT. Para ello, utilizando una jeringa se retira tanto aceite como sea posible de la suspensión de microgeles.

Después, se agregan 30  $\mu\text{L}$  de 1H, 1H, 2H, 2H-Perfluorooctanol (PFO, Sigma-Aldrich) y 200  $\mu\text{L}$  de medio líquido 2YT. La mezcla resultante se agita durante 2 s y se centrifuga durante 15 s a 1000 rpm, lo que genera una mezcla bifásica. La fase inferior contiene el aceite fluorinado, tensoactivo y PFO, mientras que en la fase superior quedan los microgeles suspendidos en la fase acuosa 2YT. Con ayuda de una pipeta, se transfiere la fase acuosa hacia un microtubo limpio y estéril de 1.5 mL, y se ajusta el volumen hasta 1 mL con más medio líquido 2YT estéril. La suspensión de microgeles en fase acuosa se mantiene sumergida en hielo hasta su análisis mediante FACS.

### 3.9. Análisis, clasificación y recuperación de microgeles haciendo uso de FACS

El análisis y la clasificación de los microgeles cargados con bacterias se realizó haciendo uso del equipo de FACS Moflo XDP (Beckmann-Coulter) equipado con una boquilla de 70  $\mu\text{m}$  y operado con el software *Summit* en el modo de clasificación *Purify*. Se usó una solución comercial de PBS (Sigma) como fluido envolvente para citometría de flujo. Para el estudio de los microgeles, se utilizó láser azul de 488 nm como fuente de luz y un filtro de paso de banda de 529/28 nm para la detección de fluorescencia verde. El equipo de FACS, mediante el fluido envolvente, alinea cada microgel y lo hace pasar uno por uno frente al láser azul. De acuerdo con el tamaño, relacionado con la señal de *Forward Scatter* (FSC), y la complejidad del contenido del gel, relacionado con la señal de *Side Scatter* (SSC), la luz que incide sobre cada microgel se esparce de diferente manera y es recibida por los diferentes detectores del equipo de FACS (Figura 15-A y B). Cada grupo de microgeles fue recuperado con FACS en tubos de 1.5 mL independientes con 100  $\mu\text{L}$  de medio líquido 2YT previamente agregado.



**Figura 15.** Representación esquemática de la dispersión de la luz lateral (*Side Scatter*; SSC) y frontal (*Forward Scatter*; FSC) cuando (A) los microgeles vacíos o (B) microgeles cargados de bacterias son analizados mediante citometría de flujo.

### 3.10. Manipulación de los microorganismos recuperados por FACS para crecimiento a macroescala o para ciclos consecutivos de encapsulación y selección

Para cada muestra analizada, los microgeles recuperados con FACS se manipularon de manera independiente dentro de una campana de flujo laminar. Para la recuperación a macroescala, 50  $\mu$ L de cada muestra fueron sometidos a hasta 4 diluciones consecutivas 1 en 10 usando como diluyente medio líquido 2YT estéril. Posteriormente, por triplicado, 10  $\mu$ L de cada dilución se inocularon puntualmente en placas de agar 2YT que se secaron al aire durante 15 min. El volumen restante de perlas recuperadas sin dilución se esparció en placas 2YT independientes. Las colonias se contaron después de 48 h de incubación a 27 °C y la morfología de las colonias se evaluó visualmente y se registró mediante fotografía (Canon, EOS, Rebel SL3, EFS 18-55 mm). La detección de colonias fluorescentes se realizó mediante microscopía de fluorescencia colocando la caja Petri sobre la platina y observando con un objetivo 4 $\times$  (LEICA, 4 $\times$ /0.1).

Si en lugar de crecer a macroescala, los microorganismos recuperados mediante FACS se utilizaban para ciclos consecutivos de co-encapsulación con *E. coli*-GFP, seguido de incubación, análisis y selección. Entonces, después de cada ciclo, los microgeles recuperados mediante FACS eran utilizados para inocular 2 mL de medio líquido 2YT y se incubaban durante 18 horas a 27 °C. Posteriormente, estos cultivos de una noche eran tratados siguiendo el mismo procedimiento descrito en las secciones 3.5 a 3.9.

### 3.11. Muestra de saliva de perro

Para la toma de muestra de la saliva de perro, para cada experimento durante la mañana del día del experimento antes de alimentar al perro doméstico se le dio a morder una gaza estéril. Con el uso de guantes estériles, con la misma gaza se rasparon suavemente las encías y la lengua del perro. Inmediatamente después la gaza impregnada de saliva se sumergió en 20 mL de PBS estéril contenido dentro de un tubo Falcon de 50 mL. Después, el tubo Falcon con la gaza impregnada de saliva se mantuvo sumergido en hielo hasta su manipulación para encapsulación en microgeles.

Para la encapsulación, el tubo con la gaza se colocó sobre un vortex durante 15 s, después el líquido se pasó a través de un *cell strainer* con un tamaño de poro de 40  $\mu$ m recibiendo el filtrado sobre un nuevo tubo limpio y estéril. En el tubo Falcon aun con la gaza impregnada con saliva se agregaron 10 mL de PBS estéril nuevamente se mantuvo en vortex durante 15 s y filtrado a través del *cell strainer* recibiendo el filtrado dentro del mismo Falcon que se recibió el anterior filtrado. Este procedimiento se repitió una vez más.

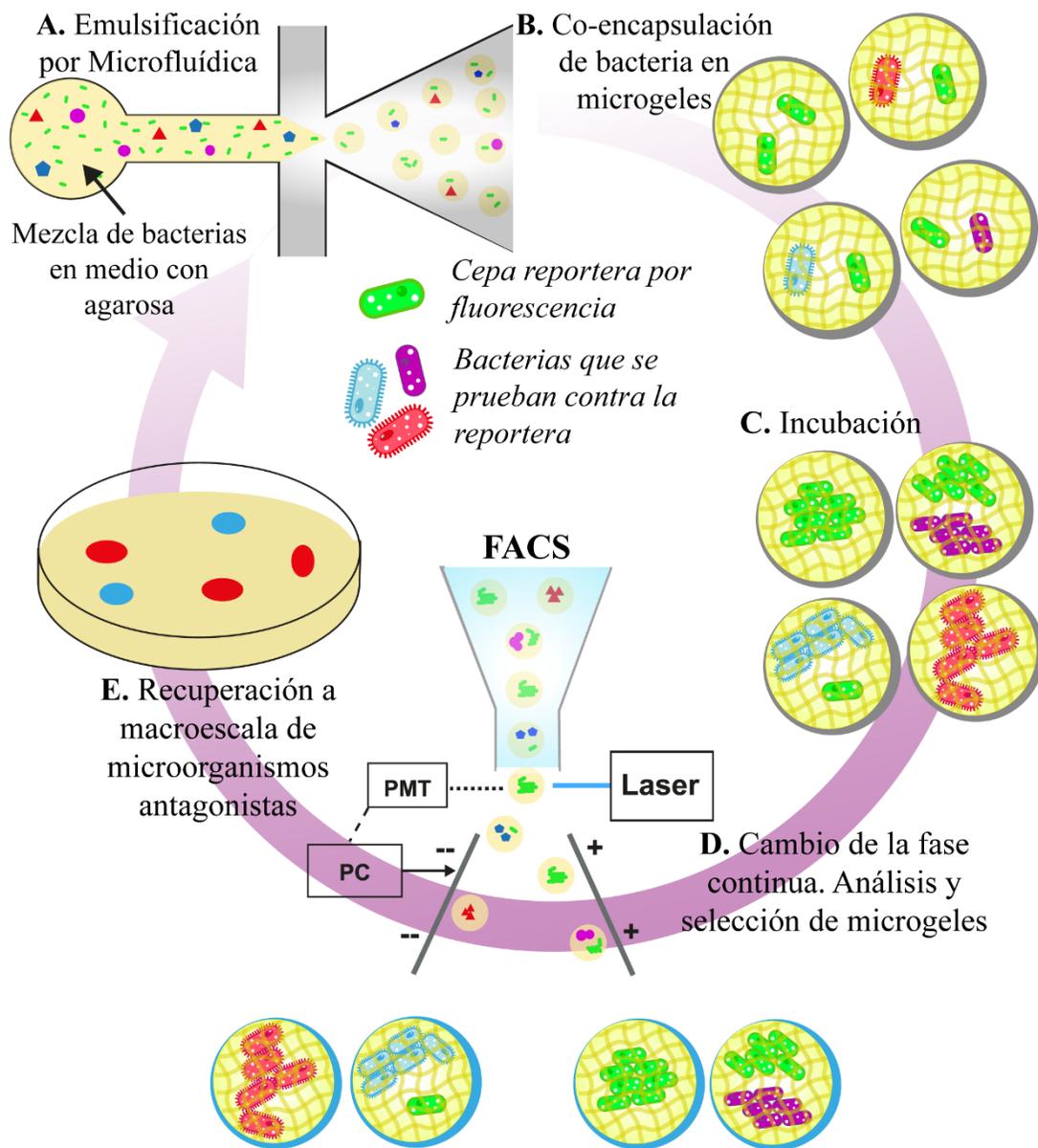
El tubo con el volumen filtrado obtenido en el párrafo anterior se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm, se retiró el sobrenadante y el *pellet* se re-suspendió en 1 mL de medio 2YT. De esta suspensión obtenida se tomaron 300  $\mu$ L y se trataron de la misma manera que el procedimiento descrito en la sección 3.5.1.

## 4. Resultados

#### 4.1. Descripción general de la metodología

Para demostrar la funcionalidad de la metodología se utilizó como cepa diana y reportera para la detección de microorganismos con actividad antagónica una cepa de *Escherichia coli* genéticamente modificada para expresar de manera constitutiva la proteína verde fluorescente (*E. coli*-GFP). Además, se trabajó con un conjunto modelo de tres cepas bacterianas diferentes previamente aisladas del maíz: *Bacillus velezensis* (NME26) y *Burkholderia sp.* (XM5) con actividad antagónica contra *E. coli*-GFP y *Peribacillus frigiditolerans* (NME255) sin actividad antibiótica. Para realizar los ensayos en los microgeles, las células de las tres cepas bacterianas del maíz se mezclaron y suspendieron junto con las bacterias de *E. coli*-GFP en un medio de cultivo líquido con agarosa de bajo punto de fusión al 1.5 % m/m. Luego, utilizando un dispositivo de microfluídica con un arreglo de canales de enfoque de flujo, la mezcla de bacterias se emulsionó a una frecuencia de 700 Hz en cientos de miles de microgotas de agua en aceite, cada una con un volumen de alrededor de 10 pL (Figura 16). Una vez formadas, para inducir su transición desde la fase fluida a una fase gel debido a la presencia de la agarosa disuelta, las microgotas se recibieron en un microtubo sumergido en hielo. De acuerdo con la distribución de Poisson,<sup>16</sup> se utilizó una alta densidad bacteriana de *E. coli*-GFP en la mezcla inicial tal que el 99.3% de todas las microgotas formadas incluyeran al menos una célula de *E. coli*-GFP. Por otro lado, se utilizó una baja densidad bacteriana de las tres cepas del maíz para que solo el 25.4% de las microgotas formadas lograra la co-encapsulación de células de *E. coli*-GFP junto con solo una célula bacteriana de alguna de las tres cepas del maíz presentes en la muestra (Figura 16).

Después de la gelificación, las microgotas, ahora denominadas microgeles, se incubaron fuera del dispositivo de microfluídica para permitir el crecimiento de microcolonias bacterianas en su interior. Durante esta incubación, los microgeles permanecen dispersos en la fase de aceite fluorado, lo que permite que tanto las bacterias encapsuladas como los metabolitos que segregan se mantengan dentro de los microgeles durante todo el proceso de incubación.<sup>54</sup> Si *E. coli*-GFP es encapsulada de manera independiente, se observa la proliferación de microcolonias verde fluorescentes dentro de los microgeles. Sin embargo, cuando se co-encapsula inicialmente *E. coli*-GFP con la cepa que carece de actividad antagónica, ambas cepas crecen dentro de un mismo microgel, lo que permite la observación del desarrollo de microcolonias fluorescentes y no fluorescentes en el mismo microgel. Por otro lado, si *E. coli*-GFP se co-encapsula con una cepa con actividad antagónica, tras el tiempo de incubación no se observa la formación de microcolonias fluorescentes, sino únicamente la proliferación de microcolonias sin fluorescencia (Figura 16).



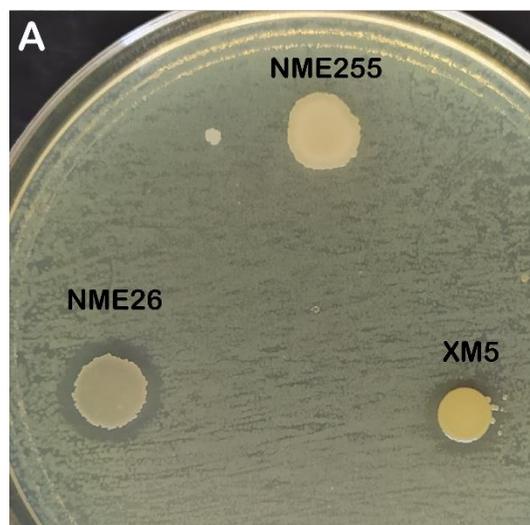
**Figura 16.** Resumen de la metodología propuesta para la identificación de microorganismos productores de metabolitos con actividad antibiótica haciendo uso de una plataforma de microfluídica. **(A)** Células de la cepa reportera con propiedades fluorescentes (*E. coli-GFP*) se mezclan con células de diferentes microorganismos con o sin actividad antibiótica. A esta suspensión bacteriana se le agrega agarosa al 1.5 % m/m y manteniendo la temperatura a 37 °C se emulsifica en cientos de miles de microgotas de agua en aceite. **(B)** Las microgotas se reciben en un microtubo de plástico sumergido en hielo favoreciendo así la transición de las microgotas a una fase gel, microgeles. **(C)** La emulsión se incuba a 27 °C hasta observar la formación de microcolonias bacterianas dentro de los microgeles. **(D)** La emulsión se transfiere desde la fase oleosa hacia una fase acuosa. Inmediatamente después, cada microgel se analiza haciendo uso de *Fluorescence Activated Droplet Sorting* (FACS) que permite separar cada microgel de acuerdo con su esparcimiento de la luz (ocupación bacteriana) e intensidad de fluorescencia (presencia de la cepa reportera). Una baja intensidad de fluorescencia, pero alto nivel de esparcimiento de la luz, indica la presencia de microorganismos antagónicos contra la bacteria reportera. **(E)** Los microorganismos encapsulados dentro de los microgeles seleccionados por su baja intensidad de fluorescencia pueden ser recuperados a macroescala o **(F)** ser utilizados para reintroducirlos en un ciclo más de la metodología.

Tras la incubación, los microgeles se transfieren desde la fase oleosa hacia una fase acuosa. Posteriormente, utilizando la técnica de citometría de flujo *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS), cada microgel se analiza y clasifica en función de su señal de dispersión de luz e intensidad de fluorescencia. FACS selecciona y recupera grupos de microgeles con propiedades similares y los separa en reservorios etiquetados como GFP(-) (geles con baja fluorescencia) y GFP(+) (geles con alta intensidad de fluorescencia) (Figura 16). Los microgeles seleccionados como GFP(-) encapsulan posibles microorganismos antagonistas contra *E. coli*-GFP, ya que hay que recordar que desde el inicio el 99.3% de los geles formados contenían *E. coli*-GFP. Estos microorganismos son recuperados en placas de agar para su posterior caracterización a macroescala o reintroducidos en un nuevo ciclo de la metodología para el enriquecimiento de la muestra con los microorganismos que poseen una mayor actividad antagónica contra *E. coli*-GFP (Figura 16).

#### 4.2. Ensayos a macroescala

Para demostrar la funcionalidad de la metodología propuesta, primero se evaluó la actividad antagónica contra *E. coli*-GFP de 50 diferentes cepas bacterianas previamente aisladas del maíz mexicano,<sup>52</sup> mediante ensayos *spot-on-lawn* sobre placas de agar. Derivado de estos ensayos se identificaron y seleccionaron tres especies bacterianas distintas: dos de ellas con la capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa reportera *E. coli*-GFP; y una más carente de esta capacidad antagonista (Figura 17).

La primera cepa antagonista seleccionada fue *Bacillus velezensis* (NME26), la cual desarrolló colonias planas de color gris y formó halos de inhibición cuando se cultivó sobre *E. coli*-GFP. La segunda cepa con actividad antagónica correspondió a *Burkholderia sp.* (XM5) presentó colonias amarillas que también inhibieron el crecimiento de *E. coli*-GFP sobre placas de agar. Finalmente, la cepa no antagonista seleccionada mediante este ensayo fue *Peribacillus frigiditolerans* (NME255), esta cepa desarrolla colonias voluminosas color marrón y no forma halos de inhibición cuando crece sobre *E. coli*-GFP (Figura 17).

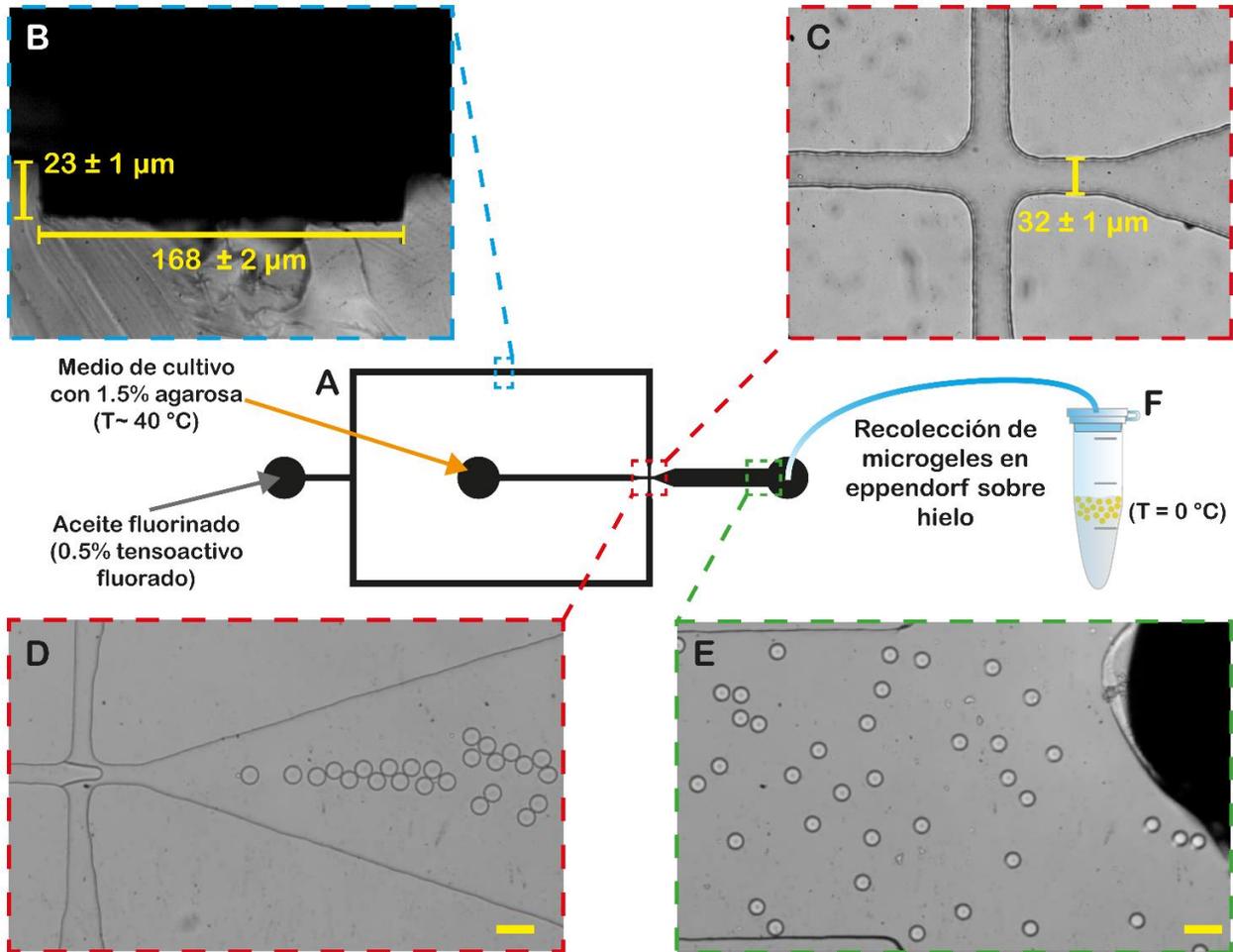


**Figura 17. (A)** Ensayo de *spot-on-lawn* para evaluar la actividad antagónica frente a *E. coli*-GFP de las tres bacterias diferentes aisladas del maíz mexicano: *Peribacillus frigoritolerans* (NME255), *Bacillus velezensis* (NME26) y *Burkholderia sp.* (XM5).

### 4.3. Caracterización de los canales y producción de microgeles

Mediante la técnica de fotolitografía se construyó un molde maestro con un diseño de dos microcanales diferentes que se intersecan mediante un arreglo de enfoque de flujo (Figura 18-A). En la primera entrada se inyecta la fase oleosa, aceite fluorinado con tensoactivo disuelto; en la segunda se introduce la fase acuosa, medio de cultivo con agarosa disuelta al 1.5 %m/m ya sea estéril o con bacterias suspendidas. Ambas fases se intersecan y forman una emulsión de gotas de agua en aceite que fluyen hacia la salida del microchip (Figura 18-A). A partir del molde maestro se obtuvieron réplicas de PDMS que se unieron a una superficie de vidrio para obtener los dispositivos de microfluídica para la formación de microgotas.

Para la caracterización de las dimensiones de los canales obtenidos, se realizaron cortes transversales de los canales en algunos duplicados de PDMS sin haber sido unidos al vidrio. El análisis por microscopía de estas secciones transversales permitió determinar que la altura promedio de los canales en todo el diseño fue de  $23\pm 1\ \mu\text{m}$  (Figura 18-B). Mediante el análisis del plano frontal en la zona de intersección de ambas fases se determinó una reducción en el ancho de los canales desde  $168\pm 2\ \mu\text{m}$  (Figura 18-B) hasta  $32\pm 1\ \mu\text{m}$  (Figura 18-C). Esta reducción en el ancho incrementa la velocidad del flujo de la fase oleosa y la fase acuosa favoreciendo así la formación de las microgotas de agua en aceite (Figura 18-D). La emulsión recién formada sale del microchip y se recolecta en un microtubo sumergido en hielo (Figura 18-E y F). Debido a la agarosa disuelta en la fase acuosa, la disminución de la temperatura favorece la gelificación de las microgotas y por lo tanto la formación de los microgeles.



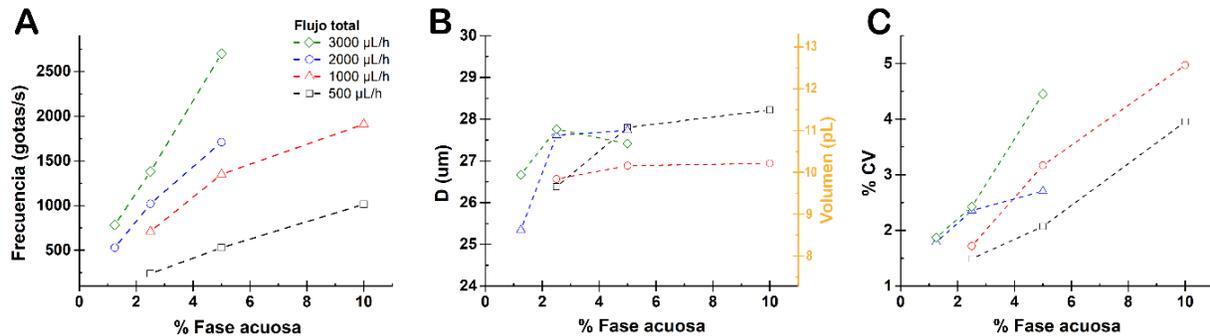
**Figura 18.** (A) Diseño canales de microfluídica utilizados para la formación de microgotas. (B) Ejemplo del corte transversal a uno de los canales de un duplicado de PDMS utilizado para caracterización de las dimensiones por microscopia (objetivo 20X). (C) Vista superior (plano frontal) de la intersección agua-aceite de arreglo de canales (objetivo 20X). (D) Formación de microgotas de medio 2YT con 1.5 % de agarosa, en esta sección la temperatura del medio es alrededor de los 40 °C por lo que la fase acuosa es fluida (objetivo 10X), barra de escala 50 μm. (E) Salida de las microgotas recién formadas (objetivo 10x). (F) Las microgotas se transfieren hacia un eppendorf sobre hielo para inducir la gelificación por disminución de la temperatura, barra de escala 50 μm.

#### 4.4. Dinámica de la formación de microgeles en el rango de flujos utilizado

Haciendo uso del diseño presentado en la figura anterior, se llevó a cabo un estudio en la dinámica de formación de microgeles a diferentes flujos totales (500, 1000, 2000 y 3000 μL/h) y a diferentes proporciones de la fase acuosa respecto al flujo total: 10, 5, 2.5 y 1.25%. El efecto de estos cambios en los flujos impacta directamente en la frecuencia a la cual se forman los microgeles y en menor medida en el diámetro y la dispersión del tamaño.

La frecuencia de formación de microgotas es directamente proporcional al flujo total y a la proporción de la fase acuosa. A los flujos utilizados se obtuvieron frecuencias de formación en un intervalo entre 200 y 2700 Hz (Figura 19-A), la frecuencia de formación se determinó mediante el análisis de videos de la

formación de microgotas con el software PCC 2.2, ver sección 3.6. A diferencia del rango de frecuencias obtenidas, el diámetro de las microgotas aumenta en un intervalo pequeño entre 25 y 30  $\mu\text{m}$  que corresponde a volúmenes entre 8 y 12 pL (Figura 19-B). El coeficiente de variación (%CV) en el tamaño de las microgotas es siempre menor al 5% (Figura 19-C). Ambos parámetros, el tamaño y su dispersión, aumenta directamente con la proporción de la fase acuosa. Sin embargo, la dependencia con el flujo total no está tan bien definida como si se observó con las frecuencias de formación.



**Figura 19.** (A) Se presenta la relación entre la frecuencia de formación de microgeles y la proporción de fase acuosa en el flujo total, a distintas tasas de flujo totales. (B) Diámetro, volumen y (C) coeficiente de variación en el tamaño de los microgeles formados a las diferentes condiciones de flujo utilizadas.

Los cambios en la frecuencia de formación, tamaño y dispersión se pueden explicar mediante el análisis de la dinámica de formación de microgeles en la zona de intersección de ambas fases. En esta zona, el flujo de aceite ejerce presión por ambos flancos del flujo de la fase acuosa, esto genera un adelgazamiento de la fase acuosa hasta formar un hilo que mantiene unida a la gota naciente con el flujo continuo de agua, eventualmente, este hilo se rompe dando lugar a una microgota (Figura 20). El proceso se repite múltiples veces con frecuencias que crecen de manera proporcional con el aumento en el caudal de ambas fases. Sin embargo, conforme aumenta la proporción de la fase acuosa y la tasa total de flujo, la dinámica de la formación de las microgotas cambia y genera las irregularidades observadas en las tendencias a las que cambia el tamaño y la dispersión (Figura 19-B y C).

