



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Selección de bacterias productoras de antibióticos presentes en chile poblano (*Capsicum annuum L.*) en descomposición empleando la clasificación de microgeles de microfluídica por citometría de flujo

Tesis

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA

PRESENTA

PAULINA GUADALUPE DE LA LUZ ANGELES

México, CDMX

AÑO 2025



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL (Titulación o Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado Selección de bacterias productoras de antibióticos presentes en Chile poblano (*Capsicum annuum L.*) en descomposición empleando la clasificación de microgeles de microfluídica por citometría de flujo, que presenté para obtener el título/grado de Licenciado en Química, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por la Facultad de Química, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación

Atentamente

Paulina Guadalupe De la Luz Angeles, Numero de cuenta: 316105958

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: LUIS FERNANDO OLGUIN CONTRERAS

VOCAL: Profesor: MARIA ELENA RODRIGUEZ ALEGRIA

SECRETARIO: Profesor: ANDRES ADOLFO VELASCO MEDINA

1er SUPLENTE: Profesor: ALEJANDRO MARIN MEDINA

2° SUPLENTE Profesor: RAMSES ISMAEL GARCIA CABRERA

**SITIO DONDE SEDESARROLLÓ ELTEMA: LABORATORIO 326, EDIFICIO F,
FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM, CDMX.**

ASESOR DEL TEMA: LUIS FERNANDO OLGUIN CONTRERAS

SUPERVISOR TECNICO: ABRAHAM OCHOA GUERRERO



SUSTENTANTE (S): PAULINA GUADALUPE DE LA LUZ ANGELES

Agradecimientos

Esta investigación fue realizada gracias al programa UNAM-PAPIIT IN211623. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida de nivel Licenciatura/Titulación

A la Facultad de Química de la UNAM por financiamiento recibido mediante el Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP 5000-9023).

Agradecemos al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo LABNALCIT-UNAM (CONACYT) por la ayuda técnica en la adquisición y selección de muestras de citometría.

1.- INTRODUCCIÓN/ANTECEDENTES

1.1.- Resistencia Antimicrobiana

1.2.- Antimicrobianos en productos naturales

1.3.- Microfluídica

1.3.1.- Microfluídica basada en microgotas en microbiología

1.4 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

1.4.1.- Uso de FACS junto con microgotas o microgeles de microfluídica

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo general

2.2.- Objetivos particulares

2.3.- Hipótesis

3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL/METODOLOGÍA

3.1.- Descripción general

3.2.- Fabricación de microchips de microfluídica

3.1.1.- Fabricación de molde maestro

3.1.2.- Fabricación de réplicas de chips

3.3.- Caracterización de dispositivo de formación de microgeles

3.4.- Soluciones empleadas y medios de cultivo

3.4.1.-Preparación de PBS

3.4.2.- Tinción de bacterias con el marcador fluorescente BackLight Green

3.4.3.- Medio Luria Beltrani (LB)

3.4.4.- Caldo de soya y tripticaseína

3.5.- Preparación de muestras de microorganismos

3.5.1.- *E.coli*-GFP

3.5.2.- Chile poblano en descomposición 8

3.6.- Tratamiento de muestras de microorganismos previo a encapsular.

3.7.- Montaje del sistema para la producción de microgeles

3.8.- Recolección y registro de la formación de microgeles

3.9. - Observación de microgeles por microscopía de fluorescencia

3.10.- Tratamiento de los microgeles previo a FACS

3.11.- FACS

3.12.- Tratamiento de microgeles clasificados y separados con FACS

3.13.- Ensayos de inhibición

3.14- Ensayos de actividad antimicrobiana con microorganismos aislados de Chile

3.14.1.- Preparación de stocks

3.14.2.- Ensayos de inhibición del crecimiento de *E. coli*-GFP con extractos acuosos de las bacterias seleccionadas con FACS

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Caracterización del tamaño de los canales de los dispositivos de microfluídica

4.2.- Caracterización de la frecuencia de formación y del tamaño de los microgeles.

4.3.- Curvas de calibración del número de células por microgel vs. DO₆₃₀ de los cultivos

4.3.1.- Distribución de Poisson

4.3.2.- Curva de calibración de DO₆₃₀ de cultivos de *E.coli*-GFP vs. λ

4.3.3.- Crecimiento de *E.coli*-GFP en los microgeles

4.3.4- Curva de calibración de microorganismos aislados de Chile poblano en descomposición

4.4.- Primera co-encapsulación de *E.coli*-GFP con microorganismos aislados de Chile

4.4.1.- Visualización en microscopio

4.4.2.- Análisis y selección de microgeles control

4.4.3.-Análisis y selección de microorganismos co-encapsulados en microgeles utilizando FACS

4.4.4.- Sembrado de los microgeles seleccionados en cada zona

4.4.5.- Ensayos de inhibición

4.5.- Segunda co-encapsulación de *E.coli*-GFP con microorganismos aislados de Chile