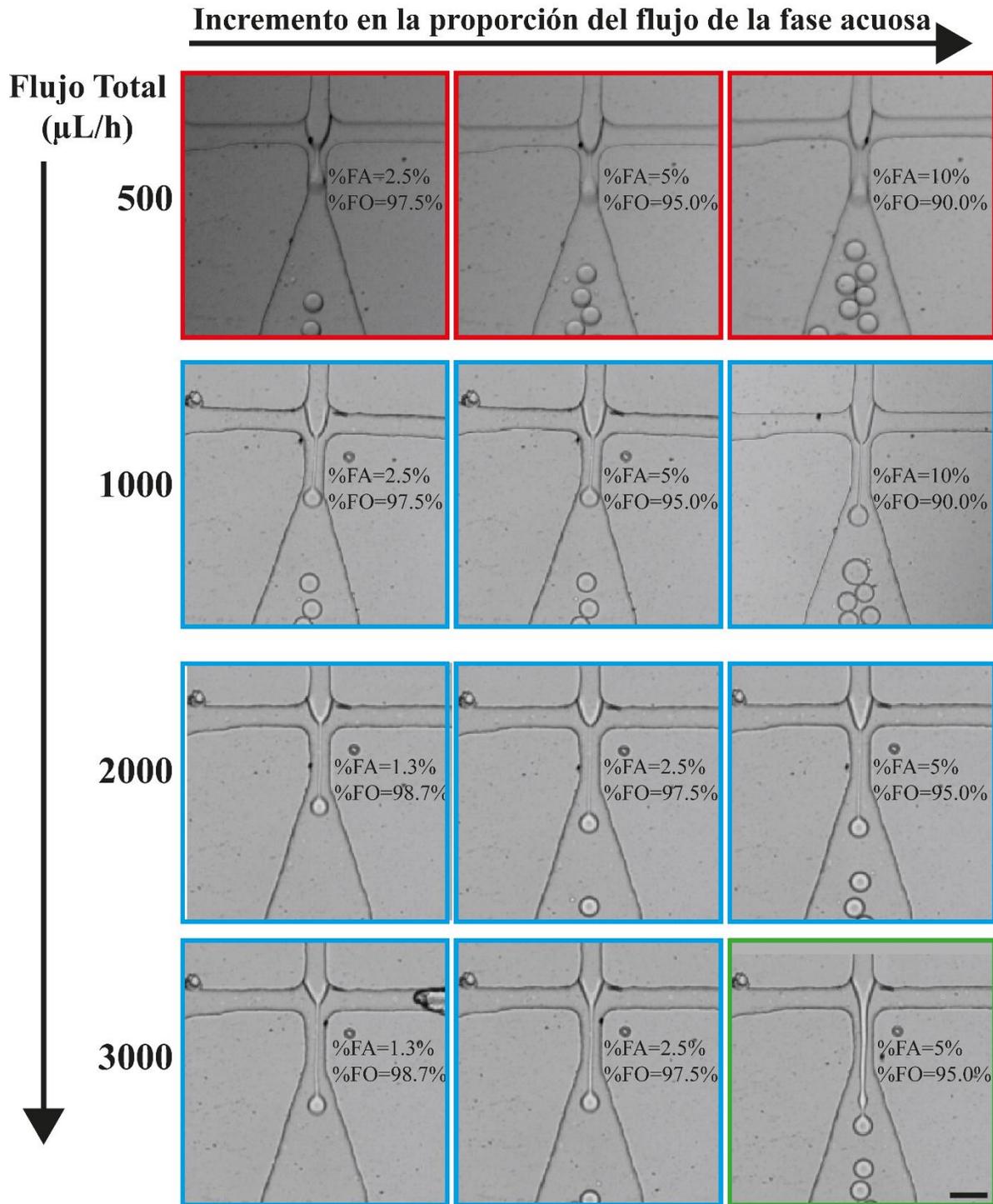
En la figura 20 se muestra el último cuadro captado con la cámara rápida justo antes de que el hilo de fase acuosa se rompa y de lugar a una gota completamente aislada. Cuando el flujo total es 500  $\mu\text{L/h}$ , el más bajo utilizado, el hilo se rompe justo antes de que la microgota naciente entre a la parte del canal donde las dimensiones se ensanchan. Esta dinámica de formación de microgotas ha sido descrita y denominada previamente como *dripping*,<sup>16,55</sup> la cual depende principalmente de la presión que ejerce la fase oleosa sobre la acuosa. Por lo tanto, mientras la dinámica *dripping* se mantenga, el diámetro de las microgotas

cambia directamente con el incremento de la proporción de la fase acuosa y con variaciones en el tamaño de los microgeles menores al 4% (Figura 19-C).

La dinámica de formación de microgotas cambia con el aumento de la tasa total de flujos y la proporción de la fase acuosa en la misma. A flujos igual o mayores que 1000  $\mu\text{L/h}$  el hilo de fase acuosa se rompe más allá de donde se comienza a ensanchar el canal de microfluídica (Figura 20), dicho fenómeno corresponde a la dinámica de formación de microgotas conocida como *thread-formation*.<sup>56</sup> Debido a que la dinámica de formación de las microgotas cambia entre 500 y 1000  $\mu\text{L/h}$ , el tamaño de los microgeles no cambia de manera proporcional con el aumento de la tasa de flujo (Figura 19-B).

Sin embargo, una alteración importante en la dinámica de *thread-formation* se observa cuando el flujo total es 3000  $\mu\text{L/h}$  y la proporción de la fase acuosa es igual al 5% (la mayor utilizada a ese flujo total). A esta nueva dinámica se le conoce como *jetting*.<sup>57</sup> Bajo este régimen la interfase agua aceite comienza a desestabilizarse formando ondulaciones que generan un cambio importante en el diámetro de los microgeles y en la distribución de tamaño (Figura 19-B). A estas velocidades los fenómenos en la interfase son gobernados principalmente por la viscosidad de las fases involucradas más que por la presión ejercida por la fase oleosa sobre la acuosa.

Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente.<sup>55-57</sup> A las razones de flujo utilizadas, solo se lograron observar 3 de los 4 regímenes de flujos que ya han sido reportados. Con base en estos resultados, si se quisiera disminuir el tamaño de microgota se estudiaría como primera opción reducir el tamaño de la intersección agua-aceite o bien probar otras razones de flujo a las aquí reportadas.



**Figura 20.** Análisis de la dinámica de formación de microgotas a diferentes flujos totales y proporciones entre el flujo de la fase oleosa (FO) y el de la fase acuosa (FA), barra de escala 50 μm. En rojo se indican las proporciones a las cuales las microgotas se formaron bajo el régimen *dripping*, en azul *thread-formation* y en verde *jetting*.

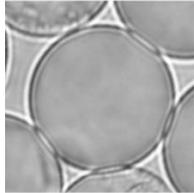
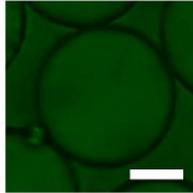
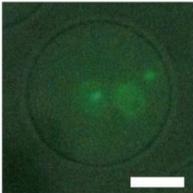
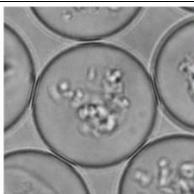
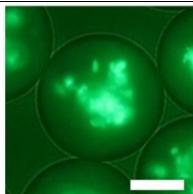
#### 4.5. Encapsulación y crecimiento de microorganismos en microgeles

Derivado del análisis presentado en la sección anterior, todos los experimentos que se describen a continuación se llevaron a cabo con un flujo de la fase acuosa de 30  $\mu\text{L/h}$  y de la fase oleosa a 1200  $\mu\text{L/h}$ . Esto permitió una frecuencia de formación de 700 microgeles por segundo con un diámetro promedio de  $27 \pm 2 \mu\text{m}$  (Figura 19). La fase acuosa correspondió al medio de cultivo 2YT en el que de manera independiente se suspendieron las diferentes cepas bacterianas y se encapsularon en microgeles siguiendo el procedimiento descrito en la sección de metodología.

##### 4.5.1. Análisis por microscopía del crecimiento bacteriano dentro de los microgeles

Mediante microscopía de fluorescencia y de campo claro se observó y estudió el crecimiento bacteriano dentro de los microgeles a diferentes condiciones. Se llevó a cabo la comparación entre una muestra de microgeles vacíos y ocho muestras independientes de microgeles cargados con cepas diferentes o incubados a diferentes condiciones de temperatura, según se indica en la Tabla 2.

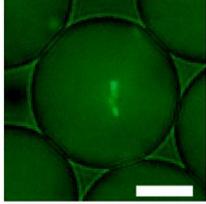
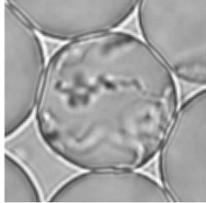
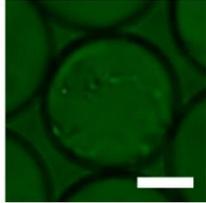
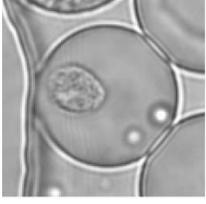
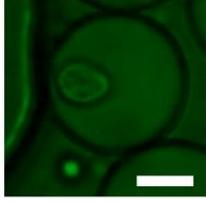
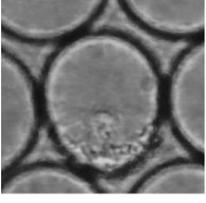
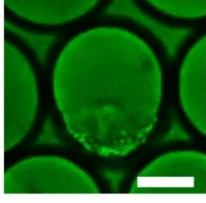
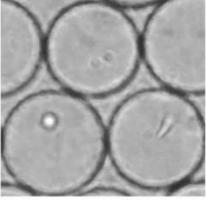
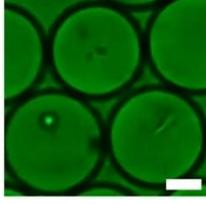
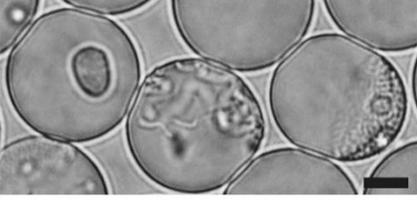
**Tabla 2.** Muestras utilizadas para caracterizar el crecimiento bacteriano de diferentes cepas dentro de microgeles. Barra de escala 10  $\mu\text{m}$ .

Muestra	Cepa(s) encapsulada(s)	Densidad bacteriana inicial (UFC <sup>a</sup> /mL)	Condiciones de incubación antes de inspección por microscopía	Imagen típica de microscopía	
				Campo claro	Campo Fluorescente
1	Ninguna Geles vacíos	0 ( $\lambda^b=0$ )	Sin incubación		
2	<i>E. coli</i> -GFP	$4.9 \times 10^8$ ( $\lambda=5$ )	Sin incubación		
3	<i>E. coli</i> -GFP	$4.9 \times 10^8$ ( $\lambda=5$ )	18 h a 27 °C		

<sup>a</sup> UFC-Unidades Formadoras de Colonia;

<sup>b</sup>  $\lambda$ -Promedio de la cantidad de células bacterianas encapsuladas por microgel.

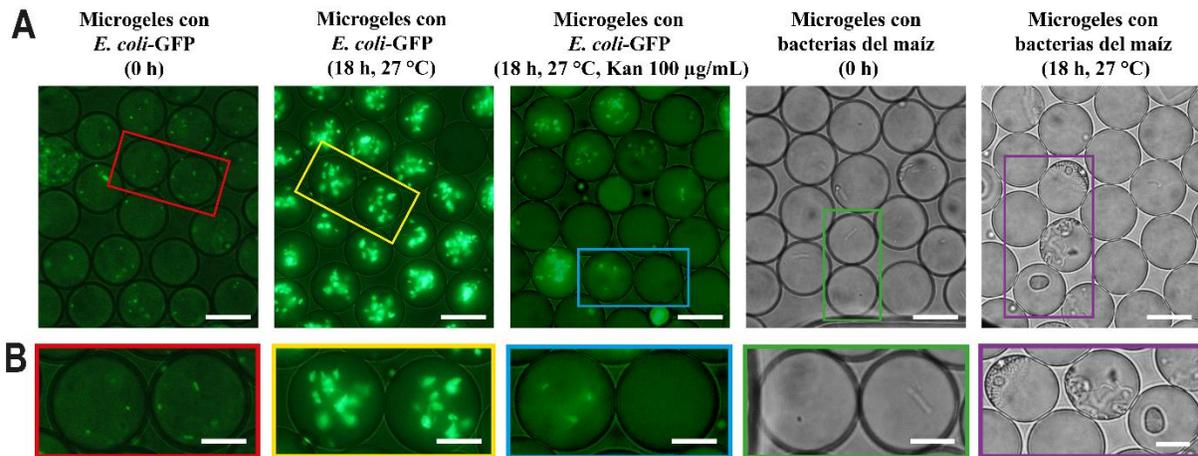
**Tabla 2. (Continuación).** Muestras de microgeles cargados con bacterias utilizadas para caracterizar el crecimiento bacteriano de diferentes cepas dentro de microgeles. Barra de escala 10  $\mu\text{m}$ .

Muestra	Cepa(s) encapsulada(s)	Densidad bacteriana inicial (UFC/mL)	Condiciones de incubación antes de inspección por microscopía	Imagen típica de microscopía	
				Campo claro	Campo Fluorescente
4	<i>E. coli</i> -GFP	$4.9 \times 10^8$ ( $\lambda=5$ )	18 h a 27 °C y kanamicina disuelta en los microgeles a 100 $\mu\text{g/mL}$	Sin fotografía	
5	NME255	$9.7 \times 10^6$ ( $\lambda=0.1$ )	18 h a 27 °C		
6	XM5	$9.7 \times 10^6$ ( $\lambda=0.1$ )	18 h a 27 °C		
7	NME26	$9.7 \times 10^6$ ( $\lambda=0.1$ )	18 h a 27 °C		
8	Mezcla de NME255, XM5 y NME26	$9.7 \times 10^6$ Por cepa ( $\lambda_{\text{global}}=0.3$ )	Sin incubación		
9	Mezcla de NME255, XM5 y NME26	$9.7 \times 10^6$ Por cepa ( $\lambda_{\text{global}}=0.3$ )	18 h a 27 °C		

<sup>a</sup> UFC-Unidades Formadoras de Colonia;

<sup>b</sup>  $\lambda$ -Promedio de la cantidad de células bacterianas encapsuladas por microgel.

Los microgeles vacíos presentan una superficie lisa y sin fluorescencia (Tabla 2, muestra 1). Sin embargo, cuando se encapsulan células de *E. coli*-GFP, a las 0 h de incubación dentro de los microgeles ocupados por bacterias se observan puntos fluorescentes que corresponden a las UFC de *E. coli*-GFP (Tabla 2, muestra 2). Después de 18 horas de incubación a 27 °C (Tabla 2, muestra 3), se desarrollan microcolonias fluorescentes de color verde dentro de los microgeles cargados con *E. coli*-GFP, produciendo rugosidad en la apariencia de la microgota y una mayor intensidad de fluorescencia con respecto a las células individuales observadas a las 0 horas (Tabla 2). Sin embargo, en la Muestra 4 de la tabla 2, donde los microgeles contenían disuelta la kanamicina no se observó el crecimiento de *E. coli*-GFP después de 18 horas de incubación (Figura 21). Además, la proporción de microgeles cargados con *E. coli*-GFP en esta muestra disminuyó al 70%, según lo evaluado mediante microscopía de fluorescencia para una muestra de 250 microgeles (Figura 21). Estas observaciones sugieren fuertemente que la actividad antibiótica de la kanamicina condujo a una incorrecta producción de proteínas en las células seguido de una desestabilización de la membrana de estas y culminando con la desintegración de algunas bacterias inicialmente encapsuladas dentro de los microgeles, este fenómeno explicaría el aumento en la proporción de geles vacíos después del tiempo de incubación.



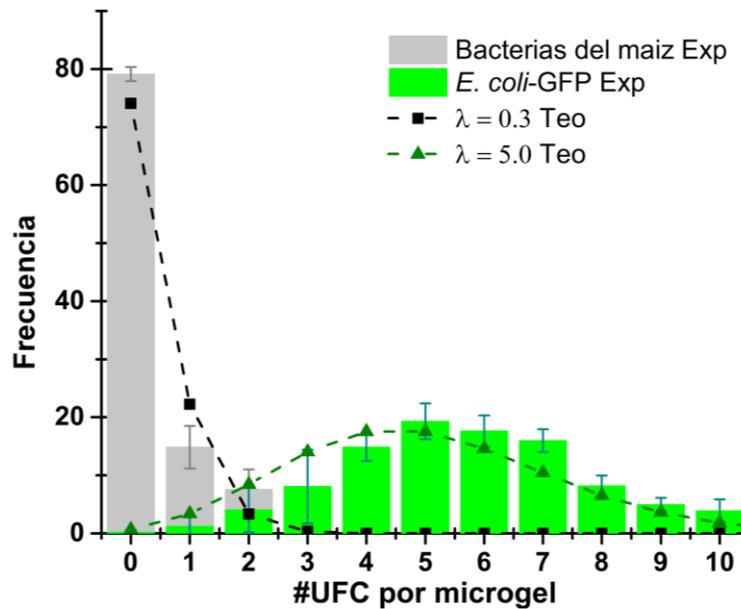
**Figura 21.** (A) En los tres primeros paneles se presentan imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de muestras de microgeles que contienen *E. coli*-GFP, mientras que los dos últimos paneles muestran imágenes de microscopía de campo claro de microgeles que encapsulan cepas bacterianas aisladas del maíz. Las muestras se incubaron a diferentes condiciones según se indica en la parte superior de cada imagen, barra de escala igual a 25 µm. (B) Acercamiento a microgeles seleccionados en el panel A con los recuadrados rojo, amarillo, azul, verde y morado, las imágenes han sido rotadas. Barra de escala igual a 10 µm. El recuadrado morado de arriba abajo se muestra un ejemplo de microcolonias de XM5, NME255 y NME26.

A diferencia de *E. coli*-GFP, las tres cepas bacterianas aisladas del maíz carecen de propiedades fluorescentes (Tabla 2, Muestras 5 a 9). No obstante, mediante imágenes de campo brillante, se logra apreciar con mayor nitidez el crecimiento bacteriano y la morfología de las microcolonias que se forman en el interior de los microgeles. Al analizar estas imágenes, se identificó que las microcolonias de NME255

presentan una morfología de hebras que se extienden dentro del microgel (Tabla 2, Muestra 5), mientras que XM5 muestra microcolonias semicirculares (Tabla2, Muestra 6). Por su parte, NME26 suele desarrollar microcolonias que se adhieren a las superficies de los microgeles, lo que genera rugosidad en la interfaz entre los microgeles y la fase oleosa (Tabla2, Muestra 7). En las Muestras 8 y 9 de la tabla 2, se mezclaron en proporciones iguales las tres cepas aisladas del maíz. Para la muestra sin incubación, la carencia de fluorescencia en las bacterias dificulta diferenciar entre los microgeles cargados con bacterias y los vacíos. Sin embargo, después de 18 h de incubación, claramente se pueden distinguir microgeles que encapsulan una sola cepa bacteriana con las morfologías características identificadas en las muestras 5 a 7 de la tabla 2.

#### 4.5.2. *Distribución de microorganismos encapsulados por microgel (Distribución de Poisson)*

La densidad bacteriana inicial de cada muestra se eligió para obtener el número promedio deseado de bacterias encapsuladas por microgel ( $\lambda$ ) y se calculó de acuerdo con la distribución teórica de Poisson (ANEXO I. Distribución de Poisson) (Figura 22, líneas punteadas). La densidad inicial de *E. coli*-GFP mencionada en la Tabla 2 corresponde a  $\lambda$  igual a 5. De tal forma, el 99.3% de todos los microgeles que se producen resultan ocupados por al menos una célula de *E. coli*-GFP. Por el contrario, la menor densidad bacteriana utilizada para la mezcla de las cepas del maíz correspondió a  $\lambda_{\text{global}}$  igual a 0.3 (0.1 para cada cepa presente en las muestras 8 y 9 de la tabla 2). Teóricamente, esto produce un 74.1% de microgeles vacíos y el 25.9% ocupados por una sola célula bacteriana. El análisis experimental de microscopía de fluorescencia y de campo claro de las muestras de microgeles recién formados (Sin incubación) coincidió con la distribución teórica (Figura 22): en el caso de *E. coli*-GFP (Muestra 2), la proporción experimental de microgeles cargados de bacterias fue del 96.7%; y para la muestra 9 fue del 19.2 %. Para esta, la muestra 9, la proporción de microgeles vacíos y cargados con bacterias del maíz es consistente con los previsto con la distribución de Poisson. Este resultado sugiere que las bacterias dentro de los microgeles no se liberan ni se mezclan con otras durante el tiempo de incubación. Por lo tanto, cada microgel es un ensayo independiente y la incubación en aceite previene la contaminación cruzada. Este fenómeno también se demostró para *E. coli*-GFP (ANEXO III. Contaminación entre microgeles).



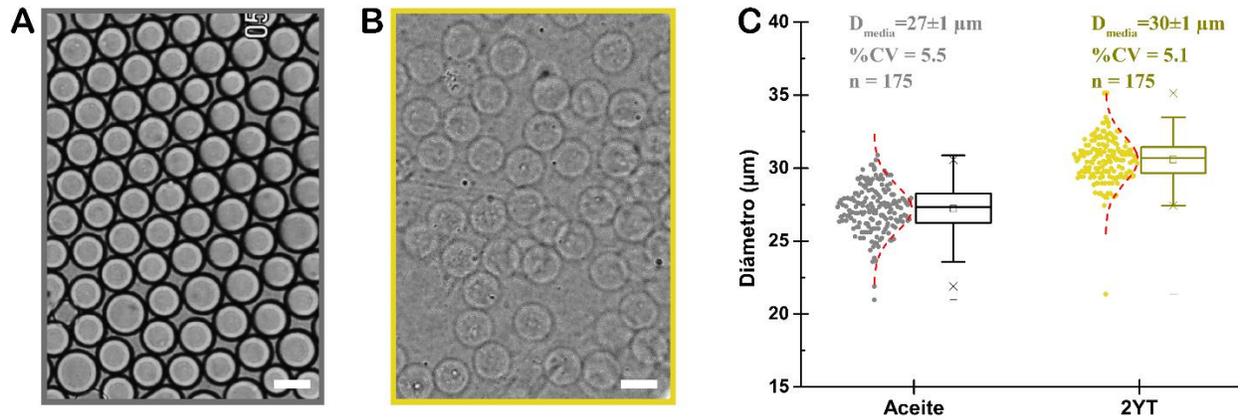
**Figura 22.** Distribución teórica de Poisson (líneas punteadas) y determinación experimental por microscopía (gráficos de barras del número de células encapsuladas por microgel para las diferentes muestras utilizadas. Las barras de error corresponden a la encapsulación de bacterias dentro de microgeles en tres experimentos diferentes. En cada caso se analizaron alrededor de 250 microgeles para obtener la distribución. El parámetro  $\lambda$  de la distribución de Poisson representa el valor promedio de bacterias encapsuladas por microgel.

#### 4.6. Transferencia de los microgeles desde la fase oleosa hacia medio líquido 2YT

Después del análisis por microscopía, de manera independiente para las diferentes muestras de microgeles se rompió la emulsión, de acuerdo con lo descrito en la sección 3.8, y los microgeles fueron transferidos desde la fase oleosa hacia medio de cultivo 2YT limpio y estéril. Durante el proceso de transferencia de fase se mantuvo la integridad de los microgeles, pero en el último escenario, donde los microgeles se encuentran suspendidos en una fase acuosa, la diferencia entre los índices de refracción de los microgeles y la fase continua dificulta la visualización. Por lo tanto, es necesario aumentar de manera digital el contraste de las imágenes adquiridas para favorecer la visualización de los microgeles (Figura 23 A y B). Además, el proceso genera un incremento del 11% en el tamaño de los microgeles, resultando con un diámetro promedio de  $30 \pm 1 \mu\text{m}$  y con un coeficiente de variación del 5.1% (Figura 23-C). Este ensanchamiento sugiere la entrada de agua dentro de los microgeles. Dicho fenómeno se disminuye regulando la presión osmótica, utilizando como fase dispersante el medio 2YT, que es el mismo del que se componen los microgeles.

El cambio de la fase dispersante de los microgeles habilita el análisis posterior y selección de los microgeles con FACS en función del crecimiento bacteriano que se produce en su interior. Durante este proceso de análisis y selección con FACS, cada microgel pasa a través de una boquilla que posee un diámetro de salida

de 70  $\mu\text{m}$ . Por lo tanto, para asegurar que las partículas analizadas no obstruyan la salida de la boquilla, es necesario que el diámetro de dichas partículas no sea mayor a los 30  $\mu\text{m}$ . El diámetro promedio de los microgeles dispersos en la fase acuosa se encuentra dentro de este rango, lo que los convierte en adecuados para su análisis mediante el equipo de FACS utilizado.

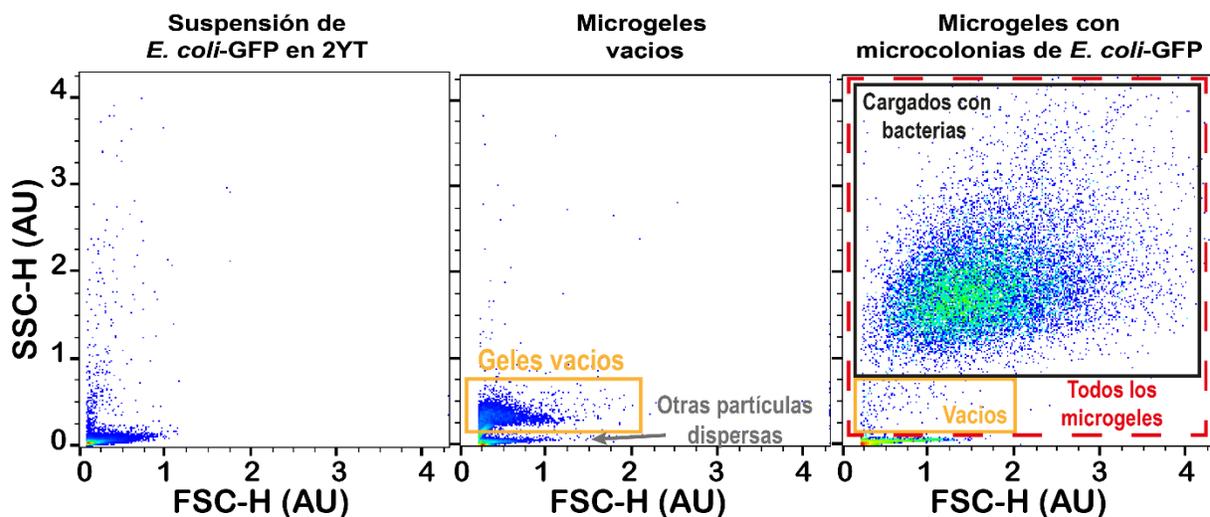


**Figura 23.** Transferencia de microgeles desde la fase oleosa hacia la fase acuosa. (A) Muestra representativa de microgeles dispersos en aceite y (B) microgeles dispersos en la fase acuosa, medio 2YT, barra de escala 20  $\mu\text{m}$ . (C) Tamaño de los microgeles dispersos tanto en aceite como en medio 2YT.

#### 4.7. Caracterización del crecimiento bacteriano dentro de microgeles por citometría de flujo

##### 4.7.1. Señales de esparcimiento de la luz de los microgeles

Inmediatamente después de transferir los microgeles desde la fase oleosa hacia la fase acuosa, se llevó a cabo su análisis mediante citometría de flujo. Este estudio incluyó una exploración de todas las combinaciones posibles entre los parámetros de esparcimiento de la luz (SSC versus FSC) obtenidos para muestras de microgeles vacíos, así como para microgeles ocupados por microcolonias bacterianas (ANEXO IV). Mediante este análisis, se seleccionaron los diagramas de densidad de puntos que relacionan la altura de la señal de esparcimiento lateral de la luz (SSC-H) contra la altura de la señal de esparcimiento frontal (FSC-H). Esta relación permite identificar claramente los microgeles ocupados por microcolonias de bacterias y diferenciarlos de los microgeles vacíos, bacterias no encapsuladas y otras partículas no bacterianas (tal como los restos de agarosa que se producen por la ruptura de algunos microgeles) suspendidas en la muestra (Figura 24).

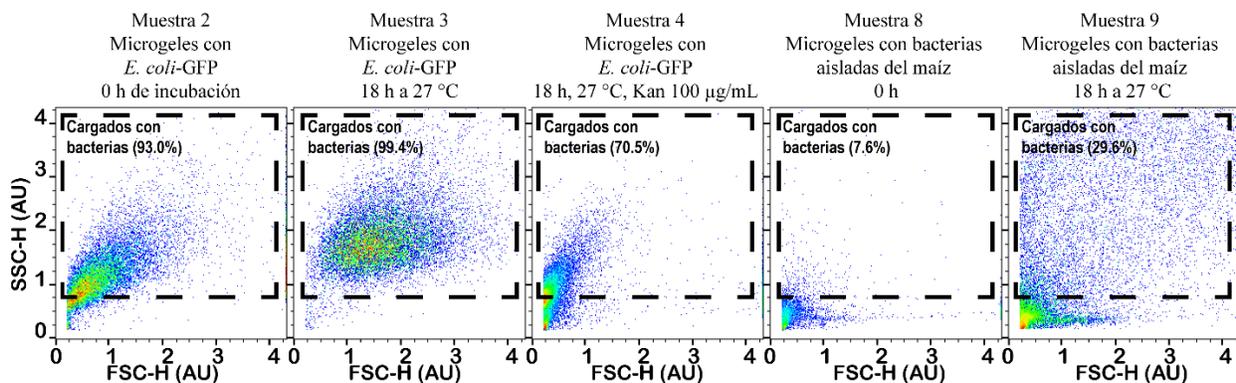


**Figura 24.** Gráficos de densidad de puntos obtenidos haciendo uso de FACS para: izquierda, bacterias no encapsuladas y suspendidas en medio líquido 2YT; al centro, muestra de microgeles vacíos; y a la derecha, una muestra de microgeles con microcolonias encapsuladas de *E. coli*-GFP. En función de la señal de esparcimiento de la luz obtenida para las bacterias libres y los microgeles vacíos, los microgeles cargados con *E. coli*-GFP fueron seleccionados dentro de la ventana denominada como *Cargados con Bacterias* (recuadro negro en el panel de la derecha). El gradiente de color en los diagramas representa la densidad de puntos en esa región, rojo mayor densidad de puntos, seguido por amarillo, verde y azul las regiones de menor densidad.

Las señales de FSC están asociadas al tamaño de las partículas, mientras que SSC está vinculado a la complejidad de las partículas analizadas mediante citometría de flujo. En el caso de las bacterias no encapsuladas en microgeles, la señal de FSC-H se encuentra típicamente por debajo de 1.25 unidades arbitrarias (UA), mientras que la señal de SSC-H tiende a concentrarse por debajo de 0.25 UA. Los eventos registrados por encima de este valor podrían atribuirse a agregados bacterianos, los cuales son comunes en suspensiones bacterianas (Figura 24, panel izquierdo). Por otro lado, los microgeles vacíos presentan señales de FSC-H con intensidades similares a las de las bacterias libres, pero se observa una señal característica de SSC-H en el rango de 0.25 y 0.75 UA (Figura 24, panel central). En contraste, los microgeles con 18 h de incubación ocupados por microcolonias de *E. coli*-GFP exhiben una señal que abarca todo el rango de FSC-H y una señal de SSC-H mayor que 0.75 UA, región que se indica con el recuadro negro en el panel derecho de la Figura 24.

Después de identificar las regiones de esparcimiento de la luz para microgeles vacíos y ocupados, se realizó una comparación entre cinco muestras distintas de microgeles ocupados por bacterias. Las muestras seleccionadas para este análisis fueron las muestras 2 a 4 (Tabla 2) que corresponden a los microgeles cargados con *E. coli*-GFP ( $\lambda = 5$ ), tanto sin incubación, así como después de 18 h de incubación a 27 °C, con o sin kanamicina disuelta. Además, se compararon las muestras 8 y 9 (Tabla 2) que corresponden a los microgeles formados a partir de una mezcla de las bacterias aisladas del maíz ( $\lambda = 0.3$ ) y que fueron

analizados sin incubación y después de 18 h de incubación a 27 °C, respectivamente. Las señales de esparcimiento de la luz (SSC-H vs FSC-H) obtenidas de manera independiente para cada muestra se presentan en la Figura 25. En estos gráficos se están considerando sólo los eventos que corresponden a microgeles tanto vacíos como ocupados y se han excluido las posibles bacterias no encapsuladas y otras partículas suspendidas. Para cada muestra, los microgeles cargados con bacterias han sido encerrados dentro del recuadro negro sobre cada panel que se presenta en la Figura 25.



**Figura 25.** Gráficos de densidad de puntos para las señales de esparcimiento de la luz (SSC-H vs FSC-H) obtenidas por citometría de flujo de diferentes muestras de microgeles según se indica en la parte superior de cada imagen. El número de muestra corresponde al indicado en la Tabla 2. Los microgeles cargados con bacterias han sido seleccionados dentro del recuadro color negro, se indica el porcentaje de eventos dentro del recuadro con respecto al total de eventos considerados microgeles ya sean vacíos u ocupados. El gradiente de color en los diagramas representa la densidad de puntos en esa región, rojo mayor densidad de puntos, seguido por amarillo, verde y azul las regiones de menor densidad.

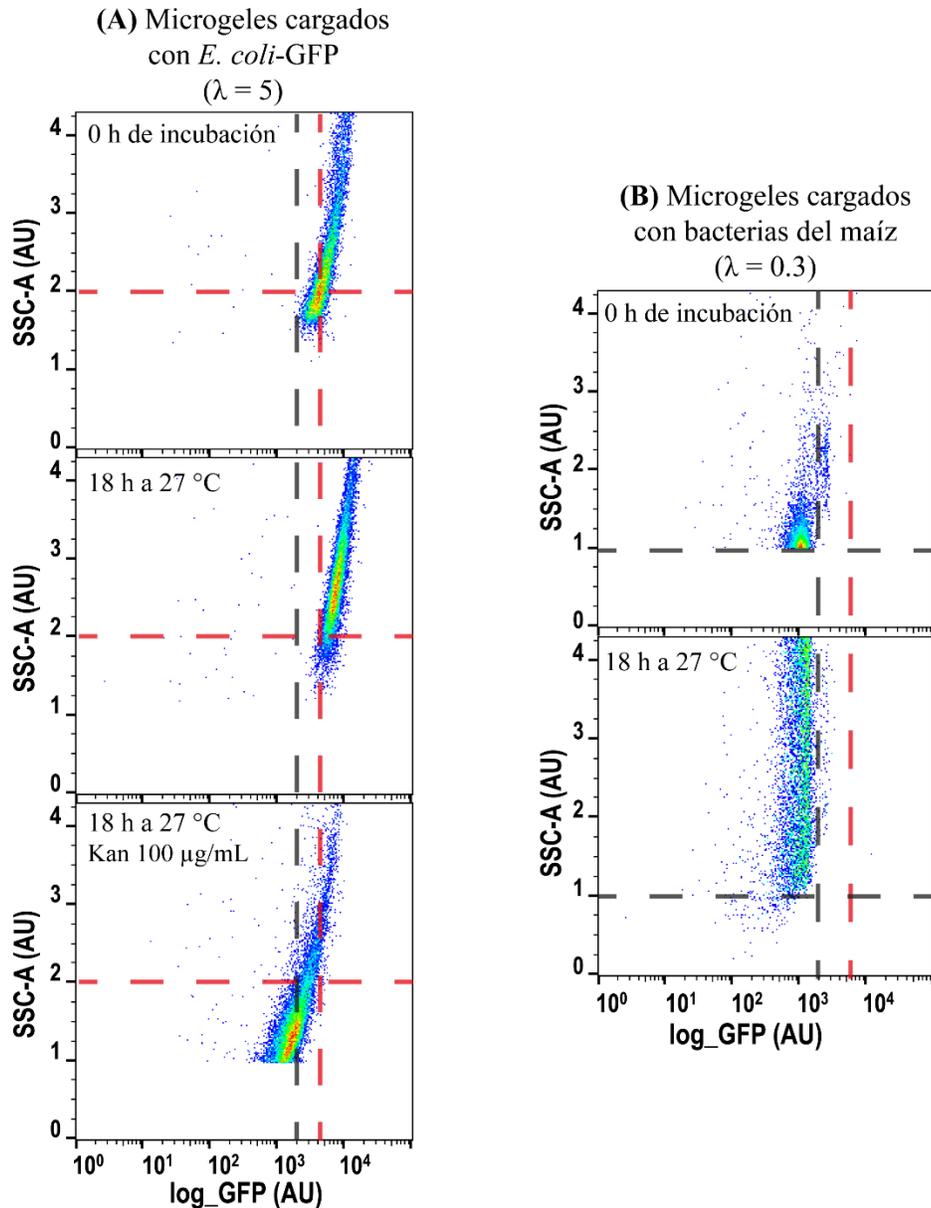
Para los microgeles cargados con *E. coli*-GFP a las 0 horas de incubación, el 93.0% de los eventos registrados por FACS quedaron dentro de la región de microgeles cargados con bacterias. Sin embargo, después de 18 horas de incubación, este porcentaje aumentó al 99.4%, valor consistente con la estimación realizada por la distribución de Poisson (99.3%). Los microgeles con una baja densidad de células encapsuladas generan una señal de SSC-H de menor intensidad que aquellos que inicialmente encapsularon un mayor número de bacterias. Por lo tanto, a las 0 horas de incubación, el 7% de los microgeles ocupados por *E. coli*-GFP se superpusieron con la región de microgeles vacíos (señales de SSC-H por debajo de 0.75 UA) (Figura 25, primer panel). Sin embargo, después de la incubación, el desarrolló de microcolonias dentro de los microgeles generó un aumento en la intensidad de las señales de esparcimiento frontal y lateral de la luz. Por lo tanto, los microgeles cargados de bacterias se lograron diferenciar más claramente de los vacíos (Figura 25, segundo panel). Se observaron resultados similares para las muestras de microgeles 8 y 9 que encapsulan bacterias del maíz con 0 y 18 h de incubación (Figura 25, dos últimos paneles). El porcentaje experimental de eventos registrados en la región de microgeles cargados con bacterias después de 18 h de incubación concuerda con los cálculos teóricos. Por el contrario, para los microgeles cargados con *E. coli*-GFP e incubados con kanamicina, la fracción de eventos

encerrados en la región de cargados con bacterias fue del 70.5% y sus señales de SSC-H y FSC-H son menores que los geles con microcolonias de *E. coli*-GFP sin kanamicina (Figura 25, tercer panel). Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por microscopía presentadas en la sección anterior. En este caso, en algunos geles donde no se observó la formación de colonias de *E. coli*-GFP si se logró observar un aumento en la fluorescencia basal de todo el microgel (Figura 21). Este resultado sugiere que la kanamicina compromete la estabilidad de la pared de las células de *E. coli*-GFP, tal que la luz se desvía en menor medida hacia el detector de SSC, además si la pared está comprometida esto podría favorecer la migración de la proteína GFP desde el interior de la bacteria y quedar disuelta dentro del microgel tal como se observó en la figura 21.

Las señales de esparcimiento de la luz son sensibles a la morfología de las microcolonias encapsuladas dentro de los microgeles. Por ejemplo, se observa que las microcolonias de *E. coli*-GFP emiten una señal menos dispersa en comparación con aquellas microcolonias de las bacterias aisladas del maíz encapsuladas en microgeles (Figura 25, segundo y último panel, respectivamente). Esta variación puede atribuirse al desarrollo de estructuras fibrosas en las microcolonias de las especies bacterianas aisladas del maíz.

#### *4.7.2. Caracterización de señales de fluorescencia obtenidas con FACS para los microgeles cargados con bacterias*

Para las muestras de microgeles analizadas en la sección anterior se obtuvieron al menos medio millón de eventos dentro de la región de microgeles cargados con bacterias. Posteriormente, para estos eventos se examinó su intensidad de fluorescencia haciendo uso de los diagramas de SSC-A frente al logaritmo de la intensidad de fluorescencia verde ( $\log_{10} \text{GFP}$ ), que fue la combinación que permitió la mejor diferenciación entre las diferentes poblaciones de microgeles cargados con bacterias (Figura 26).



**Figura 26.** Diagramas de densidad de puntos que relacionan la intensidad de SSC-A contra la de fluorescencia para: **(A)** las muestras de microgeles cargados con *E. coli*-GFP e incubados en diversas condiciones según se indica en cada panel; **(B)** y de microgeles cargados con las cepas bacterianas aisladas del maíz. Las líneas rojas indican el centro de mayor densidad de eventos registrados para la muestra con *E. coli*-GFP al tiempo 0 h. Las líneas negras marcan el límite máximo de intensidad de fluorescencia emitido por microgeles cargados con las cepas bacterianas aisladas del maíz con y sin incubación. El gradiente de color en los diagramas representa la densidad de puntos en esa región, rojo mayor densidad de puntos, seguido por amarillo, verde y azul las regiones de menor densidad.

Para los microgeles cargados con *E. coli*-GFP sin incubación (0 h), se obtuvo una población centrada en 4000 unidades de fluorescencia y 2 unidades de SSC-A (Figura 26-A, panel superior). Sin embargo, después de 18 h de incubación a 27 °C, los microgeles que contienen microcolonias de *E. coli*-GFP mostraron una mayor intensidad de fluorescencia verde y esparcimiento de la luz, con una población centrada alrededor de 8000 unidades de fluorescencia y 2.5 unidades de SSC-A que se desplaza hacia la derecha conforme

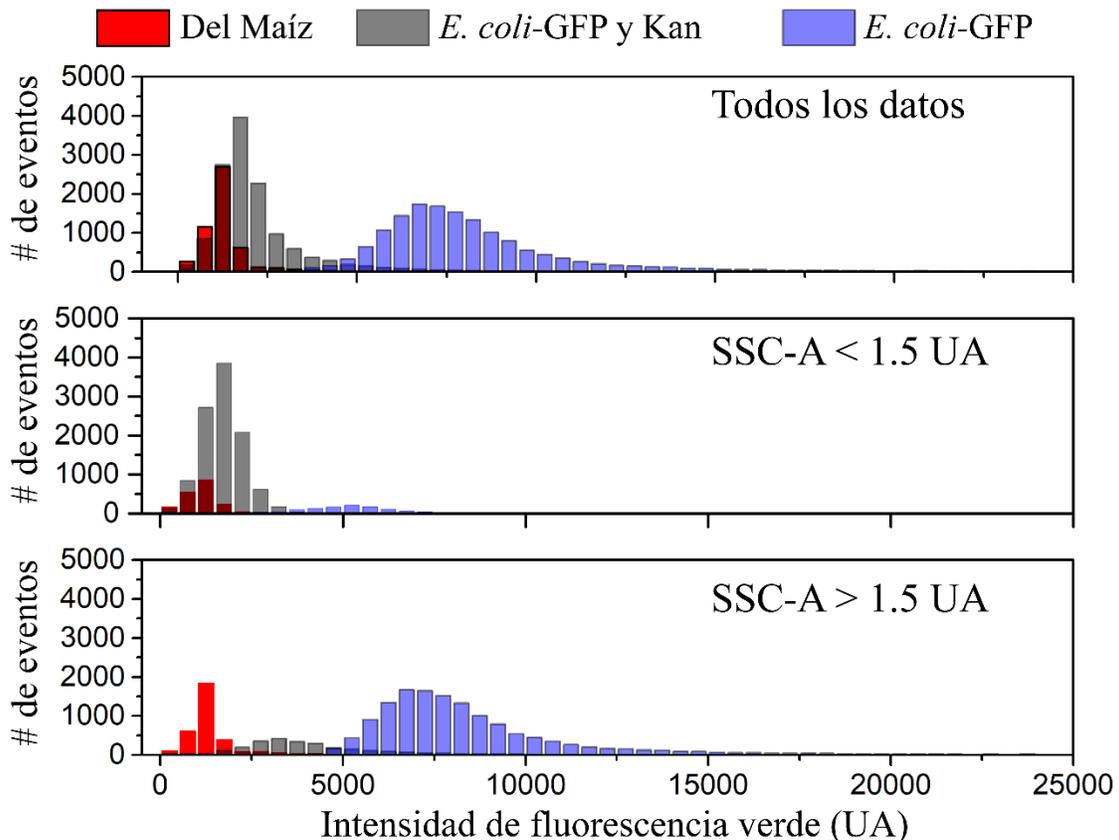
aumenta la intensidad de SSC-A (Figura 26-A, panel central). Dado que cada célula de *E. coli*-GFP es fluorescente, la intensidad de fluorescencia aumenta proporcionalmente con número de células encapsuladas, esto da como resultado el desplazamiento hacia la derecha de los microgeles con mayor complejidad (señal de SSC), es decir con mayor número de bacterias encapsuladas.

Por el contrario, las señales FACS emitidas por los microgeles que contienen *E. coli*-GFP tratadas con kanamicina mostraron una disminución tanto en de SSC-A como de fluorescencia con respecto a la muestra sin incubación (Figura 26-A, panel inferior). Nuevamente, la disminución en la intensidad de fluorescencia podría estar asociado a la salida de la GFP del interior de la célula debido a una desestabilización de la pared de las células de *E. coli*-GFP. Sin embargo, en algunos de estos microgeles el valor de SSC-A no disminuyó significativamente con respecto al tiempo cero (Figura 26-A), a pesar de que el antibiótico estaba en la concentración mínima bactericida determinada previamente a macroescala (ANEXO V). Estos eventos podrían corresponder a dos fenómenos diferentes. En el primer caso, se podría deber a un exceso de bacterias inicialmente dentro de los microgeles (ver Figura 21), tal que la cantidad de kanamicina (100 µg/mL) fue insuficiente para matar todas las células presentes desde el tiempo cero en aquellos microgeles. Sin embargo, en los microgeles con menor densidad bacteriana inicial, la concentración de kanamicina logró efectivamente la desintegración de las células dentro de los microgeles, disminuyendo así tanto la intensidad de fluorescencia como de SSC-A. El segundo fenómeno que puede generar la supervivencia de *E. coli*-GFP dentro de los microgeles es la presencia de mutantes con resistencia a la kanamicina, lo cual podría bloquear la actividad de este antibiótico y permitir la proliferación de *E. coli*-GFP dentro de los microgeles.

Por otro lado, los microgeles que encapsulan las cepas bacterianas no fluorescentes aisladas del maíz mostraron señales de fluorescencia más bajas que cualquier muestra de microgeles cargados con *E. coli*-GFP. Para la muestra 8, la población de microgeles ocupados por bacterias es muy pequeña (7.6 %), sin embargo, la mayoría de los puntos se concentran en 1500 unidades de fluorescencia y 1 unidad de SSC-A. En contraste, después de 18 h de incubación la intensidad de fluorescencia se mantuvo, pero la intensidad de las señales de esparcimiento aumenta y se distribuye ampliamente desde 1 unidad hasta salir del rango de SSC-A (Figura 26-B).

Además, se realizó una comparación entre las señales de SSC-A contra log<sub>10</sub> GFP obtenidas con FACS para las tres muestras que fueron incubadas durante 18 h a 27 °C: Muestra 3, microgeles con *E. coli*-GFP; Muestra 4, microgeles con *E. coli*-GFP y kanamicina; y la Muestra 9, microgeles cargados con las cepas aisladas del maíz. En el marco de este análisis, se realizaron tres histogramas diferentes para las señales

de fluorescencia obtenidas para cada muestra (Figura 27). En el primer histograma se grafican todas las señales de fluorescencia obtenidas para cada muestra de microgeles. En un segundo histograma, se incluyen únicamente las señales de fluorescencia que presentan valores de SSC-A inferiores a 1.5 AU de intensidad. Finalmente, en el tercer histograma se contemplan las señales de fluorescencia asociadas a valores de SSC-A superiores a 1.5 UA. En la Figura 27, se aprecia que las poblaciones de las tres muestras analizadas se pueden distinguir con mayor claridad al considerar únicamente las señales de fluorescencia asociadas a valores de SSC-A mayores a 1.5 UA.



**Figura 27.** Histogramas de las señales de intensidad de fluorescencia verde obtenida mediante FACS de forma independiente para tres muestras diferentes de microgeles: cargados con microcolonias de *E. coli*-GFP; bacterias de *E. coli*-GFP tratadas con kanamicina; y microcolonias de alguna de las bacterias aisladas del maíz. Cada histograma se generó utilizando diferentes umbrales de intensidad de SSC-A, según se indica en la figura.

El análisis presentado en las figuras 26 y 27 permite identificar la región en los diagramas de SSC-A contra log\_GFP en la cual se registran los microgeles cargados con *E. coli*-GFP pero donde el crecimiento bacteriano resultó afectado por la actividad antibiótica. La importancia de esta región en el diagrama de SSC-A versus intensidad de fluorescencia radica a que en esa misma región deberán aparecer las señales

de los microgeles en los que el crecimiento de *E. coli*-GFP ha sido inhibido por la actividad de alguna cepa antagonista co-encapsulada en el mismo microgel, justo como se muestra en las siguientes secciones.

#### 4.7.3. *Análisis y separación con FACS de una mezcla de microgeles ocupados por bacterias con diferentes propiedades*

Para demostrar la capacidad de esta metodología para clasificar y recuperar microgeles de acuerdo con las propiedades morfológicas y fluorescentes de los microorganismos encapsulados se llevó a cabo el análisis con FACS de una mezcla de volúmenes iguales (1:1:1) de las tres diferentes muestras de microgeles cargados con bacterias e incubados durante 18 h (Muestras 3, 4 y 9). El análisis por citometría de flujo de esta mezcla reveló tres poblaciones distintas en el diagrama de SSC-A contra log<sub>10</sub>GFP (Figura 28-A), correspondientes a las mismas poblaciones identificadas para las mismas muestras cuando fueron analizadas de manera independiente.

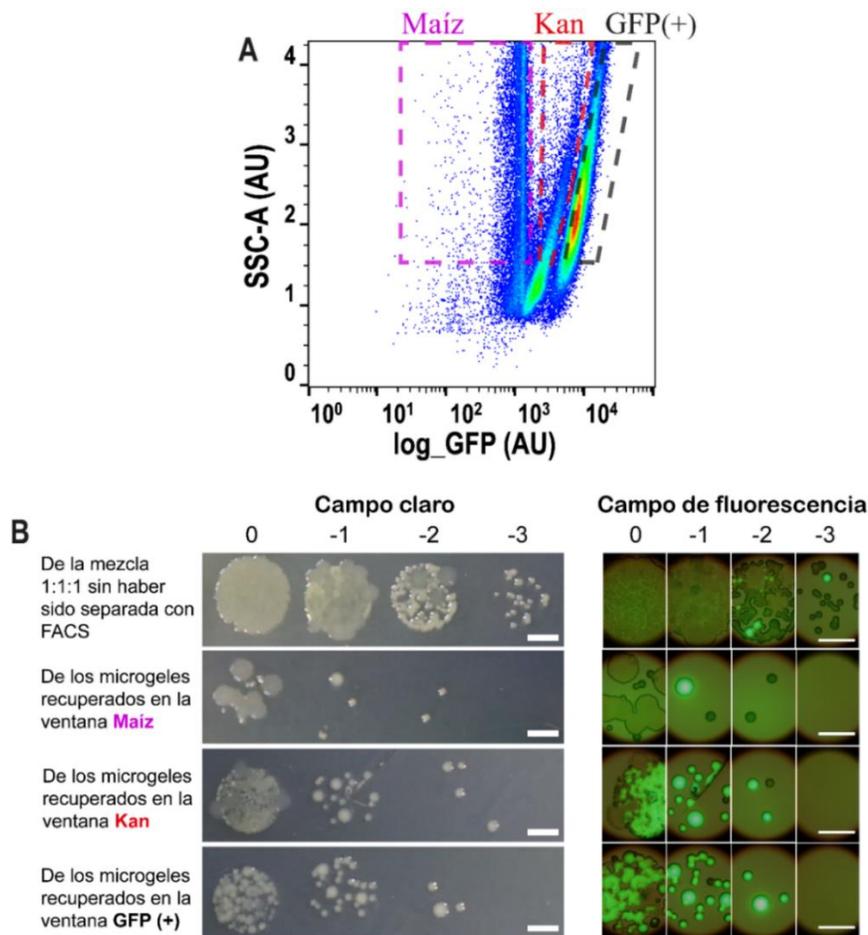
Para la clasificación y recuperación de cada población de microgeles identificada en la mezcla, se colocaron tres ventanas diferentes sobre el diagrama de SSC-A contra log<sub>10</sub>GFP obtenido para la mezcla (Figura 28-A). La geometría de estas ventanas fue seleccionada con base en los análisis presentados en las figuras 26 y 27. La ventana a menores valores de fluorescencia, *Maíz*, fue colocada para seleccionar y recuperar los microgeles cargados con microcolonias de alguna de las cepas aisladas del maíz; la segunda ventana, *Kan*, recupera los microgeles ocupados por *E. coli*-GFP tratadas con Kanamicina; y la tercera ventana a mayor intensidad de fluorescencia, *GFP(+)*, confina los microgeles que encapsulan microcolonias fluorescentes de *E. coli*-GFP (Figura 28-A).

#### 4.7.4. *Recuperación a macroescala de los microorganismos encapsulados en los microgeles seleccionados*

Posteriormente, los microgeles recuperados con FACS de las ventanas *Maíz*, *Kan* y *GFP(+)* fueron utilizados para inocular placas de agar y así poder recuperar a macroescala los microorganismos encapsulados en los microgeles seleccionados. También, se incluyó un control de la mezcla de microgeles sin haber sido separados con FACS. Para cada caso, de manera independiente se colocaron sobre la superficie del agar gotas de 10 µL de diluciones consecutivas 1 en 10 ( $10^0$  a  $10^{-3}$ ) de las diferentes suspensiones de microgeles recuperados. Después de 48 h de incubación se observaron en campo claro y de fluorescencia las colonias desarrolladas (Figura 28-B).

Después de 48 h de incubación de estas placas, sobre los puntos inoculados con la mezcla sin separación con FACS se observó el crecimiento predominante de colonias no fluorescentes características de las cepas

XM5 y NME26 (Figura 28-B). El crecimiento de la tercera bacteria aislada del maíz presente en la mezcla, NME255, no creció en las placas de agar, probablemente debido a la inhibición por NME26, como lo muestran ensayos posteriores realizados a macroescala (ANEXO VI). Por la misma razón, el crecimiento de colonias de *E. coli*-GFP solo se observó a partir de la dilución  $10^{-2}$ . En las primeras diluciones la presencia de geles ocupados por las cepas del maíz es tal que su crecimiento predomina y producen la inhibición del desarrollo de *E. coli*-GFP. Sin embargo, debido a la distribución de Poisson, conforme más se diluye la muestra, la cantidad de geles ocupados por cepas del maíz disminuye más rápidamente que los geles ocupados solo por *E. coli*-GFP, y por lo tanto algunas colonias de *E. coli*-GFP logran predominar sobre las cepas inhibidoras (Figura 28-B).



**Figura 28.** (A) Señales de citometría de flujo, SSC-A frente a intensidad de fluorescencia, obtenidas para una mezcla artificial de microgeles en proporciones iguales (1:1:1) de las muestras 3, 4 y 9 presentadas en la Tabla 2. Para clasificar y recuperar cada población de microgeles presente en la muestra, se definieron, en función de las señales obtenidas de las muestras sin mezclar, tres ventanas diferentes sobre el diagrama de SSC-A vs  $\log_{10}$  GFP: Maíz, Kan y GFP(+). (B) Los microgeles recuperados de estas tres ventanas y un control de la mezcla sin separación fueron utilizados de manera independiente para inocular placas de agar. El crecimiento bacteriano sobre estas placas fue evaluado después de 48 h de incubación a 27 °C. A la izquierda se muestran las imágenes en campo claro y a la derecha las imágenes de fluorescencia para los mismos grupos de colonias recuperadas. En cada caso se hicieron diluciones consecutivas de 1 en 10 ( $10^0$  a  $10^{-3}$ ) marcadas con los números encima de las fotografías. Barra de escala 0.5 cm.

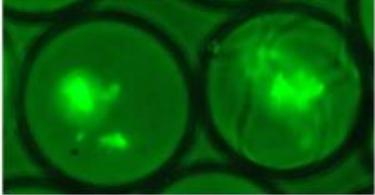
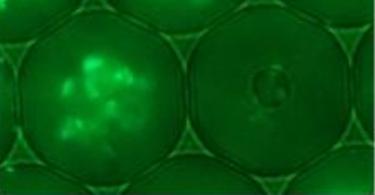
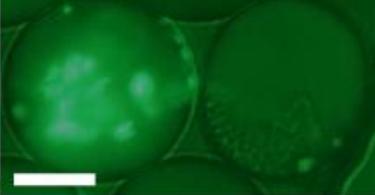
Los microgeles recuperados mediante FACS dentro de la ventana *Maíz* produjeron principalmente colonias de las dos bacterias antagónicas del maíz, observándose solo una colonia de *E. coli*-GFP en la dilución  $10^{-1}$ . De la ventana *Kan* se recuperó una combinación de *E. coli*-GFP y colonias no fluorescentes de bacterias del maíz. Sin embargo, las UFC de bacterias no fluorescentes fueron dos órdenes de magnitud más bajas que las recuperadas de *E. coli*-GFP (Figura 28-B). Estas observaciones coinciden con el análisis realizado para establecer la estrategia de ventanas utilizadas (Figura 27), donde se demuestra un pequeño traslape entre las ventanas *Kan* y *Maíz*. Sin embargo, las colonias recuperadas de *E. coli*-GFP fueron más abundantes que las colonias no fluorescentes, esto indica una población enriquecida con los eventos esperados en la ventana *Kan*. Finalmente, los microgeles recuperados de la ventana *GFP(+)* desarrollaron principalmente colonias fluorescentes de *E. coli*-GFP (Figura 28-B). Estos resultados comprueban una separación efectiva de los microgeles cargados con microcolonias no fluorescentes de aquellos microgeles con microcolonias fluorescentes de *E. coli*-GFP, especialmente entre las ventanas *Maíz* y *GFP(+)*.

#### 4.8. Co-encapsulación de *E. coli*-GFP con las cepas bacterianas aisladas del Maíz

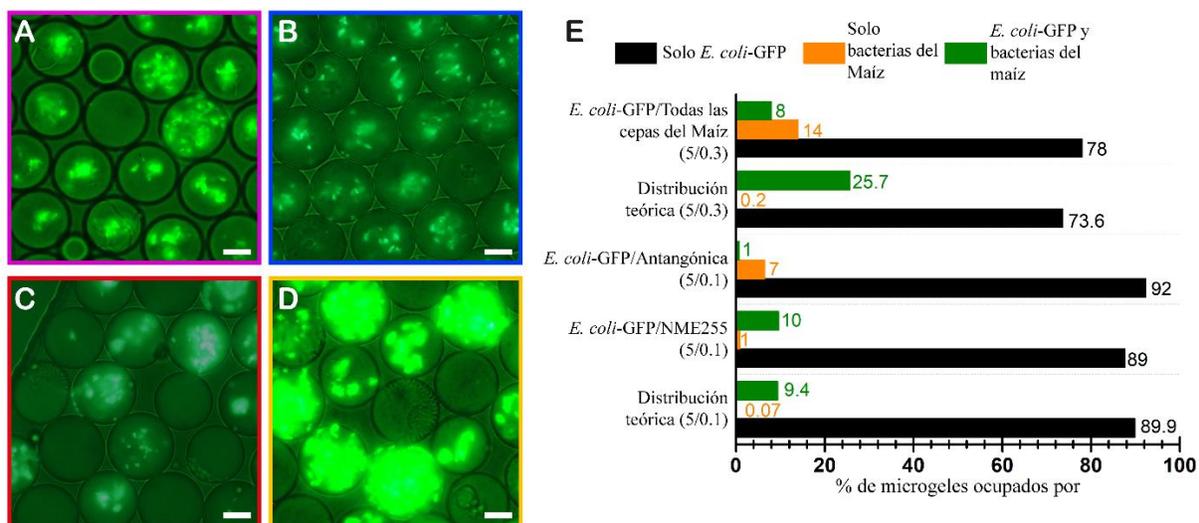
Para evaluar por separado la actividad antagonista de cada cepa del maíz frente a *E. coli*-GFP, se procedió a la co-encapsulación en microgeles de manera individual, combinando cada cepa de maíz junto con *E. coli*-GFP, tal como se describe en la Tabla 3. En todos los casos, la concentración de *E. coli*-GFP se mantuvo constante a  $4.9 \times 10^8$  UFC/mL para lograr un valor de  $\lambda$  igual a 5. Por su parte, la concentración de las bacterias aisladas del maíz en cada instancia se fijó en  $9.7 \times 10^6$  UFC/mL, lo que corresponde a un valor de  $\lambda$  igual a 0.1. Desde una perspectiva teórica, para estas densidades bacterianas, el 89.9% de los microgeles formados encapsulan exclusivamente células de *E. coli*-GFP, mientras que sólo el 0.07% encapsula únicamente una célula de alguna de las cepas bacterianas del maíz. El restante 9.4% co-encapsula células de *E. coli*-GFP junto con una célula individual de las cepas aisladas de maíz. Adicionalmente, se utilizó un control de esterilidad, donde se llevó a cabo la formación e incubación de microgeles vacíos.

Luego de incubar los microgeles durante 18 horas, se procedió a analizarlos mediante microscopía de fluorescencia para evaluar el crecimiento de *E. coli*-GFP y las bacterias del maíz en cada uno de los casos. En la muestra 10, se observó que tanto las cepas NME255 como *E. coli*-GFP lograron crecer dentro de un mismo microgel (Tabla 3 y Figura 29-A). En esta situación, se constató la co-encapsulación de las microcolonias fluorescentes junto a las no fluorescentes en aproximadamente el 10% de los microgeles examinados, un resultado coherente con el 9.4% estimado con la distribución de Poisson para la co-encapsulación inicial de dos cepas diferentes con valores de  $\lambda$  de 5 y 0.1 (Figura 29-E).

**Tabla 3.** Muestras utilizadas para evaluar la actividad antagonista de cada cepa aislada de maíz frente a *E. coli*-GFP. Barra de escala 10  $\mu$ m.

Muestra	Cepa(s) co-encapsulada(s)	Densidad bacteriana inicial (UFC/mL)	Condiciones de incubación antes de inspección por microscopía	Imagen típica de microscopía de fluorescencia	
				Gel con <i>E. coli</i> -GFP	Co-encapsulación
10	<i>E. coli</i> -GFP NME255	4.9 x 10 <sup>8</sup> ( $\lambda=5$ ) 9.7 x 10 <sup>6</sup> ( $\lambda=0.1$ )	18 h a 27 °C		
11	<i>E. coli</i> -GFP XM5	4.9 x 10 <sup>8</sup> ( $\lambda=5$ ) 9.7 x 10 <sup>6</sup> ( $\lambda=0.1$ )	18 h a 27 °C		
12	<i>E. coli</i> -GFP NME26	4.9 x 10 <sup>8</sup> ( $\lambda=5$ ) 9.7 x 10 <sup>6</sup> ( $\lambda=0.1$ )	18 h a 27 °C		
13	<i>E. coli</i> -GFP NME255 XM5 NME26	4.9 x 10 <sup>8</sup> ( $\lambda=5$ ) 9.7 x 10 <sup>6</sup> cada una ( $\lambda_{\text{global}}=0.3$ )	18 h a 27 °C	Ver Figura 29-D	

Por otro lado, cuando se mezclaron y co-incubaron en microgeles *E. coli*-GFP con alguna cepa antagónica (NME26 o XM5), la microscopía reveló que la cepa fluorescente no pudo proliferar en los microgeles donde se observó la formación de colonias no fluorescentes (Tabla 3, Muestras 11 y 12 y Figura 29 B-C). En este escenario, el porcentaje experimental de microgeles cargados únicamente con colonias no fluorescentes fue del 7%, y solamente en el 1% de los microgeles analizados se observó la co-encapsulación de colonias fluorescentes con no fluorescentes (Figura 29-E). Estos resultados indican que en los microgeles donde se co-encapsuló inicialmente *E. coli*-GFP junto con una cepa antagónica, la actividad de la cepa co-encapsulada impidió el crecimiento de *E. coli*-GFP, y en la mayoría de los casos, *E. coli*-GFP se desintegró, dejando solo la cepa no fluorescente con actividad antagónica en el microgel (Figura 29 B-C).

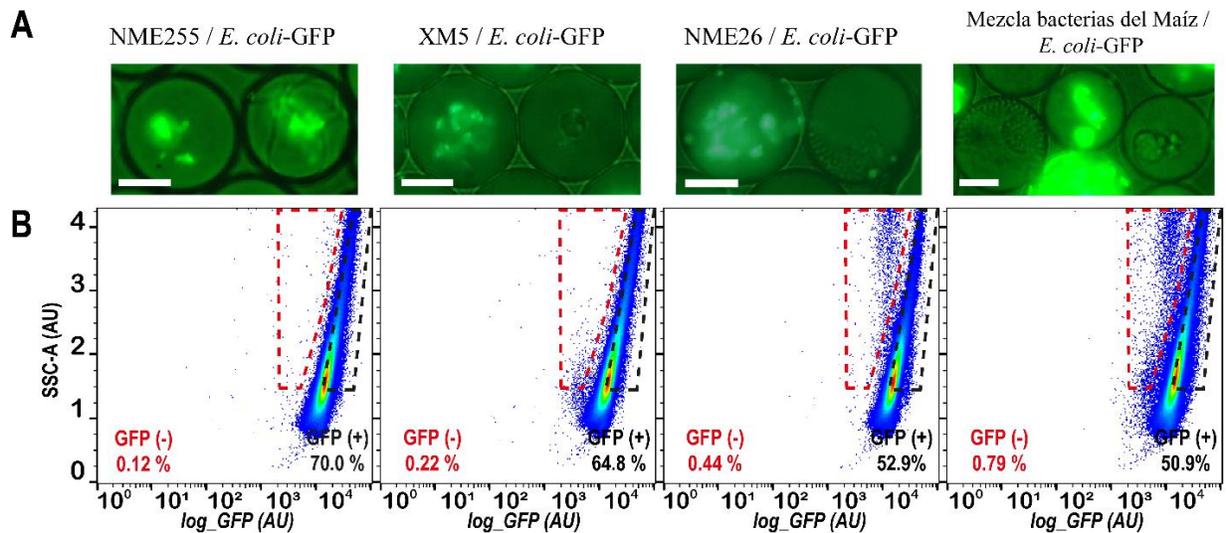


**Figura 29.** Imagen representativa de microscopía de fluorescencia de las diferentes muestras de microgeles que co-encapsulan: **(A)** *E. coli*-GFP junto con NME255; **(B)** *E. coli*-GFP junto con XM5; **(C)** *E. coli*-GFP junto con NME26; **(D)** *E. coli*-GFP junto con las tres cepas aisladas del maíz. Todas las muestras fueron analizadas después de 18 h de incubación a 27 °C. Barra de escala 10  $\mu$ m. **(E)** Distribución de Poisson teórica y experimental de bacterias co-encapsuladas en microgeles, los datos experimentales se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia.

Para demostrar la eficacia de la metodología propuesta para aislar una cepa productora de antibióticos a partir de una mezcla de microorganismos, se mezclaron las tres bacterias aisladas del maíz y *E. coli*-GFP en una misma suspensión bacteriana que después fue emulsionada para lograr la co-encapsulación de estos microorganismos. Se mantuvo el valor de  $\lambda$  igual a 5 para *E. coli*-GFP y  $\lambda$  igual 0.1 para cada una de las cepas del maíz, dando un  $\lambda$  global igual a 0.3 para la mezcla de bacterias del maíz (Tabla 3, Muestra 13). Para este escenario el 25.7% de los microgeles co-encapsula células de *E. coli*-GFP junto con una célula individual de alguna de las cepas del maíz (8.6% para cada una de ellas). Después de 18 h, mediante microscopía de fluorescencia se determinó que el 8% de los microgeles mostraron el desarrollo de microcolonias de *E. coli*-GFP junto con microcolonias no fluorescentes. Por el contrario, la proporción de microgeles ocupados únicamente por microcolonias no fluorescentes fue del 14% (Figura 29-E). Además, con base en la morfología de cada cepa se determinó que las microcolonias no fluorescentes co-encapsuladas con *E. coli*-GFP pertenecían a la cepa inactiva NME255. Y las microcolonias características de las cepas XM5 o NME26 ocuparon los microgeles sin o con baja presencia de bacterias fluorescentes (Figura 29-D). Estas observaciones confirman nuevamente que *E. coli*-GFP no logra proliferar dentro de los microgeles donde inicialmente fue co-encapsulada con XM5 o NME26. En conclusión, mediante el ajuste de la densidad bacteriana y de acuerdo con la distribución de Poisson, en un solo paso, la formación de microgotas, es posible separar cada miembro de una mezcla de microorganismos y co-encapsularlo dentro de un microgel junto con la cepa reportera *E. coli*-GFP.

#### 4.8.1. Análisis por citometría de flujo de los microgeles con bacterias co-encapsuladas

Se realizó el análisis mediante FACS de aproximadamente 500,000 eventos para cada muestra de microgeles presentada en la Tabla 3 (Figura 30-A). Para clasificar los microgeles de acuerdo con las propiedades de las bacterias encapsuladas, se colocaron dos ventanas diferentes sobre los respectivos diagramas SSC-A vs log\_GFP de cada muestra. La ventana colocada a bajas intensidades de fluorescencia, nombrada GFP (-) se colocó para clasificar aquellos microgeles donde *E. coli*-GFP no logró proliferar dentro, pero si alguna de las cepas no fluorescentes. La ventana GFP (+), a mayores valores de fluorescencia, logra seleccionar los microgeles en los que *E. coli*-GFP si formó microcolonias fluorescentes solas o junto con la cepa no fluorescente de NME255 (Figura 30-B). La geometría de ambas ventanas se estableció con base a las observaciones descritas en la sección 4.7.2. La ventana GFP (-) se colocó a valores superiores a  $2 \times 10^3$  UA de intensidad de fluorescencia para evitar seleccionar los microgeles en los que inicialmente se encapsuló solo una cepa no fluorescente en ausencia de *E. coli*-GFP.



**Figura 30.** (A) Imágenes típicas de microscopía de fluorescencia para las diferentes co-encapsulaciones bacterianas en microgeles que se llevaron a cabo según se indica en el encabezado de cada columna. Los microgeles fueron analizados después de 18 h de incubación a 27 °C. Barra de escala de 10  $\mu$ m. (B) Diagramas de SSC-A contra intensidad de fluorescencia obtenidos con FACS para las mismas muestras de microgeles en el mismo orden que en A. La ventana GFP (-), marcada con la línea punteada roja, se colocó para seleccionar los microgeles donde no proliferó *E. coli*-GFP debido al predominio de una cepa antagonista encapsulada. La ventana delimitada con negro, GFP (+), selecciona los microgeles donde *E. coli*-GFP si proliferó ya sea sola o en presencia de la cepa no antagonista NME255. En cada caso se presenta el porcentaje de eventos seleccionados dentro de cada ventana. El gradiente de color en los diagramas representa la densidad de puntos en esa región, rojo mayor densidad de puntos, seguido por amarillo, verde y azul las regiones de menor densidad.

Para la muestra de microgeles donde inicialmente se mezclaron *E. coli*-GFP y la cepa no antagonista NME255, la gran mayoría de los eventos registrados con FACS se obtuvieron dentro de la región característica de microgeles ocupados solamente por *E. coli*-GFP. En cambio, dentro de la ventana GFP (-) solo se registró el 0.12% de los microgeles analizados. Este resultado es coherente con las observaciones

por microscopía, debido a que la cepa NME255 crece junto con *E. coli*-GFP y por lo tanto aquellos microgeles en los que se logró la co-incubación de ambas cepas registran señales dentro de la ventana GFP (+) (Figura 30, panel izquierdo).

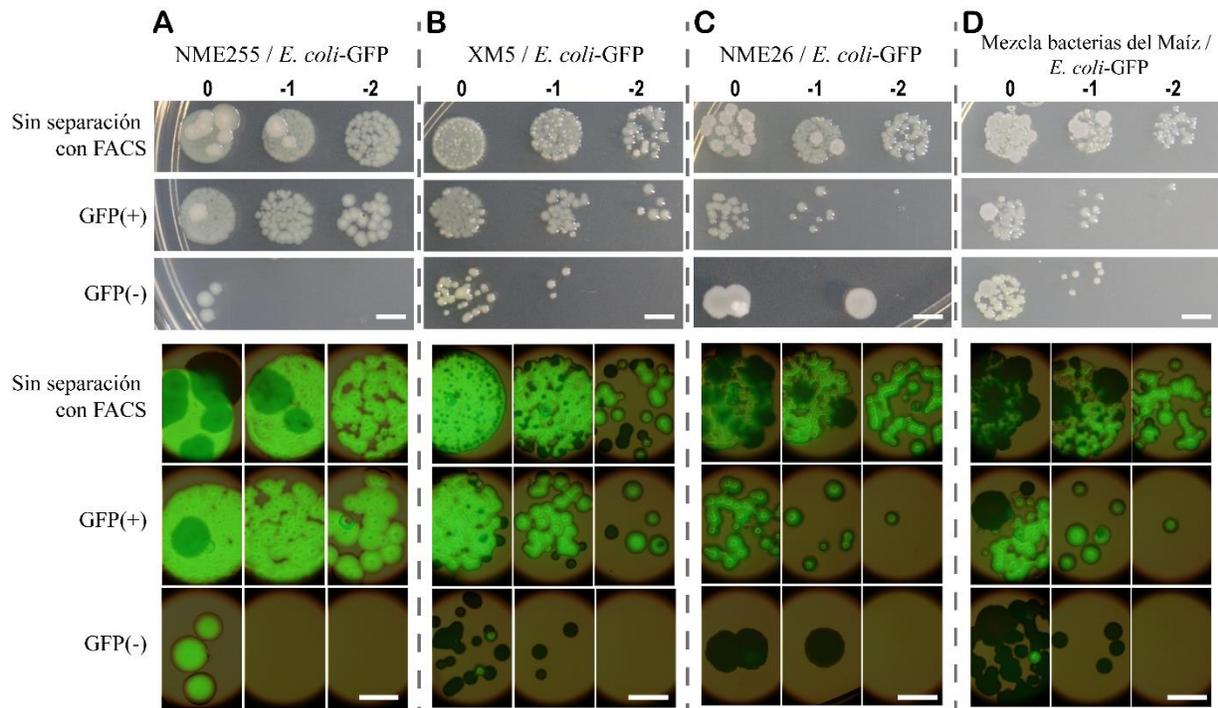
Por el contrario, cuando las cepas antagonistas XM5 o NME26 se mezclaron con *E. coli*-GFP, el porcentaje de microgeles registrados dentro de la ventana GFP (-) fue del 0.22% y 0.44%, respectivamente. En comparación, la fracción de eventos obtenidos dentro de la ventana GFP (+) disminuyó con respecto a la mezcla de NME255 y *E. coli*-GFP (Figura 30, segundo y tercer panel). Estas observaciones sugieren que los microgeles en los que *E. coli*-GFP no logró crecer emitieron una señal desplazada hacia menores intensidades de fluorescencia aumentando así la fracción de eventos registrados dentro de la ventana GFP (-) y disminuyendo el porcentaje en GFP (+).

Finalmente, para la muestra de *E. coli*-GFP con la mezcla de las tres bacterias aisladas del maíz, la fracción de microgeles registrados dentro de GFP (-) fue la más alta con respecto a las anteriores: 0.79%. En este caso, la presencia de dos cepas antagonistas en la mezcla bacteriana inicial explica el aumento de eventos dentro de GFP (-) (Figura 30, último panel). Incluso, en el gráfico de SSC-A contra log\_GFP respectivo a esta muestra de microgeles se logran observar y diferenciar las señales típicas producidas por los microgeles cargados con microcolonias de XM5 o NME26. (Figura 30-B, último panel). Las microcolonias de XM5 producidas dentro de los microgeles son típicamente circulares y se concentran en algún punto dentro del microgel, los microgeles cargados con esta cepa comúnmente producen señales de SSC-A entre 1 y 2 UA (Figura 30-B, segundo panel). En cambio, los microgeles con las microcolonias de NME26, con una morfología más compleja que la de XM5, dan señales de SSC-A que se expanden entre 2 y 4 UA (Figura 30-B, tercer panel). Y, cuando ambas cepas están presentes en la misma muestra de microgeles, es posible observar las señales características de ambas cepas encapsuladas (Figura 30-B, cuarto panel). Esto demuestra que, aunque las cepas de maíz se mezclaron en la misma suspensión bacteriana y con densidades iguales, la compartimentalización de la suspensión en microgotas permite aislar y co-encapsular cada bacteria del maíz con *E. coli*-GFP en un microgel.

#### 4.8.2. *Recuperación e identificación de las bacterias recuperadas con FACS partir de muestras de co-encapsulación en microgeles*

Los microgeles recuperados de las ventanas GFP (+) y GFP (-) así como un control de microgeles sin haber sido separados mediante FACS, se utilizaron para inocular placas de agar. Tras incubar estas placas durante

48 h a 27 °C, se realizó la caracterización morfológica y de fluorescencia de las colonias bacterianas originadas a partir de cada conjunto de microgeles (Figura 31).



**Figura 31.** En la parte superior se presentan fotografías de campo claro, mientras que en la parte inferior se muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia de las colonias bacterianas cultivadas en placas de agar a partir de los microgeles generados con *E. coli*-GFP y cada una de las bacterias aisladas del maíz, tanto de manera individual como en combinación. En ambos casos de arriba hacia abajo se presentan las microcolonias recuperadas a partir de la respectiva mezcla de microgeles antes de someterse al proceso de separación mediante FACS, así como a partir de los microgeles recuperados de las ventanas GFP (+) y GFP (-). Estas imágenes fueron capturadas después de 48 horas de incubación de las placas de agar a una temperatura de 27 °C. En el encabezado de cada columna se indica la cepa que fue mezclada con *E. coli*-GFP para lograr la co-encapsulación. Los números indican el orden de la dilución de las bacterias. Barras de escala 0.5 cm.

Tanto en la muestra sin separación con FACS así como del conjunto recuperado de GFP (+), los microgeles cargados con *E. coli*-GFP y NME255 produjeron la formación de colonias distintivas de ambas cepas creciendo una sobre la otra. Por otro lado, en el caso de los microgeles recuperados de la ventana GFP (-) para la misma muestra, únicamente generaron microcolonias fluorescentes con una densidad bacteriana tres órdenes de magnitud menor en comparación con aquellas recuperadas de la ventana GFP (+) (Figura 31-A). Estos resultados indican que, cuando una cepa no antagonista se mezcla con *E. coli*-GFP, no es posible aislar esta cepa dentro de la ventana GFP (-) debido a su crecimiento junto a *E. coli*-GFP en los mismos microgeles.

En las placas de agar inoculadas con los microgeles sin separación de la mezcla de XM5 con *E. coli*-GFP, proliferaron colonias de ambas cepas, pero la abundancia obtenida de *E. coli*-GFP fue mayor que la de XM5. Después de la clasificación de los microgeles, las colonias recuperadas de la ventana GFP (+) fueron

predominantemente colonias fluorescentes, mientras que de los microgeles recuperados en la ventana GFP (-), la gran mayoría correspondió a colonias no fluorescentes con la morfología típica de la cepa XM5 (Figura 31-B). Un resultado muy similar se obtuvo de los microgeles que provenían de la mezcla NME26 y *E. coli*-GFP, donde también se logró separar *E. coli*-GFP de la NME26 en GFP (+) y GFP (-), respectivamente (Figura 31-C).

Para la mezcla de *E. coli*-GFP con las tres bacterias del maíz, creció una combinación de colonias fluorescentes y no fluorescentes en las placas de agar inoculadas con microgeles sin separación. Después de la separación con FACS, los microgeles seleccionados en GFP (+) produjeron principalmente colonias fluorescentes. Por el contrario, de la ventana GFP (-), se obtuvieron predominantemente colonias no fluorescentes características de XM5 y NME26 (Figura 31-D). Estos resultados demuestran que la metodología propuesta tiene la capacidad de aislar cada miembro presente en una mezcla bacteriana, co-encapsular junto con la cepa reportera *E. coli*-GFP y recuperar las cepas con actividad antagonista contra la cepa reportera fluorescente.

#### 4.9. Enriquecimiento de una cepa con actividad antibiótica

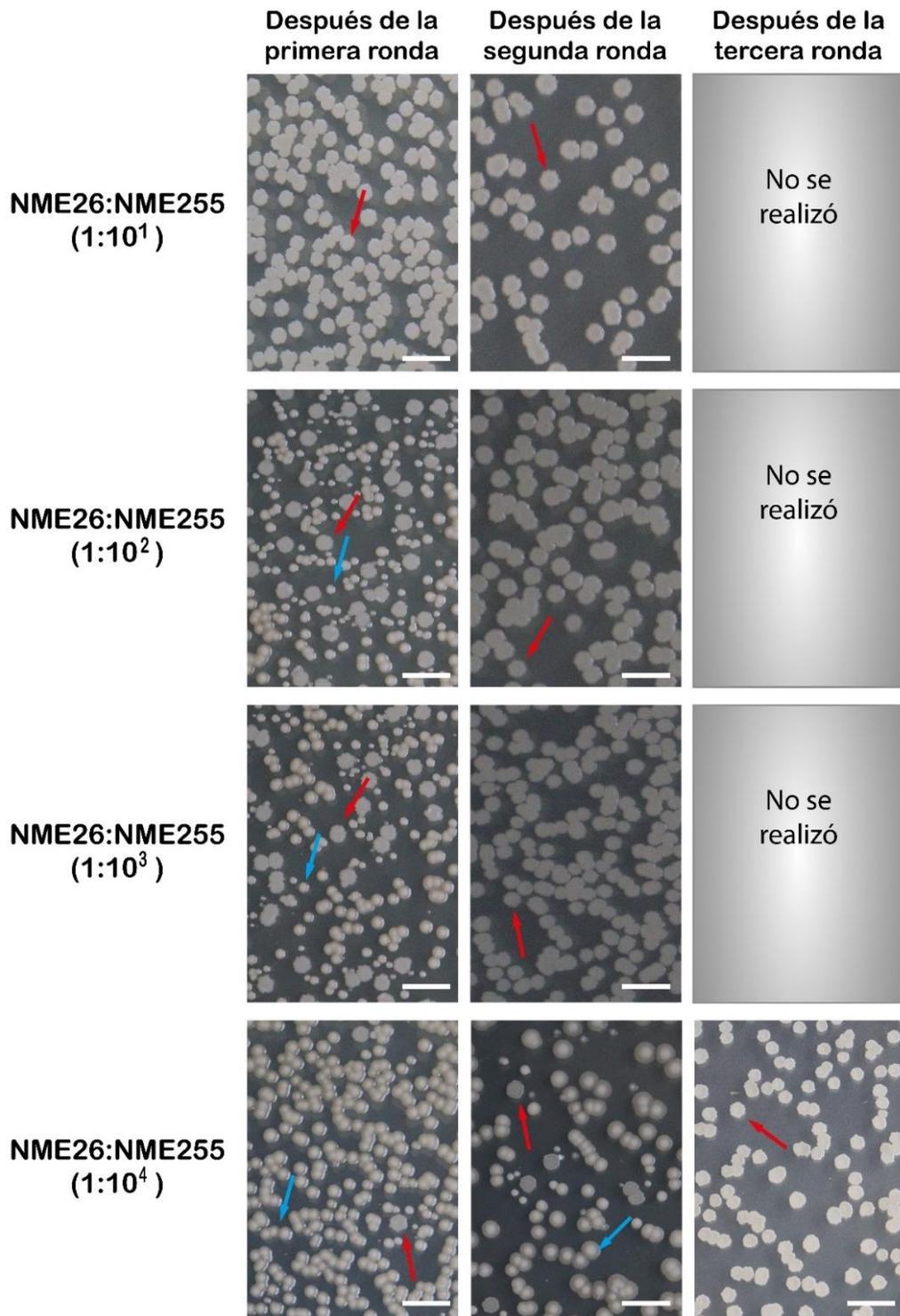
Con los controles anteriores se ha demostrado que la metodología propuesta es útil para la detección, recuperación y aislamiento de cepas antagonistas presentes en una mezcla bacteriana. Sin embargo, para hacer uso de esta técnica con muestras ambientales se debe considerar que estas contienen una alta diversidad de microorganismos en diferentes proporciones, y las especies de interés productoras de antibióticos podrían estar presentes en abundancias relativas muy bajas. Por esta razón, en esta sección se evalúa la capacidad de esta metodología para aislar y recuperar una cepa con actividad contra *E. coli*-GFP a partir de una mezcla de microgeles con una pequeña minoría ocupada por *E. coli*-GFP y la cepa antagonista NME26. Para ello, se diluyeron células de la cepa antagonista NME26 con la cepa no antagonista NME255 en cuatro proporciones diferentes (NME26:NME255),  $1:10^1$  (10%);  $1:10^2$  (1%);  $1:10^3$  (0.1%); y  $1:10^4$  (0.01%). Estas suspensiones de bacterias se mezclaron independientemente con *E. coli*-GFP y se emulsionaron en microgeles. El número promedio de células de *E. coli*-GFP encapsuladas por microgel se fijó en  $\lambda$  igual 5 y para las mezclas de NME255 con NME26,  $\lambda$  se mantuvo en 0.3, independientemente de la proporción. Por lo tanto, el porcentaje de microgeles cargados con NME26 junto a *E. coli*-GFP disminuye desde el 2.5% al 0.0025% en medida que se diluye NME26 con NME255 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Distribución de ocupación de microgeles de acuerdo con la dilución de NME26 (antagonista) con NME255 (sin actividad antagonica).

Dilución (NME26:NME255)	% de microgeles donde inicialmente se co-encapsula NME26 con <i>E. coli</i> -GFP	% de microgeles donde inicialmente se co-encapsula NME255 con <i>E. coli</i> -GFP	% de microgeles ocupados inicialmente solo por <i>E. coli</i> -GFP
1:10 <sup>1</sup>	2.5	22.5	74.6
1:10 <sup>2</sup>	0.25	24.75	74.6
1:10 <sup>3</sup>	0.025	24.975	74.6
1:10 <sup>4</sup>	0.0025	24.9975	74.6

Después de incubar las diferentes muestras de microgeles durante 18 h a 27 °C, se procedió al análisis y clasificación mediante FACS de un total de 500,000 microgeles por cada muestra. Al igual que en la sección 4.8.1 se utilizó la ventana GFP (-) para seleccionar los microgeles donde no hubo proliferación de *E. coli*-GFP y la ventana GFP (+) para discriminar los microgeles donde sí se dio el desarrollo de microcolonias fluorescentes de *E. coli*-GFP.

Para evaluar la abundancia de las diferentes cepas encapsuladas en los microgeles seleccionados en la ventana GFP (-) de cada muestra, se inoculó en platos de agar un promedio de 1,000 microgeles. Después, las placas fueron incubadas durante 48 h a 27 °C y mediante inspección visual, se identificaron las colonias de cada cepa de acuerdo con su morfología y se determinó la abundancia de cada una (Figura 32). El resto de los microgeles recuperados de la ventana GFP (-) se utilizó para inocular 2 mL de medio líquido 2YT estéril y después de 18 h de incubación a 27 °C la suspensión bacteriana obtenida se utilizó para una siguiente ronda de encapsulación, incubación, separación y recuperación. Esta metodología se repitió para cada ronda de selección.

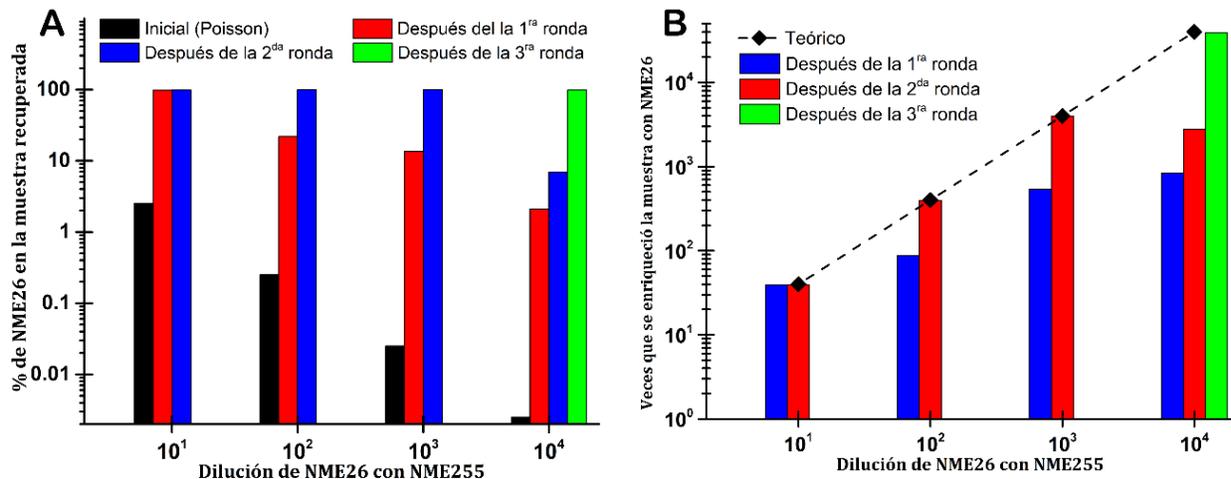


**Figura 32.** Imágenes representativas de placas de agar inoculadas con los microgeles recuperados de la ventana GFP (-) para las diferentes muestras de microgeles formados a partir de la mezcla de *E. coli*-GFP con las cepas NME26 y NME255 estas últimas en proporciones variantes según se indica en la figura. Las imágenes se tomaron después de 48 h de incubación de las placas a 27 °C. Las flechas señalan un ejemplo de algunas de las colonias de maíz presentes en el plato, identificadas de acuerdo a la morfología de la colonia: las flechas rojas señalan NME26, colonias blancas y planas; flechas azules señalan NME255 con colonias características color marrón, circulares y voluminosas, barra de escala 1 cm.

Después de cada ronda de selección el enriquecimiento de NME26 en cada muestra se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Enriquecimiento de NME6} = \frac{\% \text{ de colonias de NME26 recuperadas en las placas de agar}}{\% \text{ de microgeles cargados con NME26 en la muestra inicial (Poisson)}}$$

Tras la primera ronda de co-encapsulación, la proporción de NME26 para la dilución 1:10<sup>1</sup> aumentó desde 2.5% al 98.3%, lo que produce un enriquecimiento de NME26 de 39 veces más con respecto a la proporción inicial, una unidad menos que el máximo teórico (40 veces). Sin embargo, para las diluciones 1:10<sup>2</sup> y 1:10<sup>3</sup>, se necesitaron dos rondas de co-encapsulación y selección para lograr un enriquecimiento cercano al máximo teórico (Figura 33). Finalmente, para la dilución 1:10<sup>4</sup>, la proporción de NME26 en la ventana GFP (-) alcanzó el 98.7% hasta la tercera ronda de co-encapsulación, lo que supone un enriquecimiento de 39,480 veces (Figura 33). Los valores de enriquecimiento obtenidos son similares a metodologías parecidas reportadas previamente, pero que diferencia de la metodología desarrollada en este trabajo, se ha hecho uso de dobles emulsiones agua-aceite-agua para llevar a cabo la co-encapsulación de microorganismos.<sup>36,58</sup> En general, estos resultados demuestran la efectividad de la metodología propuesta para aislar y enriquecer cepas bacterianas productoras de antibióticos presentes en una mezcla de microorganismos con abundancias de hasta el 0.01%.



**Figura 33.** (A) Porcentaje de colonias de NME26 recuperadas sobre las placas de agar inoculadas con los microgeles recuperados de la ventana GFP (-) después de una, dos o tres rondas de co-encapsulación y co-incubación en microgeles seguido de selección y recuperación mediante FACS. Los datos mostraron un aumento en el porcentaje de colonias NME26 recuperadas con cada ronda adicional. (B) Se muestra el enriquecimiento de NME26 en cada muestra después de cada ronda. El valor teórico se calcula considerando que la cepa se recupera con una abundancia del 100%.

#### 4.10. Búsqueda de microorganismos con actividad antibiótica dentro de una muestra de saliva de perro

Una vez que se comprobó la funcionalidad de la técnica mediante los controles con cepas de actividad conocida, el siguiente paso es demostrar que la técnica es útil para la identificación de microorganismos antagonistas presentes en muestras ambientales. Para ello se decidió realizar la búsqueda en una muestra de saliva de un perro doméstico (Figura 34-A). Antes de realizar el ensayo en microgeles, se evaluó a macroescala la diversidad y el crecimiento de los microorganismos cultivables presentes en la saliva de perro. Para ello se inoculó una placa de agar con la muestra y se incubó durante 48 h a 27 °C. Después de este tiempo de incubación, se observó el crecimiento de colonias con diferentes morfologías (Figura 34-B).



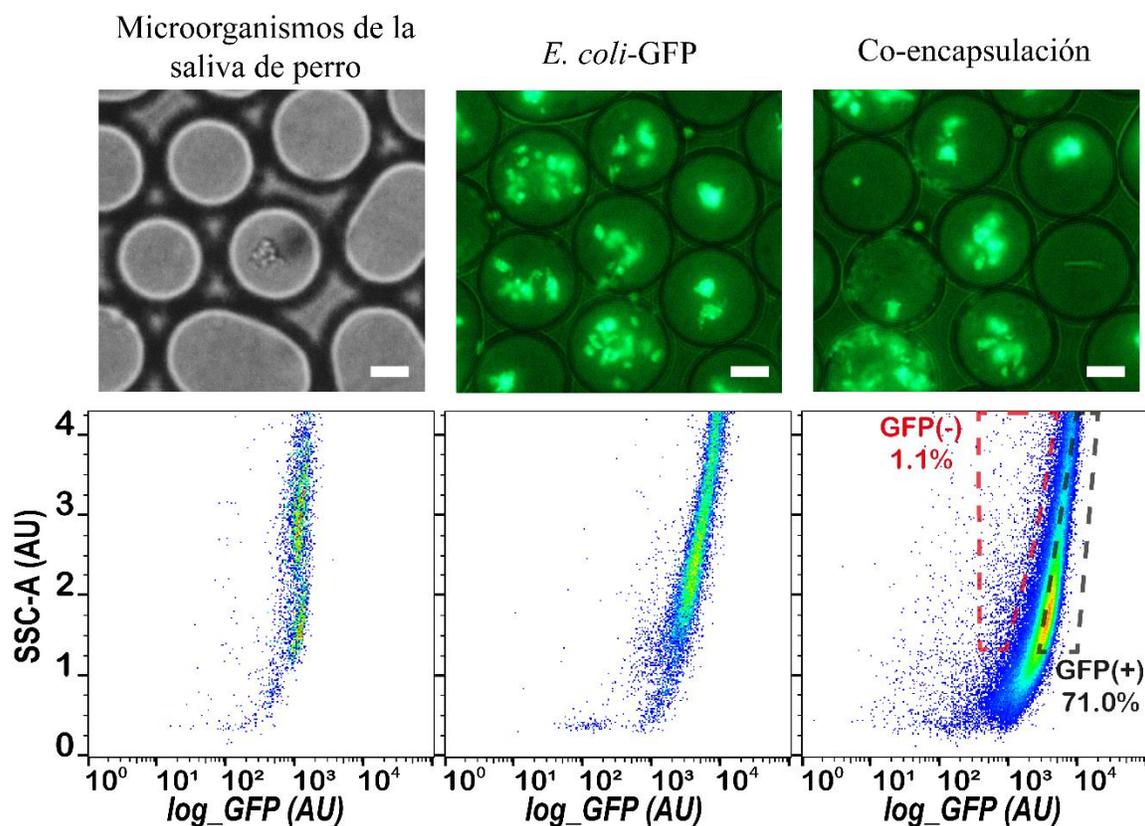
**Figura 34. (A)** Perro doméstico del cual se tomó una muestra de saliva en la que se realizó la búsqueda de microorganismos antagonistas haciendo uso de la técnica propuesta en esta tesis. **(B)** Crecimiento sobre una placa de agar de los microorganismos presentes en la saliva de perro. La fotografía fue tomada después de haber incubado la placa inoculada con la saliva de perro durante 48 h a 27 °C, barra de escala 1 cm.

Se llevó a cabo un solo ensayo de co-encapsulación en microgeles de *E. coli*-GFP junto con los microorganismos presentes en la saliva de perro mediante, se compararon tres muestras diferentes de microgeles: Una muestra ocupada solamente por los microorganismos presentes en la saliva de perro con un valor de  $\lambda$  aproximado de 0.3; la segunda fueron microgeles cargados únicamente por *E. coli*-GFP con  $\lambda$  igual a 5; y en la tercera muestra se llevó a cabo la co-encapsulación de *E. coli*-GFP junto con los microorganismos de la saliva de perro conservando los valores de  $\lambda$  de los primeros dos controles. Todas

las muestras de microgeles se incubaron durante 48 h a 27 ° y entonces se evaluó el crecimiento bacteriano dentro de los microgeles por microscopía y citometría de flujo.

Después de la incubación, por microscopía solo en el 10% en los microgeles generados con la suspensión de los microorganismos de la saliva se observó la formación de microcolonias, el resto de los microgeles quedaron vacíos. Teóricamente, se esperaba un 26% de microgeles ocupados, probablemente debido a la fracción de microorganismos no cultivables presentes en la saliva de este porcentaje fue menor después de la incubación de los microgeles. También, mediante citometría de flujo, sobre el diagrama de SSC-A vs log\_GFP se observó la señal característica de microgeles ocupados por microcolonias no fluorescentes (Figura 35, izquierda). En la muestra de microgeles cargados exclusivamente con *E. coli*-GFP, tanto por microscopía como por citometría de flujo, se observó un desarrollo típico de las microcolonias fluorescentes dentro de los microgeles (Figura 35, centro).

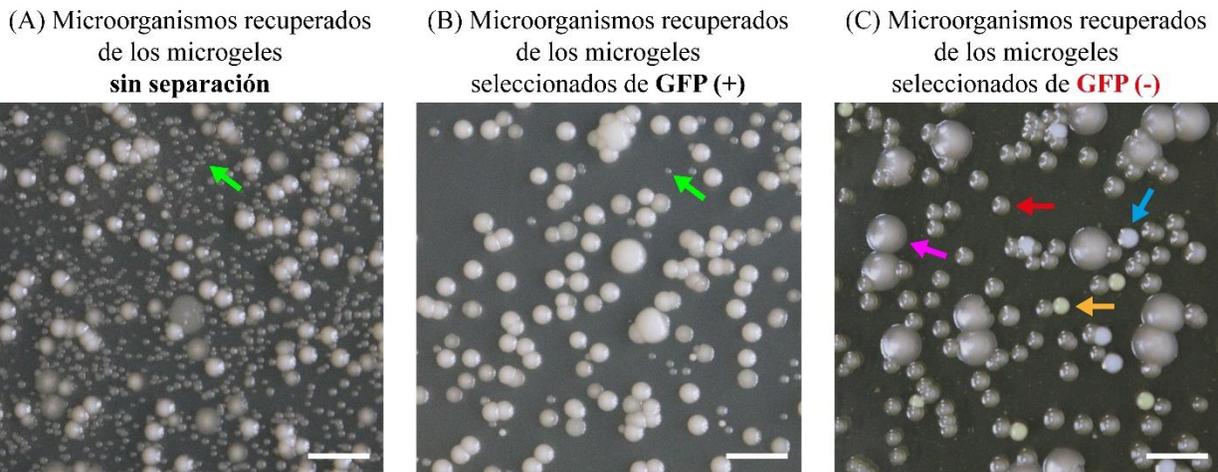
En los microgeles generados a partir de la mezcla de *E. coli*-GFP con la saliva de perro, por microscopía no se logró observar con claridad el crecimiento de microcolonias no fluorescentes ya sea solas o co-encapsuladas con *E. coli*-GFP. Sin embargo, sí se logró observar geles en donde solo creció *E. coli*-GFP o que estaban ocupados por microorganismos no fluorescentes sin aparente formación de microcolonias dentro del microgel. Sin embargo, por citometría de flujo sobre el diagrama SSC-A contra log\_GFP si registraron 1.1% de eventos dentro de la región característica de microgeles en los que el crecimiento de *E. coli*-GFP fue inhibido debido a la presencia de algún otro microorganismo no fluorescente (Figura 35, derecha). Por lo tanto, utilizando la estrategia de ventanas GFP (+) y GFP (-), descrita anteriormente, se seleccionaron los diferentes grupos de microgeles y se recuperaron dentro de microtubos de centrifuga.



**Figura 35.** Evaluación del crecimiento bacteriano por microscopía (arriba) y citometría de flujo (abajo) de tres muestras diferentes de microgeles cargados con bacterias: Izquierda, microgeles cargados con los microorganismos presentes en la saliva de perro; centro, microgeles cargados exclusivamente por microcolonias de *E. coli*-GFP; derecha, microgeles producidos de la mezcla de *E. coli*-GFP junto con los presentes en la saliva del perro. El análisis para todas las muestras se realizó después de un periodo de incubación de 48 h a 27 °C. Barra de escala 10  $\mu$ m. El gradiente de color en los diagramas representa la densidad de puntos en esa región, rojo mayor densidad de puntos, seguido por amarillo, verde y azul las regiones de menor densidad.

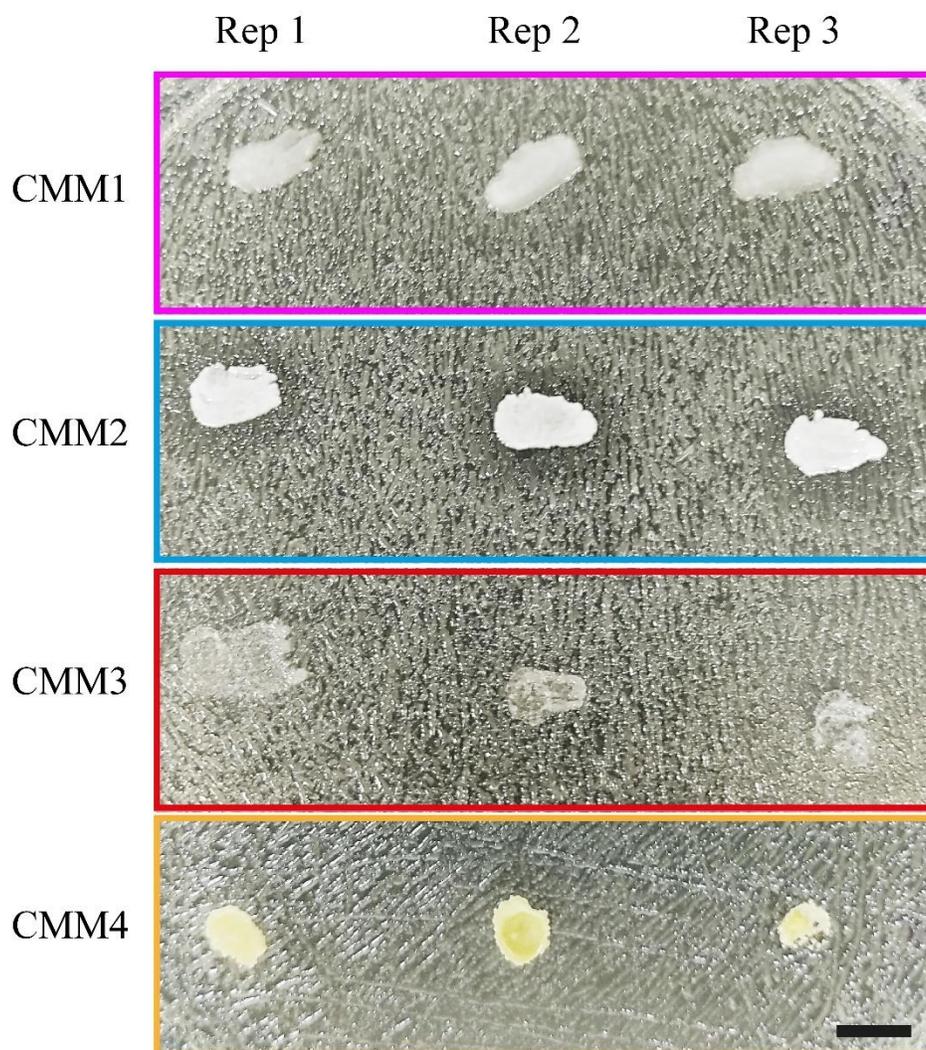
La muestra de microgeles con la co-encapsulación tanto sin separación como aquellos seleccionados con FACS fueron utilizados para inocular placas de agar y así recuperar a macroescala los microorganismos encapsulados dentro de cada microgel (Figura 36). El crecimiento bacteriano sobre estas placas se evaluó después de 48 h de incubación a 27 °C. De la muestra sin separación se obtuvo una diversidad de microorganismos con diferentes morfologías de las que se pueden identificar *E. coli*-GFP como las colonias circulares más pequeñas obtenidas (Figura 36-A). Después de la separación, de los microgeles recuperados en GFP (+) se observó una disminución en la diversidad de microorganismos obtenidos, evaluada únicamente por la morfología de las colonias que crecieron sobre las placas de agar (Figura 36-B). En este caso se logró identificar nuevamente las colonias características de *E. coli*-GFP junto con algunos otros microorganismos que aparentemente no tienen actividad antagónica contra *E. coli*-GFP pues en algunos puntos logran crecer una sobre la otra. Sin embargo, de la ventana GFP (-) no se logró observar el desarrollo de las colonias características de *E. coli*-GFP (Figura 36-C). Estos resultados indican una separación exitosa

de los microgeles ocupados por microcolonias no fluorescentes de aquellos que encapsulan microcolonias de *E. coli*-GFP.



**Figura 36.** Microorganismos recuperados sobre placas de agar de los microgeles formados a partir de la mezcla de *E. coli*-GFP junto con los microorganismos presentes en una muestra de saliva de perro. **(A)** Sin separación con FACS; **(B)** de los microgeles recuperados en la ventana GFP (+) tras la selección con FACS; y **(C)** de los microgeles recuperados de GFP (-). Con las flechas color verde se señalan algunos ejemplos de las colonias características de *E. coli*-GFP y con las flechas de otros colores se señalan ejemplos de las colonias con morfologías diferentes recuperados de la ventana GFP (-). Barra de escala 1 cm.

Después de la incubación sobre la placa inoculada con los microgeles seleccionados dentro de GFP (-) se lograron identificar cuatro microorganismos diferenciados por la morfología de las colonias que forman. Con ayuda de un palillo de esta última placa se tomaron colonias aisladas de cada uno de los microorganismos identificados, estas fueron utilizadas para realizar ensayos de antagonismo sobre placas de agar con la técnica *spot-on-lawn* contra *E. coli*-GFP (Figura 37). Después de 48 h de incubación a 27 °C de entre los 4 diferentes microorganismos recuperados solo una presentó una ligera disminución en la densidad *E. coli*-GFP a su alrededor. Dicho resultado indica que en tan solo una ronda de co-encapsulación no fue posible identificar microorganismos antagonistas dentro de la saliva de perro.



**Figura 37.** Los microorganismos presentes en la saliva de perro fueron co-encapsulados y co-incubados en microgeles junto con *E. coli*-GFP. Tras su análisis y selección con FACS, los diferentes microorganismos seleccionados de la ventana GFP (-) fueron recuperados a macroescala y su actividad antagonista frente a *E. coli*-GFP se probó sobre platos de agar mediante la técnica *spot-on-lawn*. El código de colores de los recuadros es el mismo que se presenta en la figura 36. Barra de escala 0.5 cm.

A pesar de no haber recuperado microorganismos que presentaran actividad antagonista, este ensayo plantea algunos de los problemas con los que esta técnica debe lidiar cuando se aplicó para la búsqueda de microorganismos antagonistas en muestras ambientales.

La primera complicación yace en las partículas con diámetros mayores a los 30  $\mu\text{m}$  que pueden estar suspendidos en la muestra ambiental. Estas partículas generan la obstrucción de los canales de microfluídica y desestabilizan la formación de los microgeles. Este fenómeno puede generar una serie de errores a través del ciclo completo de la metodología. Primero, heterogeneidad en el tamaño de los geles producidos y en consecuencia una incorrecta distribución en el número de bacterias por microgel. Como

resultado, desde el inicio en algunos geles no se logra la co-encapsulación, quedan únicamente ocupados por microorganismos no fluorescentes y tras la incubación y análisis con FACS estos geles, al carecer de fluorescencia, son seleccionados dentro de la ventana GFP (-) generando un falso negativo. Para solucionar este problema se recomienda filtrar las suspensiones bacterianas haciendo uso de filtros para células con diámetros de poro de alrededor de 25  $\mu\text{m}$ . También se debe prestar especial atención en la homogenización de las muestras justo antes de ser emulsionadas con los dispositivos de microfluídica, para ellos se recomienda agitar con vortex todas las suspensiones bacterianas por al menos 45 s antes de que se utilicen para la formación de microgeles.

Una segunda complicación que se presenta cuando se trabaja con muestras ambientales y esta metodología, es la incapacidad de crecimiento de algunas cepas de microorganismos dentro de los microgeles. La encapsulación en microgeles puede generar un alto estrés en los microorganismos, impidiendo su crecimiento. Se sugiere que cuando se comience a trabajar con una muestra ambiental, antes de realizar los ensayos de co-encapsulación, primero se deben de realizar ensayos para optimizar y maximizar el crecimiento dentro de microgeles de los microorganismos presentes en la muestra ambiental. Finalmente, una tercera complicación de esta metodología aplicada con muestras ambientales es la baja densidad o ausencia de microorganismos antagonistas dentro de la muestra. Para recuperar los microorganismos de baja abundancia se podrían realizar ciclos consecutivos de co-encapsulación, según lo descrito en la sección 4.9, esto permitiría enriquecer la muestra con los microorganismos antagonistas con cada ciclo de co-incubación y separación.

## 5. Discusión

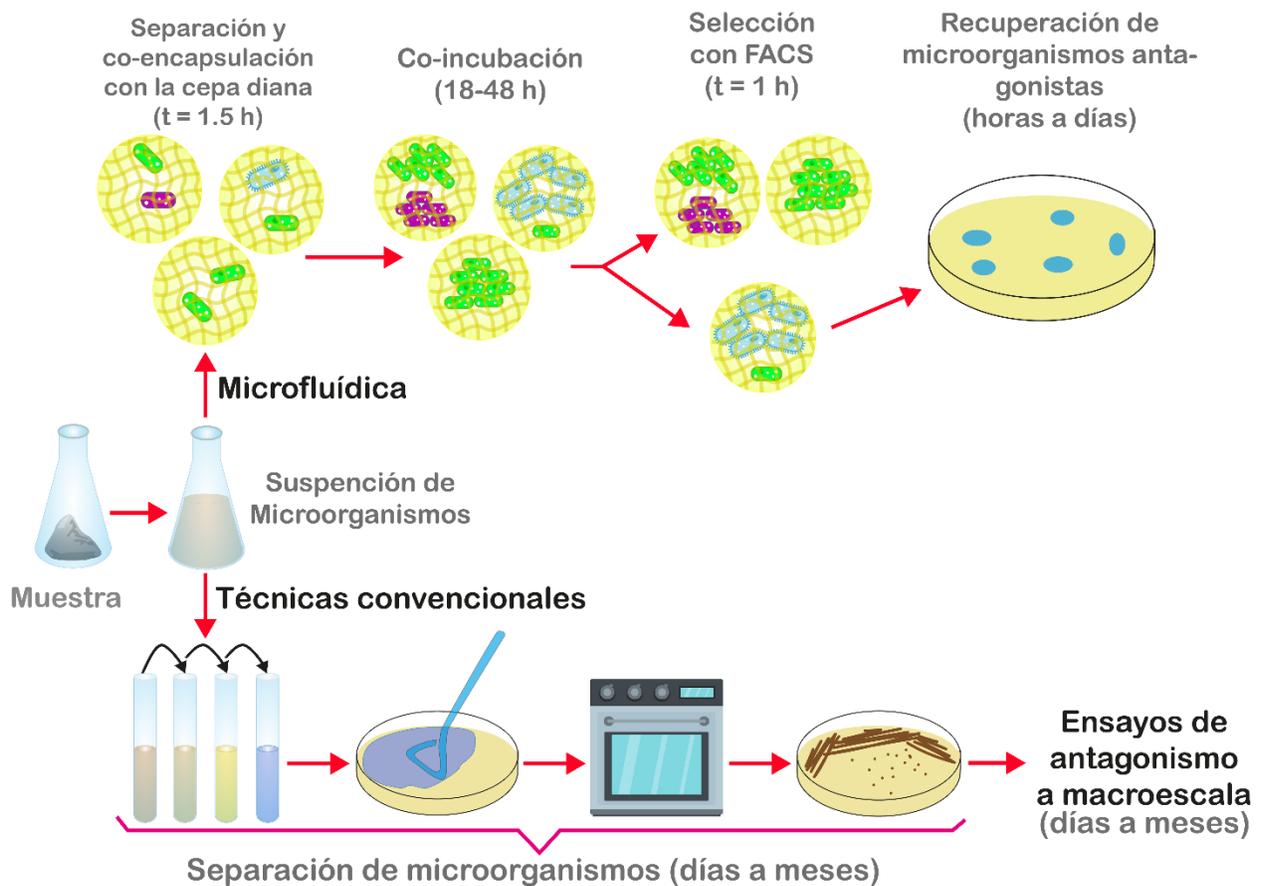
Se logró desarrollar y describir a profundidad una metodología de alta eficiencia útil para la detección y aislamiento de microorganismos que exhiben actividad antibiótica contra la cepa fluorescente *E. coli*-GFP. Se comprobó la hipótesis de esta tesis, mediante microfluídica basada en microgotas se logró el cultivo conjunto de *E. coli*-GFP junto con distintas cepas bacterianas dentro de microgeles de agarosa de aproximadamente 10 pL de volumen. Después, utilizando la técnica de FACS los microgeles fueron analizados y clasificados de acuerdo con el crecimiento bacteriano evaluado dentro de cada microgel. De tal forma, se logró la recuperación de los microgeles en los que inicialmente se co-encapsuló una cepa con actividad antagonista. Finalmente, el cultivo de los microgeles seleccionados sobre placas de agar permitió la recuperación a macroescala de las cepas con actividad antagonista.

La encapsulación conjunta de las diferentes cepas dentro de microgeles se logró mediante la emulsificación, con un dispositivo de microfluídica, de una suspensión de microorganismos que contenía mezcladas las células de *E. coli*-GFP junto con los microorganismos cuya actividad se probó contra la misma. Mediante el ajuste de la densidad bacteriana de esta mezcla, la emulsificación permitió en un solo paso aislar las células de las diferentes cepas presentes en la muestra y co-encapsularlas junto con células de *E. coli*-GFP. La formación de estos microgeles se logró a frecuencias de 700 Hz, lo que equivale a preparar en un segundo 700 diferentes ensayos para probar la actividad antagónica entre pares de microorganismos sin la necesidad de pasos previos de aislamiento.

Para realizar este tipo de ensayos mediante técnicas con placas de agar o con placas de pozos es necesario aislar previamente los microorganismos presentes en la muestra de estudio, y después ensayar uno a uno la actividad frente al microorganismo diana de cada microorganismo aislado, lo que implica tiempo y recursos.<sup>59</sup> Por ejemplo, si mediante placas de 1536 pozos se quisiera ensayar la actividad de  $10^6$  microorganismos provenientes de una muestra ambiental, entonces se necesitarían aislar cada individuo de la muestra y colocarlos por separado en un pozo, por lo tanto se necesitarían 652 placas de pozos. Después, con un lector de placas se necesitarían analizar las 652 placas. El proceso puede ser automatizado mediante robots, sin embargo, incluso mediante metodologías optimizadas con placas de 1536 pozos, analizar 1 millón de pozos tomaría aproximadamente 2 meses.<sup>60</sup>

En cambio, para ensayar  $10^6$  microorganismos mediante la metodología propuesta en esta tesis, solo se necesita diluir la muestra para obtener un valor de  $\lambda=0.3$ , mezclar con la cepa diana y emulsificar en microgeles. Considerando la distribución de Poisson, solo en el 26% de los microgeles formados se logra la co-encapsulación de la cepa diana junto con algún microorganismo proveniente de la muestra. Por lo tanto, se necesitarían formar alrededor de 4 millones de microgeles para lograr el aislamiento y co-

encapsulación de cada microorganismo junto la cepa diana, a la frecuencia de 700 Hz que se obtuvo en este trabajo, este proceso solo tomaría 1 h con 35 min. Tras la encapsulación, los microgeles se incuban en un microtubo de centrifuga, lo que facilita un control en la temperatura y demás condiciones de incubación. El crecimiento bacteriano dentro de los microgeles depende de la velocidad de crecimiento de las cepas encapsuladas. Por ejemplo, en este trabajo, para las bacterias aisladas del maíz la formación de microcolonias dentro de los microgeles se observó después de 18 h de incubación a 27 °C y 48 h para los microorganismos presentes en la saliva de perro (Figura 38) .



**Figura 38.** Comparación entre la metodología propuesta en esta tesis frente a una metodología a macroescala para la detección de microorganismos con actividad antagonista.

Después del periodo de incubación, en este trabajo se logró una eficiencia de clasificación, definida como la velocidad a la que el equipo analiza las partículas dentro de una muestra, de hasta 1000 eventos/s. De tal forma, y siguiendo con el ejemplo anterior, analizar y separar 4 millones de microgeles tomaría poco más de una hora. La eficiencia de clasificación obtenida en este trabajo es comparable con las reportadas previamente por metodologías similares, donde utilizando FACS o FADS se llevó a cabo la selección de microgotas (agua en aceite) o emulsiones dobles (agua-aceite-agua) con eficiencias entre 200 y 30,000

eventos por segundo (Tabla 5). La eficiencia de clasificación puede ser modulada mediante tres parámetros diferentes: La concentración de los microgeles en la muestra y la velocidad a la cual esta se inyecta en el equipo de FACS, así como la velocidad que se utiliza en la fase envolvente del equipo de citometría. Los objetivos de este trabajo no comprendieron el estudio ni la optimización de dichos parámetros. Sin embargo, estudios anteriores han demostrado que la eficiencia de la separación de dobles emulsiones con FACS se puede mejorar mediante la modulación de estos parámetros.<sup>37</sup> Pero, es importante considerar que mientras mayor sea la velocidad de análisis mayor es la probabilidad de que el equipo genere un falso positivo y seleccione microgeles sin fluorescencia dentro de una ventana designada para microgeles con fluorescencia o viceversa.<sup>61</sup>

**Table 5.** Comparación entre la metodología reportada en esta tesis y seis metodologías similares reportadas con anterioridad relevantes en el análisis y selección de microgeles o dobles emulsiones cargadas con microorganismos o biomoléculas.

Referencia*	Partículas analizadas	Material encapsulado	Tamaño de partícula (µm)	Técnica de selección utilizada	Eficiencia de selección (eventos/s)	# de fluoróforos utilizados para la selección
Esta tesis	Microgeles	Células	27±1	FACS	1 000	1
(38)	Microgeles	Células	90-500	FACS	300	2
(39)	Microgeles	Células	120-200	FACS	1 000	2
(40)	Microgeles	Células	~27	FACS	3 000	2
(47)	Emulsiones dobles	Células	~25	FACS	30 000	2
(37)	Emulsiones dobles	Productos de PCR	28-48	FACS	300	1
(35)	Microgotas	Células	70-80	FADS	10-50	1

\* El número de referencia corresponde a la lista al final de esta tesis.

En la metodología desarrollada y descrita en esta tesis se utilizan las técnicas de microscopía y citometría de flujo para diferenciar las características morfológicas y de fluorescencia de las microcolonias cultivadas dentro de los microgeles. Este enfoque permite una correlación de las observaciones por microscopía junto con las señales de esparcimiento de la luz y fluorescencia obtenidas con FACS para cada microgel analizado. Mientras mayor sea el crecimiento bacteriano dentro de los microgeles mayor es la intensidad de las señales de esparcimiento de la luz. Particularmente, las señales de SSC obtenidas mediante FACS demostraron ser útiles para distinguir entre microgeles vacíos, microgeles cargados con bacterias y células libres. Además, mediante el uso de un solo marcador fluorescente (GFP), la correlación entre intensidad de fluorescencia y las señales de SSC-A permitieron un análisis bidimensional que facilitó la clasificación de los microgeles. De tal forma, dentro de una mezcla de cientos de miles de microgeles se lograron

seleccionar aquellos que albergaban alguna cepa con propiedades antagonistas contra la cepa reportera utilizando solamente la intensidad de fluorescencia de *E. coli*-GFP asociada a las señales de esparcimiento de la luz (SSC-A). En las anteriores metodologías reportadas comúnmente utilizan hasta dos marcadores de fluorescencia diferentes para la selección de microorganismos (Tabla 5). Por lo tanto, la correlación y uso de las señales de esparcimiento de la luz con la intensidad de fluorescencia, que se discuten en este trabajo, resulta una simplificación en las estrategias utilizadas para la selección y recuperación de microorganismos utilizando enfoques de microfluídica basada en microgotas.

Además, mediante las múltiples rondas de co-encapsulación y clasificación que se pueden llevar a cabo con esta metodología, se logró la detección de las cepas productoras de antibióticos presentes una mezcla de microorganismos con una abundancia relativa tan baja como el 0.01%. Se demostró un aumento en la abundancia de la cepa de interés por cada ronda de co-cultivo y clasificación. De tal forma, después de 3 rondas, la abundancia de la cepa antagonista aumentó desde 0.01% hasta el 98.7% como se mostró en la Figura 33. Este resultado confirma que la metodología propuesta es útil para aislar cepas productoras de antibióticos con una baja abundancia inicial en una muestra ambiental, las cuales comúnmente presentan una alta diversidad de microorganismos con una amplia distribución en la abundancia.<sup>52,62</sup> Si la cepa de interés está presente en gran abundancia, su aislamiento podría lograrse después de una sola ronda de co-incubación y clasificación. Sin embargo, si se buscan especies con baja abundancia, entonces se pueden realizar varios ciclos hasta que la muestra se enriquezca con las cepas de interés.

Se han reportado enfoques similares que utilizan FACS para la clasificación de emulsiones dobles<sup>36,47,48,50</sup> o sistemas de selección de microgotas de agua en aceite (FADS)<sup>35</sup> para la identificación de microorganismos con actividad bactericida. Sin embargo, para producir emulsiones dobles, se necesitan dispositivos de microfluídica con tratamientos en la superficie de los canales que les confieran propiedades hidrofílicas en una sección e hidrofóbicas en otra sección diferente del diseño de microcanales (Figura 7-A).<sup>44</sup> Por otro lado, la clasificación de partículas con FADS solo se ha demostrado con un máximo de dos parámetros fluorescentes diferentes,<sup>63</sup> lo cual es menos ventajoso que las combinaciones de señales de esparcimiento y diferentes canales de fluorescencia que ofrece FACS para la selección de partículas. Además, las emulsiones dobles y las de solo agua en aceite requieren diferentes concentraciones y especies de tensoactivos para la estabilización de partículas a través del proceso de clasificación.<sup>37</sup> En comparación, los microgeles se producen en dispositivos de microfluídica con geometrías sencillas de enfoque de flujo. Además, los microgeles se producen con concentraciones bajas (0.5%) del tensoactivo fluorinado. Una vez que se transfieren a la fase acuosa, no es necesario mantener la concentración de tensoactivo, ya que el

entrelazamiento entre las moléculas que conforman la agarosa mantiene la estabilidad de los microgeles durante su análisis con FACS. Estas simplificaciones permiten una transferencia más sencilla hacia la microfluídica de los ensayos de microbiología que hoy en día se realizan a macroescala. Sin embargo, una importante desventaja del uso de agarosa es la necesidad de calentar las muestras de microorganismos antes de la formación de los microgeles, esto puede ocasionar que algunas de las células presentes en la muestra pierdan su viabilidad. Como alternativa, se podría evitar el paso de calentamiento si se producen los microgeles con diferentes agentes gelificantes, tal como las proteínas reticuladas<sup>64</sup> o mediante la adición de alginato<sup>65</sup> en lugar de la agarosa.

## 5.1. Perspectivas

La metodología aquí descrita permite la recuperación de bacterias antagonistas cultivables. Sin embargo, la mayor parte de nuestro conocimiento sobre el mundo microbiano se deriva de una muy baja diversidad de especies microbianas que pueden cultivarse en el laboratorio con respecto a las que existen en la naturaleza.<sup>66</sup> En consecuencia, los microorganismos no cultivables representan una fuente muy prometedora de productos naturales con propiedades antibióticas.<sup>67</sup> Por lo tanto, una de las perspectivas más importantes de este proyecto es la implementación de análisis metagenómicos de los microorganismos seleccionados tras la co-incubación en microgeles y clasificación con FACS. Este enfoque podría ayudar a identificar dentro de muestras ambientales a los microorganismos antagonistas que no han sido descritos debido a la incapacidad de su cultivo mediante las técnicas de microbiología existentes.

Una vez confirmada la capacidad de esta metodología para la identificación de bacterias con actividad antibiótica es importante demostrar su aplicabilidad en muestras ambientales. Por tal motivo, hoy en día ya se han derivado tres proyectos de licenciatura que la han aplicado para la búsqueda de microorganismos antagonistas en tres muestras diferentes. En todos los cuales me he desarrollado como asesor técnico, dando asesoría en la aplicación de la metodología y en el seguimiento de los experimentos y los resultados.

El primero de estos trabajos se realizó por el alumno de licenciatura Joaquín Humberto Lara Baños, él realizó la búsqueda de microorganismos antagonistas en una muestra de tierra tomada de un jardín. Después del co-cultivo en microgeles de *E. coli*-GFP junto con cada microorganismo de esta muestra y su análisis acoplado a FACS, Joaquín logró aislar cuatro microorganismos diferentes con actividad antagonista contra la cepa *E. coli*-GFP. Mediante un servicio de secuenciación estos microorganismos han sido caracterizados como: *Desemzia incerta*; *Bacillus velezensis*; *Shigella flexneri*; y *Escherichia fergusonii*.

Particularmente, la cepa *Desemzia incerta* resulta de interés por la fuerte actividad antagónica evaluada mediante ensayos *spot-on-lawn*. Además, es una cepa muy poco estudiada, por lo que es lógico pensar que de esta cepa sea más probable identificar algún metabolito con actividad antibiótica y que posea una estructura molecular novedosa. Por tal motivo, el alumno Luis Fernando de Anda Ramírez se encuentra trabajando en un proyecto enfocado en la identificación de los metabolitos con actividad antibiótica excretados por *Desemzia incerta*.

El segundo y tercer proyectos derivados se encuentran a cargo de Paulina Guadalupe De la Luz Angeles y Yesica Rodríguez Hernández. Paulina decidió realizar la búsqueda de microorganismos antagonistas dentro de alimentos en descomposición, particularmente en el chile poblano. Por su lado, Yesica se encuentra realizando la búsqueda en la bebida fermentada conocida como Tepache. Después de un semestre trabajando en sus proyectos tanto Paulina como Yesica han llevado a cabo la co-encapsulación en microgeles de *E. coli*-GFP junto con los microorganismos presentes en sus respectivas pruebas. Después de dos ciclos de co-encapsulación y análisis con FACS cada una de ellas ha logrado aislar al menos dos cepas diferentes con actividad antagonista. Actualmente, ambas alumnas se encuentran trabajando en la caracterización de las cepas aisladas, así como en una evaluación cuantitativa de la capacidad que tienen estos microorganismos de inhibir el crecimiento de *E. coli*-GFP.

La aplicación de esta metodología se puede ampliar al estudio de cepas reporteras diferentes a *E. coli*-GFP, para ello, mediante colaboraciones se podría buscar acceso a cepas patógenas diferentes con la capacidad de expresar alguna proteína fluorescente. Así mismo, la metodología se podría utilizar para el estudio de actividades emergentes debido a la co-incubación de microorganismos en comunidades de microorganismos más grandes y diversas que la interacción por pares. Este tipo de ensayo se podría lograr fácilmente mediante la modificación de la densidad inicial de microorganismos que se utiliza para la encapsulación en microgeles de acuerdo con la distribución de Poisson.

## 6. Conclusión

Se logró el desarrollo de una metodología de alta eficiencia que utiliza microfluídica y FACS para la detección, clasificación y aislamiento de bacterias con actividad antagonista contra una cepa diana con propiedades fluorescentes. La estrategia combina la alta capacidad de análisis y selección de FACS junto con la eficiencia y las ventajas de la co-encapsulación y co-incubación dentro de microgeles de microfluídica de los microorganismos presentes en una muestra ambiental. Esta metodología elimina la necesidad de un aislamiento previo de microorganismos, cuyo procedimiento es necesario en las técnicas de microbiología a macroescala. De tal forma, mediante esta metodología se reduce significativamente, en el orden de días, el tiempo necesario para realizar escrutinios de muestras ambientales para la identificación de cepas productoras de antibióticos.

Mediante la correlación entre las observaciones realizadas por microscopía y las señales obtenidas mediante FACS, se lograron diferenciar los microgeles cargados con *E. coli*-GFP en conjunto con bacterias antagonistas y separarlos de aquellos en los que *E. coli*-GFP se encapsulaba sola o junto con una cepa no antagonista. Además, en este trabajo se enfatiza la utilidad de las señales de esparcimiento de la luz (FSC y SSC) para distinguir los microgeles según la morfología de las bacterias encapsuladas. También, al combinar las señales de SSC junto con la intensidad de un único marcador de fluorescencia (GFP), se lograron identificar, seleccionar y recuperar los microgeles en los que se cultivó conjuntamente una cepa antagonista con *E. coli*-GFP, por tal razón esta metodología simplifica el proceso de selección.

La información presentada comprueba la capacidad de la metodología propuesta para realizar ensayos de alta eficiencia que permitan identificar y recuperar microorganismos biológicamente activos en muestras ambientales. En consecuencia, el siguiente paso en el desarrollo de esta técnica consiste en su aplicación en el análisis de diversas muestras ambientales, priorizando aquellas provenientes de fuentes inexploradas que podrían albergar microorganismos raros o no previamente reportados, incrementando así la probabilidad de descubrir moléculas con propiedades antibióticas y estructuras moleculares novedosas. Este aspecto adquiere una relevancia significativa en la lucha contra la creciente resistencia a los antimicrobianos que afecta tanto a México como al resto del mundo.

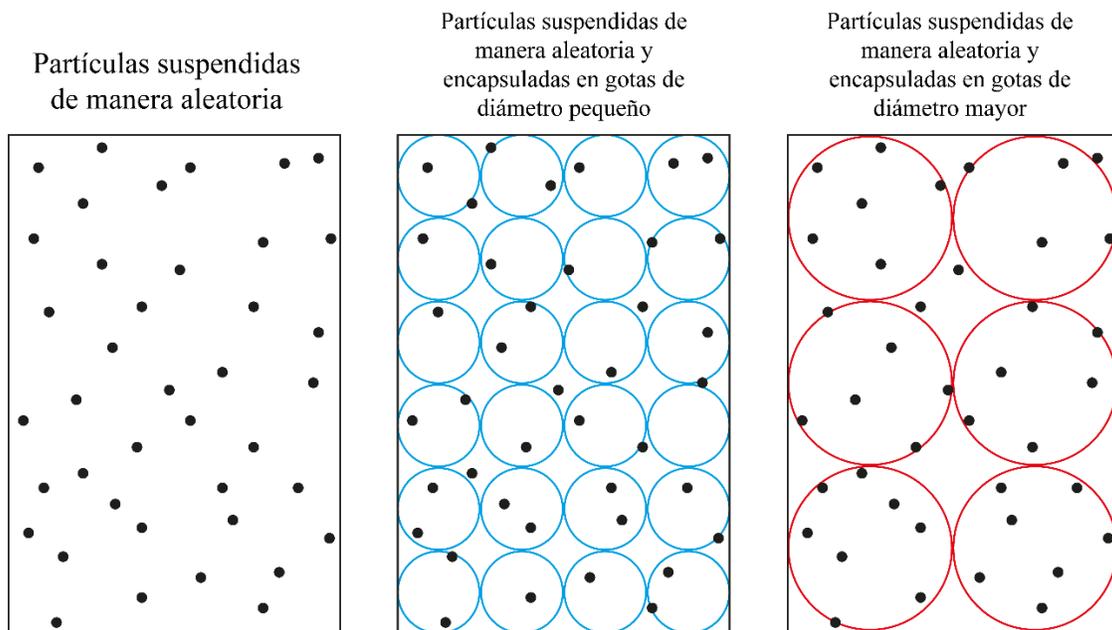
## 7. Anexos

# ANEXO I. Distribución de Poisson para las células encapsuladas en microgeles

La encapsulación de bacterias en microgeles es un fenómeno que sigue la distribución de Poisson, cuya función de probabilidad presenta a continuación:

$$P(x) = \frac{\lambda^x}{x!} e^{-\lambda}$$

En este caso  $x$  corresponde al número de células encapsuladas por microgel mientras que el parámetro  $\lambda$  es el valor promedio de células por microgel. Este último depende tanto de la densidad bacteriana utilizada para formar los microgeles, así como del volumen de los microgeles formados. Por ejemplo, si se mantiene constante la densidad bacteriana, pero se cambia el tamaño de los microgeles, entonces el valor de  $\lambda$  será menor en los microgeles de diámetro pequeño en comparación con el número de bacterias encapsuladas en microgeles de mayor diámetro (Figura 39). Por otro lado, si lo que se mantiene constante es el tamaño de los microgeles, un aumento en la densidad bacteriana generará un aumento en el valor de  $\lambda$ .

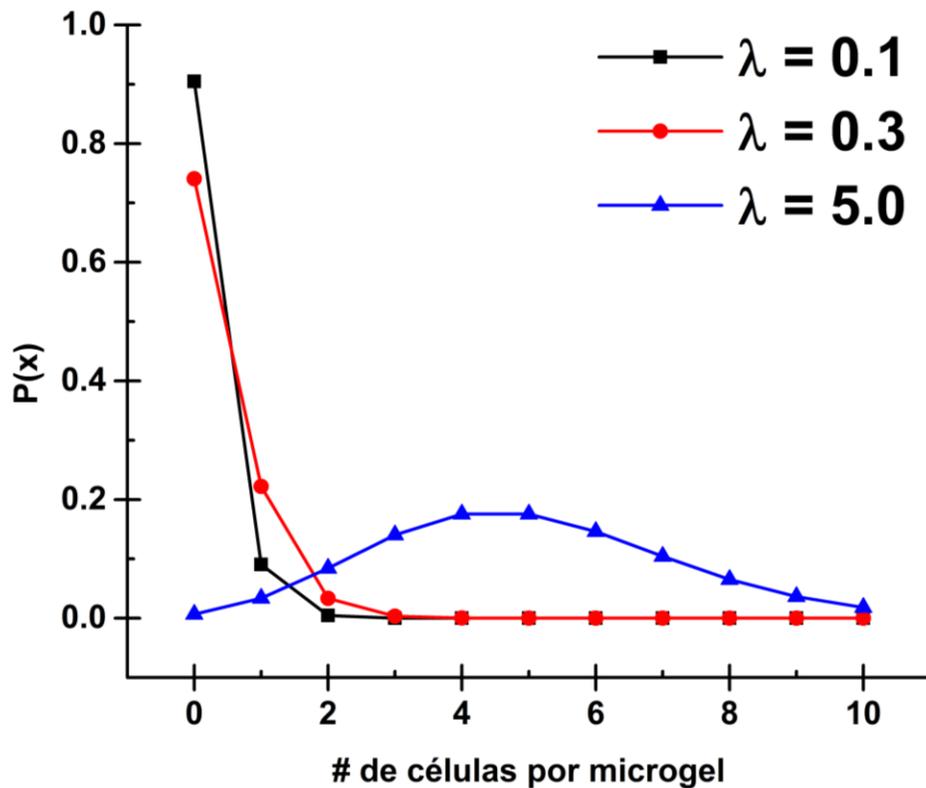


**Figura 39.** Esquematización del proceso de encapsulación de partículas, suspendidas de manera aleatoria, en círculos de diámetros diferentes. Este proceso es similar a la encapsulación de bacterias en microgeles. En el primer caso de encapsulación con los círculos azules se obtiene un valor de  $\lambda$  cercano a 2. Pero, conforme aumenta el diámetro de los microgeles, manteniendo la misma densidad de bacterias, entonces el valor de  $\lambda$  aumenta aproximadamente a 6.

Por lo tanto, experimentalmente el valor de  $\lambda$  se puede modular de acuerdo con el número de bacterias deseadas por microgel de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\lambda = \left( \text{Densidad de bacterias en suspensión}, \frac{\text{CFU}}{\text{pL}} \right) * (\text{Volumen promedio de los microgeles}, \text{pL})$$

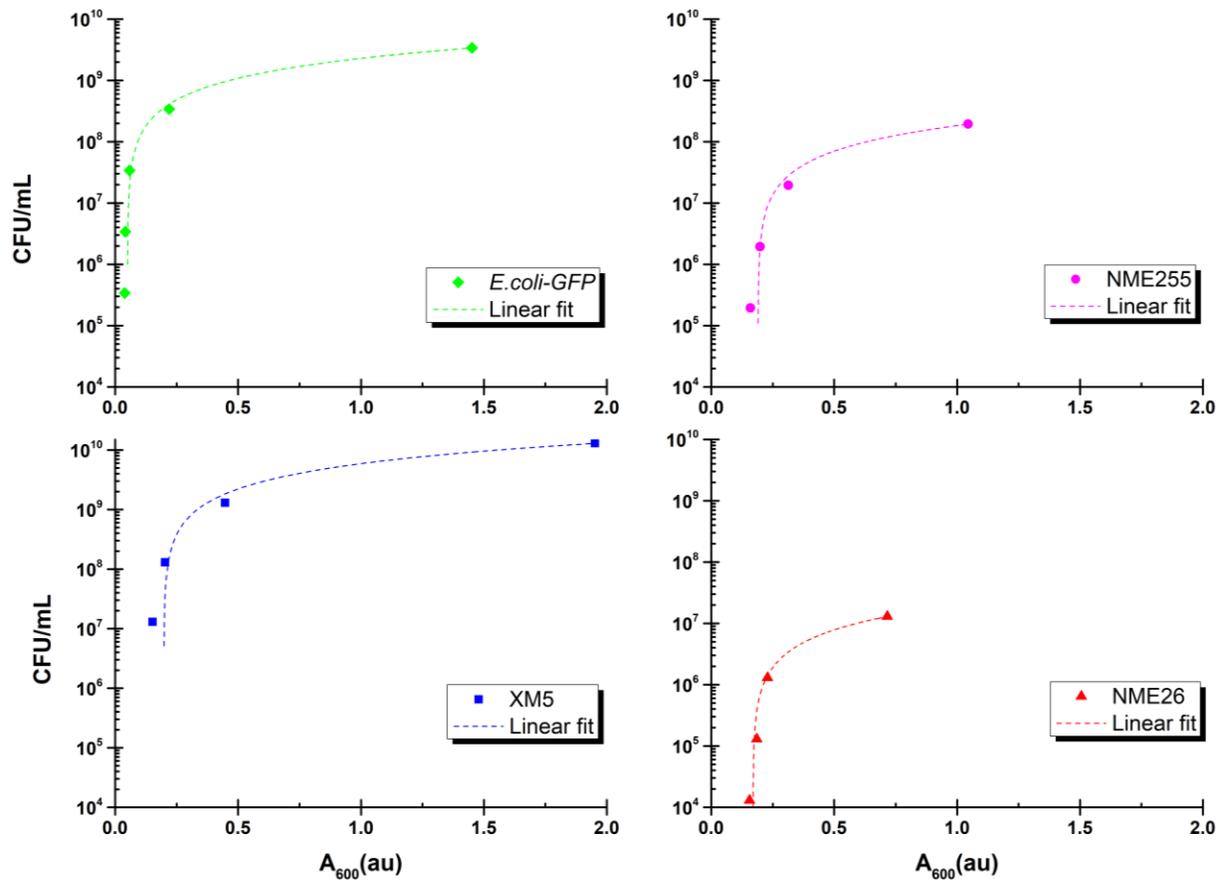
En este trabajo se utilizaron valores de  $\lambda$  igual a 0.1, 0.3 y 5.0 bacterias por microgota, cuya distribución de ocupación se presenta en la figura 40.



**Figura 40.** Distribución de Poisson para la encapsulación de bacterias en microgeles a los diferentes valores de  $\lambda$  utilizados en los experimentos que se discuten en esta tesis. Para generar estas gráficas se debe de calcular la probabilidad  $P(x)$  para cada valor entero en el eje X (número entero de células por microgel) utilizando la ecuación presentada en la página anterior.

## ANEXO II. Curvas de absorbancia en función de la densidad bacteriana

Para cada una de las cepas utilizadas en los experimentos descritos en esta tesis se llevó a cabo la construcción de curvas de correlación entre el número de bacterias observadas al microscopio con una cámara de Neubauer (BRAND, 0.1 mm profundidad) y los valores de absorbancia a 600 nm medidos para cuatro diluciones consecutivas (1 a 10) de cada cepa utilizada. Para una mejor eficiencia en el conteo de bacterias con la cámara de Neubauer, las cepas del maíz se tiñeron con BacLight-Red (ThermoFisher Scientific) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.



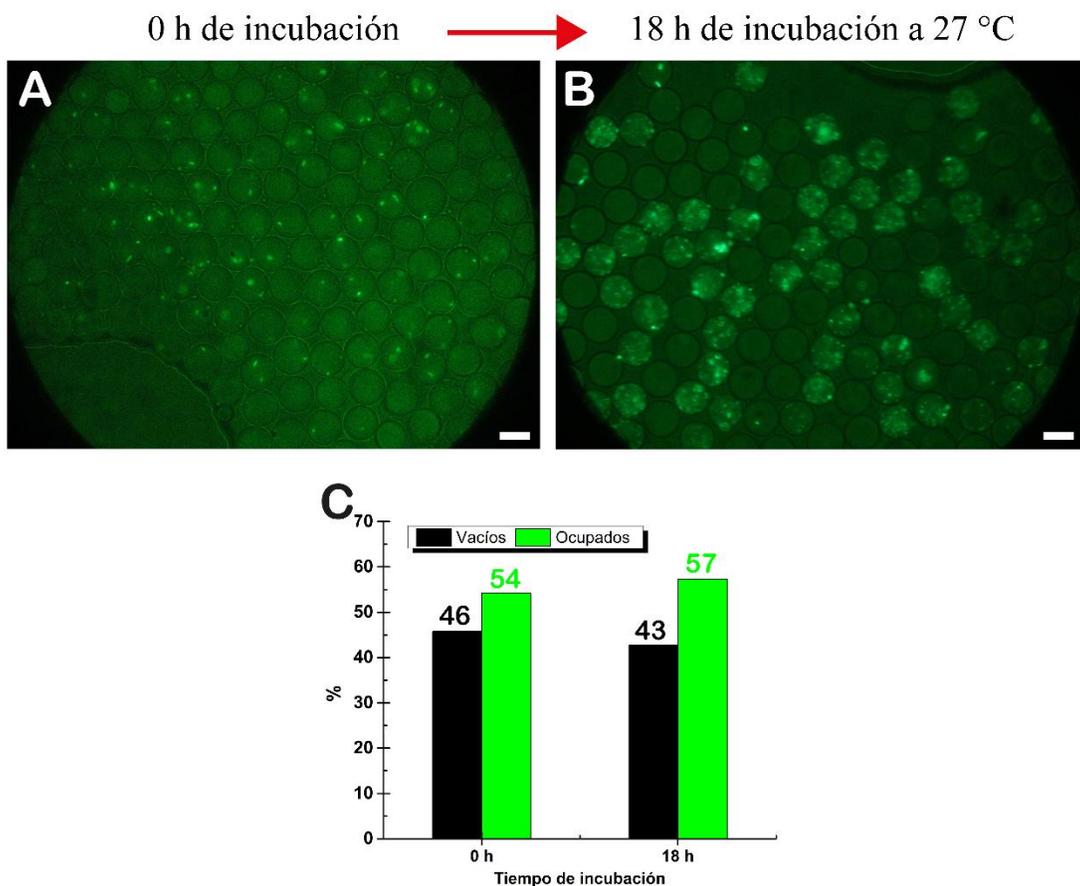
**Figura 41.** Relación entre el número de bacterias por mililitro (UFC/mL) y la densidad óptica medida a 600 nm ( $A_{600}$ ) para cada una de las cepas bacterianas utilizadas en esta tesis. Con líneas punteadas se muestra el ajuste lineal obtenido para cada caso.

**Tabla 6.** Parámetros obtenidos por ajuste lineal de la relación entre UFC/mL vs  $A_{600}$  para cada una de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Equation	$y = a + b \cdot x$			
	<i>E. coli-GFP</i>	NME255	XM5	NME26
Residual Sum of Squares	4.25E+17	6.37E+15	1.25E+14	1.89E+11
Pearson's r	0.998	0.999	0.998	0.999
Adj. R-Square	0.995	0.999	0.993	0.998
		Valor	SD	
<i>E. coli-GFP</i>	a	-1.46E+09	3.15E+08	
	b	7.37E+09	3.12E+08	
NME255	a	-1.21E+08	2.47E+07	
	b	2.42E+09	3.75E+07	
XM5	a	-4.30E+07	6.14E+06	
	b	2.26E+08	1.10E+07	
NME26	a	-4.02E+06	2.65E+05	
	b	2.37E+07	6.71E+05	

## ANEXO III. Contaminación entre microgeles

Se llevó a cabo la encapsulación de células de *E. coli*-GFP en microgotas. La densidad bacteriana inicial se fijó tal que el 50% de los microgeles producidos resulten ocupados por bacterias y la otra mitad vacíos ( $\lambda=0.7$ ). Mediante microscopía de fluorescencia se determinó la fracción experimental obtenida de microgeles ocupados y vacíos en dos momentos diferentes: los microgeles justo después de haberse formado (0 h de incubación); y después de 18 h de incubación a 27 °C. Como se muestra en la siguiente figura, el porcentaje de microgeles vacíos y ocupados ( $n=250$ ) no cambia significativamente después del tiempo de incubación. Este resultado indica que las bacterias no se liberan ni se mezclan con otros microgeles durante el periodo de incubación en el aceite fluorado. Por lo tanto, cada microgota resulta un ensayo independiente.



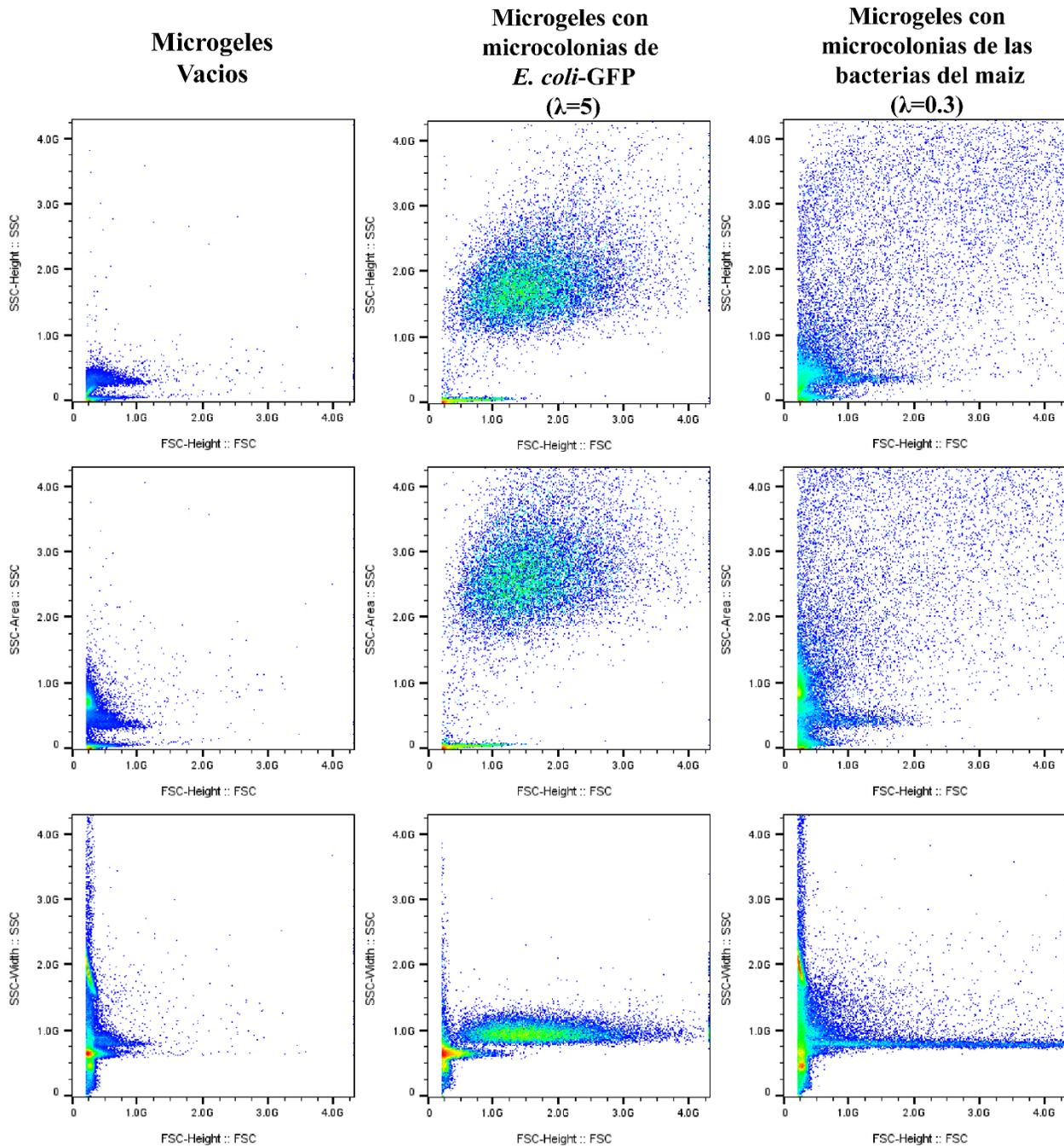
**Figura 42.** Imágenes de microscopía de fluorescencia para: (A) Muestra representativa de una población de microgeles sin incubación que encapsulan *E. coli*-GFP ( $\lambda = 0.7$ ); y (B) después de 18 h de incubación, barra de escala 20  $\mu\text{m}$ . (C) Proporción entre los microgeles vacíos y los microgeles ocupados, analizados tanto en el momento inicial (0 h) como después de 18 h de incubación ( $n=250$ ).

## ANEXO IV. Combinaciones posibles entre los diferentes parámetros de las señales de esparcimiento de la luz

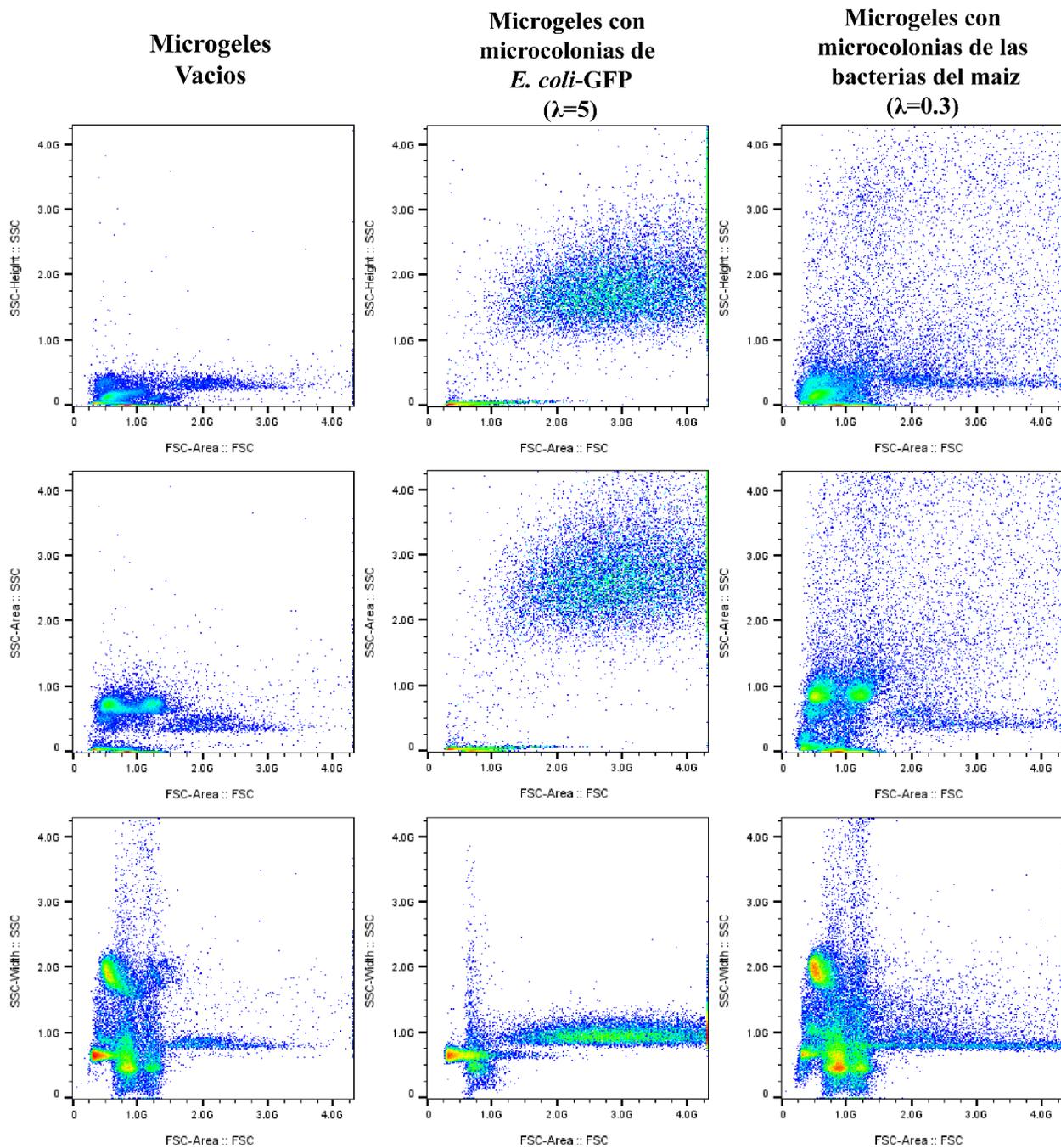
Utilizando FACS, se realizó el análisis de todas las combinaciones posibles entre los diferentes parámetros de las señales de esparcimiento de la luz (SSC frente a FSC) obtenidas para tres muestras diferentes de microgeles, todas incubadas durante 18 h a 27 °C: microgeles vacíos; microgeles cargados con microcolonias de *E. coli*-GFP ( $\lambda=5$ ); y microgeles cargados con microcolonias de alguna de las cepas aisladas de maíz ( $\lambda=0.3$ ). En la parte I de la Figura 43 se muestran todas las combinaciones posibles de FSC-H (altura de la señal de esparcimiento frontal) con los tres parámetros posibles de las señales de SSC (H-altura, W-ancho y A-área) obtenidas para las diferentes muestras de microgeles analizadas con FACS. En la parte II de la Figura 43, se muestran todas las combinaciones entre FSC-A (área de la señal de esparcimiento frontal) contra las señales SSC.

Generalmente, para los microgeles FSC-A produce señales de mayor intensidad que FSC-H. Específicamente, cuando se utilizó FSC-A para los microgeles cargados con bacterias, una proporción significativa de los eventos registrados saturaron el detector y los puntos presentaron valores sobre el límite derecho del eje X. Debido a este comportamiento se decidió utilizar FSC-H en lugar de FSC-A.

Con respecto a las señales de SSC, la altura de las señales de esparcimiento lateral (SSC-H) para los microgeles vacíos se mantuvo consistentemente por debajo de 0.75 UA, mientras que las poblaciones de microgeles cargados con bacterias se diferenciaron con valores superiores a 0.75 UA. Por el contrario, cuando se utilizó el área (SSC-A) o el ancho (SSC-W) de las señales de esparcimiento lateral, para los microgeles vacíos se registraron eventos distribuidos a lo largo de todo el rango del eje Y. Esto provoca la superposición entre la población de microgeles vacíos y la población microgeles cargados con las bacterias aisladas del maíz. Por lo tanto, para los experimentos realizados, los gráficos de densidad de puntos de SSC-H contra FSC-H representan la asociación de parámetros más adecuada para discriminar entre microgeles vacíos de aquellos ocupados con bacterias utilizando solamente las señales de esparcimiento de la luz obtenidas con FACS.



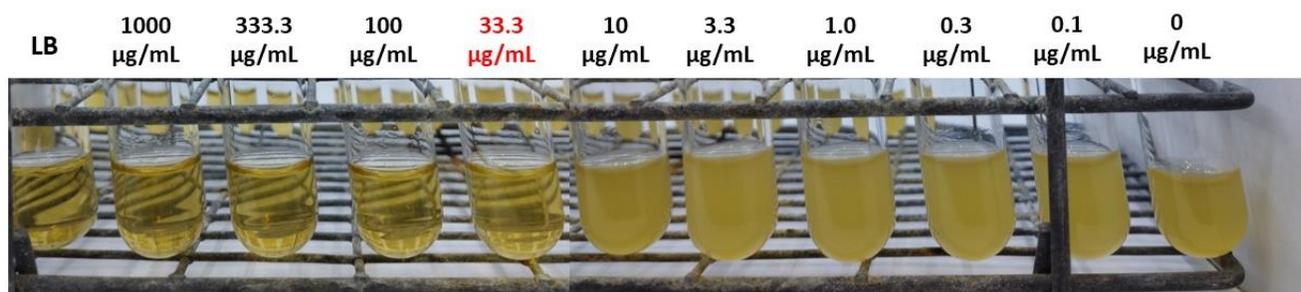
**Figura 43 (Parte I).** Gráficos de densidad de puntos obtenidos por citometría de flujo para tres muestras diferentes de microgeles según se indica en el encabezado de cada columna de imágenes. En esta sección de la figura se comparan los tres parámetros de SSC (H-altura, A-área y W-ancho) contra la altura de la señal de esparramiento frontal de la luz (FSC-H).



**Figura 43 (Parte II).** En esta sección de la figura se comparan los tres parámetros de SSC (H-altura, A-área y W-ancho) contra el área de la señal de esparramiento frontal de la luz (FSC-A).

## ANEXO V. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y bactericida (MBC) de la kanamicina contra *E. coli*-GFP

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de la kanamicina contra *E. coli*-GFP se llevaron a cabo ensayos de crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de kanamicina. Primero, se inocularon 20 mL de medio LB con dos colonias *E. coli*-GFP. Este volumen se dividió en 10 partes iguales, cada una dispuesta en tubos de ensaye limpios y estériles. Después, se agregó kanamicina a cada tubo en concentraciones que variaban desde los 0 hasta los 1000  $\mu\text{g/mL}$ , tal como se muestra en la Figura 44. Todos los microtubos se incubaron durante 18 h a 27 °C y 200 rpm. Después de este tiempo de incubación, mediante inspección visual se determinó que la MIC es cercana a los 33.3  $\mu\text{g/mL}$ , ya que a concentraciones más altas ya no se observó un aumento en la turbidez de la suspensión bacteriana después del tiempo de incubación.



**Figura 44.** Ensayos a macroescala realizados para la determinación de la MIC, resaltada en rojo, de la kanamicina contra *E. coli*-GFP.

Las suspensiones bacterianas obtenidas después de su incubación para determinar la MIC fueron utilizados para determinar la Concentración Mínima Bactericida (MBC). Para ello, de forma independiente, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada suspensión presentada en la Figura 44 y se utilizaron para inocular una placa de medio LB-Agar, el procedimiento se realizó por triplicado. El crecimiento bacteriano sobre las placas se evaluó después de 18 h de incubación a 27 °C. Como se ilustra en la Figura 45, a partir de la concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  ya no se observó el desarrollo de colonias de *E. coli*-GFP sobre las placas. Por lo tanto, se concluyó que la MBC debe de estar en el rango entre 33 y 100  $\mu\text{g/mL}$ .

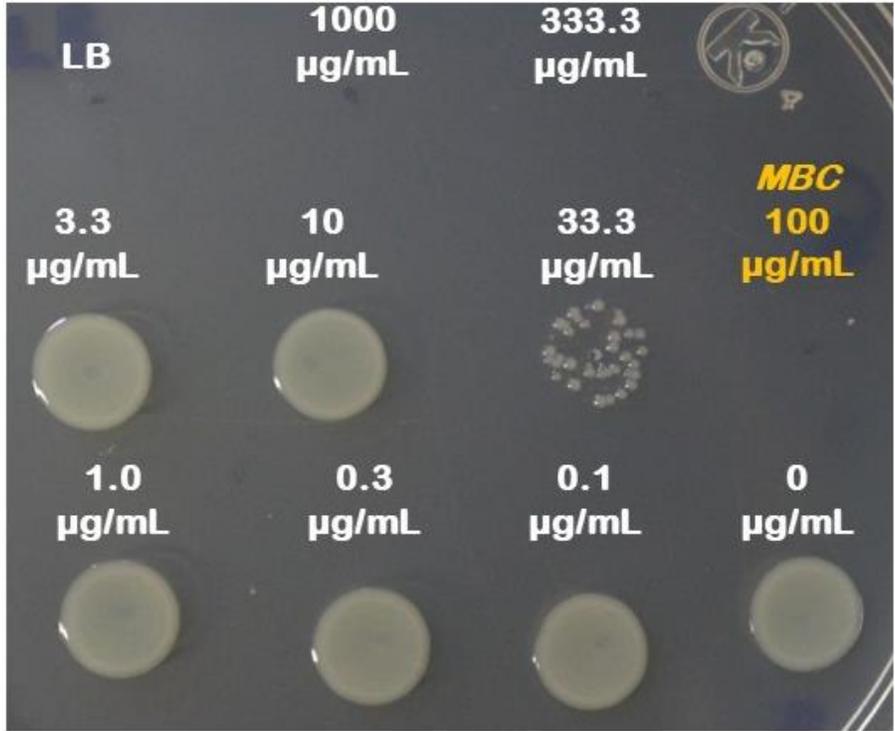
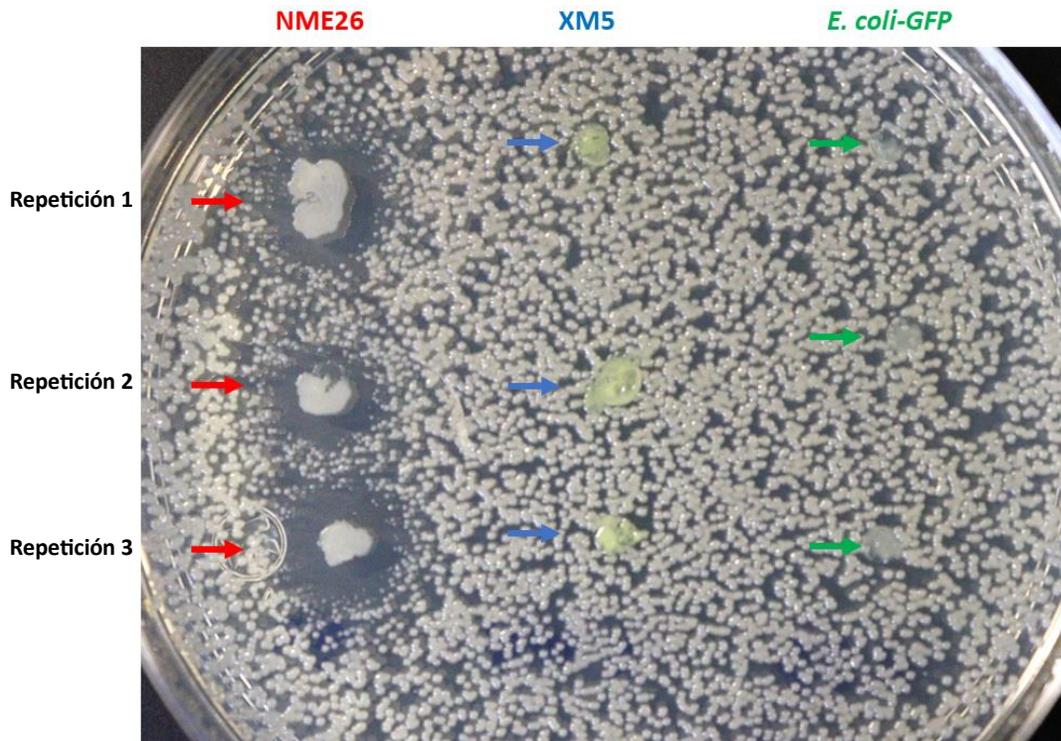
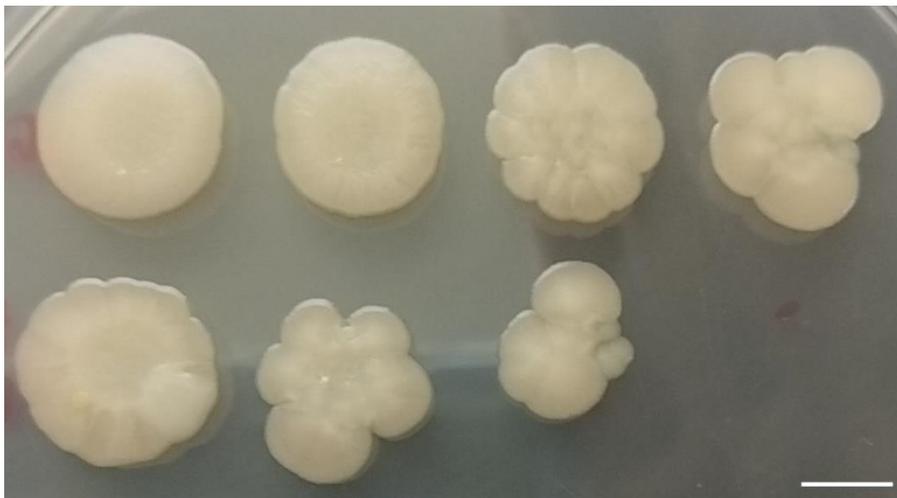


Figura 45. Ensayo sobre placas de agar llevado a cabo para determinar la MBC de la kanamicina contra *E. coli*-GFP

## ANEXO VI. Ensayos de inhibición entre las tres cepas aisladas del Maíz.



**Figura 46.** Ensayo *Spot-on-lawn* realizado para determinar la actividad antagonista de NME26 (izquierda), XM5 (centro) y *E. coli-GFP* (derecha) contra NME255 (en la superficie del agar). Para el ensayo, primero se inoculó toda la superficie del agar con la cepa NME255 y después con un palillo se inocularon las demás cepas de manera puntual sobre la misma superficie de agar. El crecimiento bacteriano sobre la placa fue evaluado después de 48 h de incubación a 27 °C. Solo NME26 desarrolló halos de inhibición que indican actividad antagónica contra NME255.



**Figura 47.** Desarrollo de colonias sobre placas de agar inoculadas con microgeles que contenían encapsulada solamente la cepa NME255. Las fotografías fueron tomadas después de 48 h de incubación a 27 °C. Barra de escala 0.5 cm.

## ANEXO VII. Artículos producidos durante este proyecto de doctorado



Cite this: DOI: 10.1039/d3an01101a

## High-throughput bacterial co-encapsulation in microfluidic gel beads for discovery of antibiotic-producing strains†

 Abraham Ochoa,<sup>a</sup> Gabriela Gastélum,<sup>b</sup> Jorge Rocha<sup>b,c</sup> and Luis F. Olguin<sup>b,\*</sup>

Bacteria with antagonistic activity inhibit the growth of other bacteria through different mechanisms, including the production of antibiotics. As a result, these microorganisms are a prolific source of such compounds. However, searching for antibiotic-producing strains requires high-throughput techniques due to the vast diversity of microorganisms. Here, we screened and isolated bacteria with antagonistic activity against *Escherichia coli* expressing the green fluorescent protein (*E. coli*-GFP). We used microfluidics to co-encapsulate and co-culture single cells from different strains within picoliter gel beads and analyzed them using fluorescence-activated cell sorting (FACS). To test the methodology, we used three bacterial isolates obtained from Mexican maize, which exhibit high, moderate, or no antagonistic activity against *E. coli*-GFP, as determined previously using agar plate assays. Single cells from each strain were separately co-incubated into gel beads with *E. coli*-GFP. We monitored the development of the maize bacteria microcolonies and tracked the growth or inhibition of *E. coli*-GFP using bright-field and fluorescent microscopy. We correlated these images with distinctive light scatter and fluorescence signatures of each incubated bead type using FACS. This analysis enabled us to sort gel beads filled with an antagonistic strain, starting from a mixture of the three different types of maize bacteria and *E. coli*-GFP. Likewise, culturing the FACS-sorted beads on agar plates confirmed the isolation and recovery of the two antagonistic strains. In addition, enrichment assays demonstrated the methodology's effectiveness in isolating rare antibiotic-producer strains (0.01% abundance) present in a mixture of microorganisms. These results show that associating light side scatter and fluorescent flow cytometry signals with microscopy images provides valuable controls to establish successful high-throughput methods for sorting beads in which microbial interaction assays are performed.

 Received 30th June 2023,  
Accepted 9th October 2023  
DOI: 10.1039/d3an01101a  
rsc.li/analyst

### Introduction

The search for microorganisms with antagonistic activity<sup>1</sup> is highly relevant for the identification of molecules with new scaffolds needed to combat the antibiotic resistance of different pathogens affecting public health globally.<sup>2,3</sup> However, identifying microorganisms with antagonistic activity from environmental samples can be a time-consuming and resource-intensive process due to the vast number and diver-

sity of microorganisms present in a sample (e.g.,  $10^6$  microbes per  $\text{cm}^2$  on a leaf surface or  $10^{12}$  microbes per g in human gut).<sup>4,5</sup> Besides that, there is the risk of rediscovering known compounds. To address this issue, droplet-based microfluidics offers an efficient alternative by enabling miniaturization (nL-pL volumes) and automation of various chemical, physical, and biological assays in a high-throughput format.<sup>6,7</sup>

In the field of microbiology, microfluidic droplets have been used for the detection and identification of microorganisms, antibiotic susceptibility testing, studies of microbial physiology, and different biotechnological applications.<sup>8</sup> Commonly, droplet-based assays with microorganisms begin with the encapsulation of one or more cells inside picoliter compartments according to Poisson distribution.<sup>9</sup> To detect the presence and growth of microorganisms, modified strains expressing fluorescent proteins are frequently used.<sup>10,11</sup> Also, live and dead cell markers or the cell metabolism indicator resazurin have been used to perform antibiotic susceptibility testing.<sup>12</sup> Using light scatter measurements of individual

<sup>a</sup>Laboratorio de Biofísicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyacacán, CDMX 04510, México.

E-mail: olguin.jf@química.unam.mx

<sup>b</sup>Unidad Regional Hidalgo, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., San Agustín Tlaxiaco, Hidalgo 42163, México

<sup>c</sup>Programa de Agricultura en Zonas Áridas, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S. 23096, México

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d3an01101a>



Contents lists available at ScienceDirect

Optics and Lasers in Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/optlaseng](http://www.elsevier.com/locate/optlaseng)

## An optical sensor combining surface plasmon resonance, light extinction, and near-critical angle reflection, for thin liquid film biochemical sensing



V. Solis-Tinoco<sup>a,\*</sup>, Gesuri Morales-Luna<sup>b</sup>, A. Acevedo-Barrera<sup>a</sup>, Abraham Ochoa<sup>c</sup>, Omar Vazquez-Estrada<sup>d</sup>, Luis. F. Olguin<sup>c</sup>, A. García-Valenzuela<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

<sup>b</sup> Departamento de Física y Matemáticas, Universidad Iberoamericana, Ciudad de México, Prolongación Paseo de la Reforma 880, Ciudad de México 01219, México

<sup>c</sup> Laboratorio de Biofísicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

<sup>d</sup> Tecnológico Nacional de México/ITS de Tuxtla, Veracruz 92100, México

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Nanotechnology  
Optical sensor  
Optical method  
SPR  
Chemical solutions  
Live bacteria

### ABSTRACT

We present a novel and low-cost optical sensor to obtain at the same time, fast and label-free optical information such as reflectivity, refractive index and extinction coefficient of biochemical samples. The sensor measures in around one minute optical internal reflectivity as a function of the angle of incidence at the interface between a glass prism covered by a gold nanofilm (20 nm) in contact with a liquid sample (10  $\mu$ L). The nanofilm is thin enough that a large fraction of the incident light transmits through it at angles of incidence below the critical angle set by the prism and sample refractive indices (61°), but thick enough to present a Surface Plasmon Resonance dip for angles of incidence beyond that critical angle. The calculated sensitivity of SPR to the surface refractive index is 168.35 deg/RIU. We demonstrate that when a sample contains live bacteria (*E. coli*) the whole reflectivity curve including the SPR region is clearly affected, and to adjust a theoretical model to the experimental curves, it is necessary to assume a complex refractive index of the nanofilm appreciably different than that of gold. The optical curve of the sensor provides more information than a conventional SPR measurements offering a more complete strategy for the analysis of biochemical substances and bacterial cell suspensions.

### 1. Introduction

A sensor is a device that responds to some stimulus and generates a functionally readable output. Exposure to a change in ambient conditions (e.g., mass, refractive index, conductivity, etc.) alters one or more of its properties in a measurable manner, either directly or indirectly [1,2]. Sensor technology is one of the areas in which nanotechnology has had one of the greatest impacts because nanoscale features [3,4] enables the fabrication of small, inexpensive, and highly efficient sensors with broad applications [5]. Ideally, a sensor should be simple, low-cost and easy to use for the user. In this context, we can find a variety of sensors that allow the detection, identification, and dynamic studies in different fields such as biology [6,7] or chemistry [8,9]. In particular, optical sensors [10] have attracted the attention of many researchers thanks to their versatile designs as well as to their facility to be miniaturized, enabling opportunities in many applications not feasible using other sensors. They offer significant advantages over other well-developed technologies such as electrochemical [11], piezoelectric [12] or magnetic sensors [13], including lower noise and immunity to electromagnetic

interference [10]. Refractometric sensing devices [14,15] belong to the optical sensors that include integrated optical Mach-Zehnder interferometers [16], resonant mirrors [17], grating coupler sensors [18], and surface plasmon resonance (SPR) sensors [19–21]. The latter sensors are thin film refractometers that measure changes in the refractive index (RI) occurring at the surface of a metal film supporting a surface plasmon. Their most common configuration uses a prism coupler to couple light to a surface plasmon in combination with conventional optical elements [19,22,23]. Clever SPR configurations have been proposed modifying and/or increasing their optical components [24], innovating the strategies for the intensity [25] and phase modulation [26] as well as the methods for excitation and simultaneous detection (multiplexing) [27]. All with the objective of improving their performance for sensing of chemical and biological variables related to food quality, antibodies, toxins, drugs residues, vitamins, and microorganisms [28–33]. In particular, the detection and quantification of microorganisms is of great importance in industrial fermentation processes [34], environmental monitoring, [35] and to address the global health challenge imposed by pathogenic bacteria [36].

Abbreviations: SPR, Surface Plasmon Resonance; Au, Gold; RI, refractive index; LB, Luria-Bertani medium.

\* Corresponding author.

E-mail address: [rais.solis@icat.unam.mx](mailto:rais.solis@icat.unam.mx) (V. Solis-Tinoco).

<https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2022.107137>

Received 6 February 2022; Received in revised form 24 May 2022; Accepted 5 June 2022

Available online 13 June 2022

0143-8166/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2022.107137>

## ANEXO VIII. Congresos en los que se presentó este trabajo

# Abraham Ochoa

attended the

## **EMBL Conference: Microfluidics: Designing the Next Wave of Biological Inquiry**

13 - 15 July 2020, Virtual

  
EMBL  
European Molecular Biology Laboratory  
Course and Conference Office  
Meyerhofstr. 1  
D-69117 Heidelberg, Germany

Heidelberg, 15 July, 2020

[www.embl.org](http://www.embl.org)



Certificate of Attendance for:

**Abraham Ochoa-Guerrero**

This certificate confirms participation in  
The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry  
and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2022)  
23-27 October 2022

---

Chair: Qun Fang  
Zhejiang University, CHINA

## 8. Referencias

- (1) O'Neill, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations the Review on Antimicrobial Resistance. *Review on antimicrobial resistance. WHO* **2016**, *1* (May), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- (2) Murray, C. J.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; Johnson, S. C.; Browne, A. J.; Chipeta, M. G.; Fell, F.; Hackett, S.; Haines-Woodhouse, G.; Kashef Hamadani, B. H.; Kumaran, E. A. P.; McManigal, B.; Agarwal, R.; Akech, S.; Albertson, S.; Amuasi, J.; Andrews, J.; Aravkin, A.; Ashley, E.; Bailey, F.; Baker, S.; Basnyat, B.; Bekker, A.; Bender, R.; Bethou, A.; Bielicki, J.; Boonkasidecha, S.; Bukosia, J.; Carneiro, C.; Castañeda-Orjuela, C.; Chansamouth, V.; Chaurasia, S.; Chiurchiù, S.; Chowdhury, F.; Cook, A. J.; Cooper, B.; Cressey, T. R.; Criollo-Mora, E.; Cunningham, M.; Darboe, S.; Day, N. P. J.; De Luca, M.; Dokova, K.; Dramowski, A.; Dunachie, S. J.; Eckmanns, T.; Eibach, D.; Emami, A.; Feasey, N.; Fisher-Pearson, N.; Forrest, K.; Garrett, D.; Gastmeier, P.; Giref, A. Z.; Greer, R. C.; Gupta, V.; Haller, S.; Haselbeck, A.; Hay, S. I.; Holm, M.; Hopkins, S.; Iregbu, K. C.; Jacobs, J.; Jarovsky, D.; Javanmardi, F.; Khorana, M.; Kissoon, N.; Kobeissi, E.; Kostyanov, T.; Krapp, F.; Krumkamp, R.; Kumar, A.; Kyu, H. H.; Lim, C.; Limmathurotsakul, D.; Loftus, M. J.; Lunn, M.; Ma, J.; Mturi, N.; Munera-Huertas, T.; Musicha, P.; Mussi-Pinhata, M. M.; Nakamura, T.; Nanavati, R.; Nangia, S.; Newton, P.; Ngoun, C.; Novotney, A.; Nwakanma, D.; Obiero, C. W.; Olivas-Martinez, A.; Olliaro, P.; Ooko, E.; Ortiz-Brizuela, E.; Peleg, A. Y.; Perrone, C.; Plakkal, N.; Ponce-de-Leon, A.; Raad, M.; Ramdin, T.; Riddell, A.; Roberts, T.; Robotham, J. V.; Roca, A.; Rudd, K. E.; Russell, N.; Schnall, J.; Scott, J. A. G.; Shivamallappa, M.; Sifuentes-Osornio, J.; Steenkeste, N.; Stewardson, A. J.; Stoeva, T.; Tasak, N.; Thaiprakong, A.; Thwaites, G.; Turner, C.; Turner, P.; van Doorn, H. R.; Velaphi, S.; Vongpradith, A.; Vu, H.; Walsh, T.; Waner, S.; Wangrangsimakul, T.; Wozniak, T.; Zheng, P.; Sartorius, B.; Lopez, A. D.; Stergachis, A.; Moore, C.; Dolecek, C.; Naghavi, M. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet* **2022**, *399* (10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- (3) WHO. Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance. *Bull World Health Organ* **2014**, *61* (3), 383–394. <https://doi.org/10.1007/s13312-014-0374-3>.
- (4) Tshikantwa, T. S.; Ullah, M. W.; He, F.; Yang, G. Current Trends and Potential Applications of Microbial Interactions for Human Welfare. *Frontiers in Microbiology*. **2018**, June <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01156>.
- (5) Nawaz, M. Z.; Sasidharan, R. S.; Alghamdi, H. A.; Dang, H. Understanding Interaction Patterns within Deep-Sea Microbial Communities and Their Potential Applications. *Marine Drugs*. MDPI **2022**, Feb. <https://doi.org/10.3390/md20020108>.
- (6) Prabhu, G.; Bhat, D.; Bhat, R. M.; Selvaraj, S. A Critical Look at Bioproducts Co-Cultured Under Solid State Fermentation and Their Challenges and Industrial Applications. *Waste and Biomass Valorization*. Springer Science and Business Media B.V. July 1, **2022**, 3095–3111. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01721-0>.

- (7) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Plant Endophytes and Epiphytes: Burgeoning Sources of Known and Unknown Cytotoxic and Antibiotic Agents? *Planta Medica*. Georg Thieme Verlag September 1, **2020**, 891–905. <https://doi.org/10.1055/a-1095-1111>.
- (8) Vorholt, J. A. Microbial Life in the Phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* **2012**, *10* (12), 828–840. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>.
- (9) Dwivedi, M.; Powali, S.; Rastogi, S.; Singh, A.; Gupta, D. K. Microbial Community in Human Gut: A Therapeutic Prospect and Implication in Health and Diseases. *Lett Appl Microbiol* **2021**, *73* (5), 553–568. <https://doi.org/10.1111/lam.13549>.
- (10) Martis, E.; Radhakrishnan, R.; Badve, R. R. High-Throughput Screening: The Hits and Leads of Drug Discovery-An Overview. *J Appl Pharm Sci* **2011**, *01* (01), 2–10.
- (11) Sohrabi, S.; Kassir, N.; Keshavarz Moraveji, M. Droplet Microfluidics: Fundamentals and Its Advanced Applications. *RSC Adv* **2020**, *10* (46), 27560–27574. <https://doi.org/10.1039/d0ra04566g>.
- (12) Ding, Y.; Howes, P. D.; deMello, A. J. Recent Advances in Droplet Microfluidics. *Anal Chem* **2020**, *92* (1), 132–149. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05047>.
- (13) Kaminski, T. S.; Scheler, O.; Garstecki, P. Droplet Microfluidics for Microbiology: Techniques, Applications and Challenges. *Lab Chip* **2016**, *16* (12), 2168–2187. <https://doi.org/10.1039/c6lc00367b>.
- (14) Ochoa, A.; Trejo, F.; Olguin, L. F. Droplet-Based Microfluidics Methods for Detecting Enzyme Inhibitors. In *Targeting Enzymes for Pharmaceutical Development*; Labrou, N. E., Ed.; Springer Science+Business Media: Athens, Greece, **2020**; pp 209–233. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0163-1\\_14](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0163-1_14).
- (15) He, Z.; Wu, H.; Yan, X.; Liu, W. Recent Advances in Droplet Microfluidics for Microbiology. *Chinese Chemical Letters* **2021**, *33* (4), 1729–1742. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2021.08.059>.
- (16) Collins, D. J.; Neild, A.; deMello, A.; Liu, A.-Q.; Ai, Y. The Poisson Distribution and beyond: Methods for Microfluidic Droplet Production and Single Cell Encapsulation. *Lab Chip* **2015**, *15* (17), 3439–3459. <https://doi.org/10.1039/C5LC00614G>.
- (17) Sabhachandani, P.; Sarkar, S.; Zucchi, P. C.; Whitfield, B. A.; Kirby, J. E.; Hirsch, E. B.; Konry, T. Integrated Microfluidic Platform for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing and Bacterial Growth Analysis Using Bead-Based Biosensor via Fluorescence Imaging. *Microchimica Acta* **2017**, *184* (12), 4619–4628. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2492-9>.
- (18) Lu, H.; Caen, O.; Vrignon, J.; Zonta, E.; El Harrak, Z.; Nizard, P.; Baret, J. C.; Taly, V. High Throughput Single Cell Counting in Droplet-Based Microfluidics. *Sci Rep* **2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01454-4>.
- (19) Brouzes, E.; Medkova, M.; Savenelli, N.; Marran, D.; Twardowski, M.; Hutchison, J. B.; Rothberg, J. M.; Link, D. R.; Perrimon, N.; Samuels, M. L. Droplet Microfluidic Technology for Single-Cell High-Throughput Screening. *PNAS* **2009**, *106* (34), 14195–14200. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903542106>.

- (20) Lyu, F.; Pan, M.; Patil, S.; Wang, J.-H.; Matin, A. C.; Andrews, J. R.; Tang, S. K. Y. Phenotyping Antibiotic Resistance with Single-Cell Resolution for the Detection of Heteroresistance. *Sens Actuators B Chem* **2018**, *270* (May), 396–404. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2018.05.047>.
- (21) Liu, X.; Painter, R. E.; Enesa, K.; Holmes, D.; Whyte, G.; Garlisi, C. G.; Monsma, F. J.; Rehak, M.; Craig, F. F.; Smith, C. A. High-Throughput Screening of Antibiotic-Resistant Bacteria in Picodroplets. *Lab Chip* **2016**, *16* (9), 1636–1643. <https://doi.org/10.1039/C6LC00180G>.
- (22) Gielen, F.; Hours, R.; Emond, S.; Fischlechner, M.; Schell, U.; Hollfelder, F. Ultrahigh-Throughput Directed Enzyme Evolution by Absorbance-Activated Droplet Sorting (AADS). *PNAS* **2016**, *113* (47), E7383–E7389. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606927113>.
- (23) Carruthers, D. N.; Byun, C. K.; Cardinale, B. J.; Lin, X. N. Demonstration of Transgressive Overyielding of Algal Mixed Cultures in Microdroplets. *Integrative Biology* **2017**, *9* (8), 687–694. <https://doi.org/10.1039/c6ib00241b>.
- (24) Lagus, T. P.; Edd, J. F. High-Throughput Co-Encapsulation of Self-Ordered Cell Trains: Cell Pair Interactions in Microdroplets. *RSC Adv* **2013**, *3* (43), 20512–20522. <https://doi.org/10.1039/c3ra43624a>.
- (25) Jackman, C. M.; Deans, K. W.; Forney, L. J.; Lin, X. N. Microdroplet Co-Cultivation and Interaction Characterization of Human Vaginal Bacteria. *Integrative Biology* **2019**, *11* (3), 69–78. <https://doi.org/10.1093/intbio/zyz006>.
- (26) Millet, L. J.; Vélez, J. M.; Michener, J. K. Genetic Selection for Small Molecule Production in Competitive Microfluidic Droplets. *ACS Synth Biol* **2019**, *8* (8), 1737–1743. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00226>.
- (27) Kehe, J.; Kulesa, A.; Ortiz, A.; Ackerman, C. M.; Thakku, S. G.; Sellers, D.; Kuehn, S.; Gore, J.; Friedman, J.; Blainey, P. C. Massively Parallel Screening of Synthetic Microbial Communities. *PNAS* **2019**, *116* (26), 12804–12809. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900102116>.
- (28) Tan, J. Y.; Wang, S.; Dick, G. J.; Young, V. B.; Sherman, D. H.; Burns, M. A.; Lin, X. N. Co-Cultivation of Microbial Sub-Communities in Microfluidic Droplets Facilitates High-Resolution Genomic Dissection of Microbial “Dark Matter.” *Integrative Biology* **2020**, *12* (11), 263–274. <https://doi.org/10.1093/intbio/zyaa021>.
- (29) Baret, J.-C.; Miller, O. J.; Taly, V.; Ryckelynck, M.; El-Harrak, A.; Frenz, L.; Rick, C.; Samuels, M. L.; Hutchison, J. B.; Agresti, J. J.; Link, D. R.; Weitz, D. A.; Griffiths, A. D. Fluorescence-Activated Droplet Sorting (FADS): Efficient Microfluidic Cell Sorting Based on Enzymatic Activity. *Lab Chip* **2009**, *9* (13), 1850. <https://doi.org/10.1039/b902504a>.
- (30) Schnettler, J. D.; Klein, O. J.; Kaminski, T. S.; Colin, P. Y.; Hollfelder, F. Ultrahigh-Throughput Directed Evolution of a Metal-Free  $\alpha/\beta$ -Hydrolase with a Cys-His-Asp Triad into an Efficient Phosphotriesterase. *JACS* **2023**, *145* (2), 1083–1096. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c10673>.
- (31) Vallejo, D.; Nikoomezar, A.; Paegel, B. M.; Chaput, J. C. Fluorescence-Activated Droplet Sorting for Single-Cell Directed Evolution. *ACS Synth Biol* **2019**, *8* (6), 1430–1440. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00103>.

- (32) Beneyton, T.; Thomas, S.; Griffiths, A. D.; Nicaud, J. M.; Drevelle, A.; Rossignol, T. Droplet-Based Microfluidic High-Throughput Screening of Heterologous Enzymes Secreted by the Yeast *Yarrowia Lipolytica*. *Microb Cell Fact* **2017**, *16* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0629-5>.
- (33) Beneyton, T.; Wijaya, I. P. M.; Postros, P.; Najah, M.; Leblond, P.; Couvent, A.; Mayot, E.; Griffiths, A. D.; Drevelle, A. High-Throughput Screening of Filamentous Fungi Using Nanoliter-Range Droplet-Based Microfluidics. *Sci Rep* **2016**, *6* (May), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep27223>.
- (34) Xi, H.-D.; Zheng, H.; Guo, W.; Gañán-Calvo, A. M.; Ai, Y.; Tsao, C.-W.; Zhou, J.; Li, W.; Huang, Y.; Nguyen, N.-T.; Tan, S. H. Active Droplet Sorting in Microfluidics: A Review. *Lab Chip* **2017**, *17* (5), 751–771. <https://doi.org/10.1039/C6LC01435F>.
- (35) Mahler, L.; Niehs, S. P.; Martin, K.; Weber, T.; Scherlach, K.; Hertweck, C.; Roth, M.; Rosenbaum, M. A. Highly Parallelized Droplet Cultivation and Prioritization on Antibiotic Producers from Natural Microbial Communities. *Elife* **2021**, *10*. <https://doi.org/10.7554/eLife.64774>.
- (36) Terekhov, S. S.; Smirnov, I. V.; Stepanova, A. V.; Bobik, T. V.; Mokrushina, Y. A.; Ponomarenko, N. A.; Belogurov, A. A.; Rubtsova, M. P.; Kartseva, O. V.; Gomzikova, M. O.; Moskovtsev, A. A.; Bukatin, A. S.; Dubina, M. V.; Kostryukova, E. S.; Babenko, V. V.; Vakhitova, M. T.; Manolov, A. I.; Malakhova, M. V.; Kornienko, M. A.; Tyakht, A. V.; Vanyushkina, A. A.; Ilina, E. N.; Masson, P.; Gabibov, A. G.; Altman, S. Microfluidic Droplet Platform for Ultrahigh-Throughput Single-Cell Screening of Biodiversity. *PNAS* **2017**, *114* (10), 2550–2555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621226114>.
- (37) Brower, K. K.; Carswell-Crumpton, C.; Klemm, S.; Cruz, B.; Kim, G.; Calhoun, S. G. K.; Nichols, L.; Fordyce, P. M. Double Emulsion Flow Cytometry with High-Throughput Single Droplet Isolation and Nucleic Acid Recovery. *Lab Chip* **2020**, *20* (12), 2062–2074. <https://doi.org/10.1039/D0LC00261E>.
- (38) van Zee, M.; de Rutte, J.; Rumyan, R.; Williamson, C.; Burnes, T.; Radakovits, R.; Sonico Eugenio, A.; Badih, S.; Lee, S.; Lee, D.-H.; Archang, M.; Di Carlo, D. High-Throughput Selection of Cells Based on Accumulated Growth and Division Using PicoShell Particles. *PNAS* **2022**, *119* (4), 1–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2109430119/-/DCSupplemental>.
- (39) Ohan, J.; Pelle, B.; Nath, P.; Huang, J.-H.; Hovde, B.; Vuyisich, M.; Dichosa, A. E.; Starkenburg, S. R. High-Throughput Phenotyping of Cell-to-Cell interactions in Gel Microdroplet Pico-Cultures. *Biotechniques* **2019**, *66* (5), 218–224.
- (40) Scanlon, T. C.; Dostal, S. M.; Griswold, K. E. A High-Throughput Screen for Antibiotic Drug Discovery. *Biotechnol Bioeng* **2014**, *111* (2), 232–243. <https://doi.org/10.1002/bit.25019>.
- (41) LabNalCit. <https://labnalcit.org/> (23-01-2024).
- (42) Adan, A.; Alizada, G.; Kiraz, Y.; Baran, Y.; Nalbant, A. Flow Cytometry: Basic Principles and Applications. *Crit Rev Biotechnol* **2016**, *37* (2), 1–14. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>.
- (43) Davies, D. Cell Separations by Flow Cytometry. In *Methods in Molecular Biology* **2012**; 878, 185–199. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-854-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-854-2_12).

- (44) Kamnerdsook, A.; Juntasaro, E.; Khemthongcharoen, N.; Chanasakulniyom, M.; Sripumkhai, W.; Pattamang, P.; Promptmas, C.; Atthi, N.; Jeamsaksiri, W. Formation of Double Emulsion Micro-Droplets in a Microfluidic Device Using a Partially Hydrophilic-Hydrophobic Surface. *RSC Adv* **2021**, *11* (56), 35653–35662. <https://doi.org/10.1039/d1ra06887c>.
- (45) Alkayyali, T.; Cameron, T.; Haltli, B.; Kerr, R. G.; Ahmadi, A. Microfluidic and Cross-Linking Methods for Encapsulation of Living Cells and Bacteria - A Review. *Anal Chem Acta* **2019**, *1053*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.056>.
- (46) Khater, A.; Abdelrehim, O.; Mohammadi, M.; Azarmanesh, M.; Janmaleki, M.; Salahandish, R.; Mohamad, A.; Sanati-Nezhad, A. Picoliter Agar Droplet Breakup in Microfluidics Meets Microbiology Application: Numerical and Experimental Approaches. *Lab Chip* **2020**, *20* (12), 2175–2187. <https://doi.org/10.1039/d0lc00300j>.
- (47) Terekhov, S. S.; Smirnov, I. V.; Malakhova, M. V.; Samoilov, A. E.; Manolov, A. I.; Nazarov, A. S.; Danilov, D. V.; Dubiley, S. A.; Osterman, I. A.; Rubtsova, M. P.; Kostryukova, E. S.; Ziganshin, R. H.; Kornienko, M. A.; Vanyushkina, A. A.; Bukato, O. N.; Ilina, E. N.; Vlasov, V. V.; Severinov, K. V.; Gabibov, A. G.; Altman, S. Ultrahigh-Throughput Functional Profiling of Microbiota Communities. *PNAS* **2018**, *115* (38), 9551–9556. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811250115>.
- (48) Baranova, M. N.; Babikova, P. A.; Kudzhaev, A. M.; Mokrushina, Y. A.; Belozeroval, O. A.; Yunin, M. A.; Kovalchuk, S.; Gabibov, A. G.; Smirnov, I. V.; Terekhov, S. S. Live Biosensors for Ultrahigh-Throughput Screening of Antimicrobial Activity against Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* **2021**, *10* (10), 1161. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101161>.
- (49) Zengler, K.; Toledo, G.; Rappé, M.; Elkins, J.; Mathur, E. J.; Short, J. M.; Keller, M. *Cultivating the Uncultured*; PNAS **2002**, *99* (24) 1568-15686.
- (50) Terekhov, S. S.; Nazarov, A. S.; Mokrushina, Y. A.; Baranova, M. N.; Potapova, N. A.; Malakhova, M. V.; Ilina, E. N.; Smirnov, I. V.; Gabibov, A. G. Deep Functional Profiling Facilitates the Evaluation of the Antibacterial Potential of the Antibiotic Amicoumacin. *Antibiotics* **2020**, *9* (4), 157-170. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040157>.
- (51) Verdugo-Fuentes, A.; De La Torre, M.; Rocha, J. The Quorum Sensing System NprR-NprRB Contributes to Spreading. *bioRxiv* **2021**. <https://doi.org/10.1101/2021.01.24.428019>.
- (52) Gastéllum, G.; Aguirre-von-Wobeser, E.; de la Torre, M.; Rocha, J. Interaction Networks Reveal Highly Antagonistic Endophytic Bacteria in Native Maize Seeds from Traditional <sc>Milpa </sc> Agroecosystems. *Environ Microbiol* **2022**, *24* (11), 5583–5595. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16189>.
- (53) Lashkaripour, A.; Rodriguez, C.; Mehdipour, N.; Mardian, R.; McIntyre, D.; Ortiz, L.; Campbell, J.; Densmore, D. Machine Learning Enables Design Automation of Microfluidic Flow-Focusing Droplet Generation. *Nat Commun* **2021**, *12* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20284-z>.
- (54) Park, J.; Kerner, A.; Burns, M. A.; Lin, X. N. Microdroplet-Enabled Highly Parallel Co-Cultivation of Microbial Communities. *PLoS One* **2011**, *6* (2), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017019>.

- (55) Lee, W.; Walker, L. M.; Anna, S. L. Role of Geometry and Fluid Properties in Droplet and Thread Formation Processes in Planar Flow Focusing. *Physics of Fluids* **2009**, *21* (3), 1–12. <https://doi.org/10.1063/1.3081407>.
- (56) Fu, T.; Wu, Y.; Ma, Y.; Li, H. Z. Droplet Formation and Breakup Dynamics in Microfluidic Flow-Focusing Devices: From Dripping to Jetting. *Chem Eng Sci* **2012**, *84*, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.08.039>.
- (57) Nie, Z.; Seo, M. S.; Xu, S.; Lewis, P. C.; Mok, M.; Kumacheva, E.; Whitesides, G. M.; Garstecki, P.; Stone, H. A. Emulsification in a Microfluidic Flow-Focusing Device: Effect of the Viscosities of the Liquids. *Microfluid Nanofluidics* **2008**, *5* (5), 585–594. <https://doi.org/10.1007/s10404-008-0271-y>.
- (58) Duarte, J. M.; Barbier, I.; Schaerli, Y. Bacterial Microcolonies in Gel Beads for High-Throughput Screening of Libraries in Synthetic Biology. *ACS Synth Biol* **2017**, *6* (11), 1988–1995. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00111>.
- (59) Ayon, N. J. High-Throughput Screening of Natural Product and Synthetic Molecule Libraries for Antibacterial Drug Discovery. *Metabolites*. MDPI May 1, 2023. <https://doi.org/10.3390/metabo13050625>.
- (60) Knight, S.; Plant, H.; McWilliams, L.; Murray, D.; Dixon-Steele, R.; Varghese, A.; Harper, P.; Ramne, A.; McArdle, P.; Engberg, S.; Bennett, N.; Blackett, C.; Wigglesworth, M. Enabling 1536-Well High-Throughput Cell-Based Screening through the Application of Novel Centrifugal Plate Washing. *SLAS Discovery* **2017**, *22* (6), 732–742. <https://doi.org/10.1177/2472555216683650>.
- (61) Lim, S. W.; Abate, A. R. Ultrahigh-Throughput Sorting of Microfluidic Drops with Flow Cytometry. *Lab Chip* **2013**, *13* (23), 4563–4572. <https://doi.org/10.1039/c3lc50736j>.
- (62) Parera-Valadez, Y.; Yam-Puc, A.; López-Aguilar, L. K.; Borges-Argáez, R.; Figueroa-Saldivar, M. A.; Cáceres-Farfán, M.; Márquez-Velázquez, N. A.; Prieto-Davó, A. Ecological Strategies Behind the Selection of Cultivable Actinomycete Strains from the Yucatan Peninsula for the Discovery of Secondary Metabolites with Antibiotic Activity. *Microb Ecol* **2019**, *77* (4), 839–851. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01329-3>.
- (63) Baret, J. C.; Beck, Y.; Billas-Massobrio, I.; Moras, D.; Griffiths, A. D. Quantitative Cell-Based Reporter Gene Assays Using Droplet-Based Microfluidics. *Chem Biol* **2010**, *17* (5), 528–536. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.04.010>.
- (64) Li, M.; van Zee, M.; Riche, C. T.; Tofig, B.; Gallaher, S. D.; Merchant, S. S.; Damoiseaux, R.; Goda, K.; Di Carlo, D. A Gelatin Microdroplet Platform for High-Throughput Sorting of Hyperproducing Single-Cell-Derived Microalgal Clones. *Small* **2018**, *14* (44). <https://doi.org/10.1002/sml.201803315>.
- (65) Ahmed, H.; Stokke, B. T. Fabrication of Monodisperse Alginate Microgel Beads by Microfluidic Picoinjection: A Chelate Free Approach. *Lab Chip* **2021**, *21* (11), 2232–2243. <https://doi.org/10.1039/D1LC00111F>.

- (66) Lewis, W. H.; Tahon, G.; Geesink, P.; Sousa, D. Z.; Ettema, T. J. G. Innovations to Culturing the Uncultured Microbial Majority. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research April 1, **2021**, 225–240. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00458-8>.
- (67) Liu, S.; Moon, C. D.; Zheng, N.; Huws, S.; Zhao, S.; Wang, J. Opportunities and Challenges of Using Metagenomic Data to Bring Uncultured Microbes into Cultivation. *Microbiome*. BioMed Central Ltd, **2022**. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01272-5>.