4.5.1.- Sembrado de cada zona

4.5.2.- Ensayos de inhibición

4.6.- Ensayo de enriquecimiento de cepas inhibidoras

4.6.1.- *Primer ciclo*

4.6.2.- *Segundo ciclo*

4.6.3.- *Sembrado sobre placas de agar de los microgeles recuperados de GFP (-) en el primer y segundo ciclo*

4.6.4.-*Ensayos de inhibición*

4.8.- Corroboración de la actividad antagónica contra *E. coli*-GFP por parte de los microorganismos del Chile seleccionados en este trabajo

4.9.- Secuenciación

4.10.- Últimos ensayos de inhibición contra *E. coli*

4.11 *Algunas características de las cepas secuenciadas*

5.- RESUMEN DE RESULTADOS

6.- CONCLUSIÓN

7.- ANEXOS

8.- REFERENCIAS

Abreviaturas

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
PBS	Phosphate buffer solution
PDMS	Polidimetilsiloxano
GFP	Green Fluorescence Protein
FSC	Forward Scatter
SSC	Side Scatter
RAM	Resistencia Antimicrobiana
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
DO	Densidad Optica

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Resistencia Antimicrobiana

En la naturaleza existen diversos tipos de microorganismos tales como bacterias, virus, hongos o parásitos los cuales causan enfermedades. Para tratar dichas enfermedades se utilizan antimicrobianos, sin embargo, actualmente existe una problemática denominada resistencia antimicrobiana (RAM) la cual es un resultado de la evolución de dichos microorganismos que evita que respondan a tratamientos antimicrobianos en humanos y animales.^[1] La RAM se clasifica como intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca se debe a la falta de permeabilidad de la membrana externa de la célula lo que impide que un antibiótico entre o se acumule dentro de la célula. Las bacterias en el medio ambiente son capaces de tener o desarrollar dicha resistencia intrínseca, porque en la naturaleza se encuentran expuestas a diferentes sustancias químicas, en su mayoría excretadas por otros microbios. Así que por medio de procesos evolutivos de mutación y selección adquieren defensas para contrarrestar estas amenazas, aún en ausencia de los antibióticos utilizados en los humanos o animales. Por otro lado, la resistencia adquirida, también conocida como transferencia horizontal de genes, comienza con mutaciones genéticas en una población generando la supervivencia de algunas bacterias. Después, estas bacterias son capaces de transferir segmentos de ADN (por lo general plásmidos) a otras células, diseminando así la resistencia en comunidades más grandes de bacterias.

Se pueden clasificar los mecanismos por los cuales las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos en tres grupos funcionales. El primer grupo con mutaciones modificadoras del objetivo del antibiótico, el segundo mecanismo que modifican o hidrolizan al antibiótico. El tercer grupo impide la entrada o facilita la salida de los antibióticos en la bacteria ^[2,3].

El grupo de patógenos denominado ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp* y *Escherichia coli*) es el principal responsable del problema de la RAM. Ya que de las 11.3 millones de muertes asociadas a la resistencia a los antimicrobianos en todo el mundo que se notifican anualmente, aproximadamente el 80 % están relacionadas con patógenos ESKAPEE. ^[4]

Diversos factores causan y aceleran la tasa de RAM. Uno de ellos es particularmente importante en el sector salud y es el uso indebido y excesivo de antibióticos, debido al desconocimiento de los pacientes sobre la ineficacia de los antimicrobianos para combatir

enfermedades virales. Además, en muchos países se presentan deficiencias en las herramientas de diagnóstico, causando la administración de antibióticos en casos donde no es necesario. En algunos países en desarrollo, muchos antibióticos son de mala calidad y se venden en exceso o incluso sin receta. Del mismo modo, la resistencia a los antibióticos aumenta cuando los médicos prescriben ciclos prolongados de antibióticos cuando no lo requiere el paciente o algunos casos donde los pacientes interrumpen su tratamiento.^[5] Otro factor de este aumento de la RAM radica en su uso excesivo para la producción ganadera en todo el mundo para tratar animales enfermos o para favorecer la profilaxis ^[5].

Adicionalmente, los países con ingresos bajos y medianos son más afectados por la RAM ya que sufren de pobreza, problemas de saneamiento y sistemas de salud ineficientes ^[1]. A su vez, el desplazamiento de personas, animales y mercancías también contribuye al aumento de la RAM dado que al estar expuestos a patógenos resistentes existe la posibilidad de infección y cuando estos regresan a su país o siguen viajando continúa la propagación de las infecciones.^[5] Además de generar conciencia globalmente, se necesita producir antimicrobianos para aumentar la esperanza de vida. Sin embargo, a pesar de la elaboración de más de 150 nuevos antibióticos desde 1910, el abuso ha llevado a generar resistencia e incluso formas multirresistentes de las “superbacterias”. Por lo cual, tener control y gestión de los antibióticos es importante para prevenir la incidencia de la RAM.^[1] Sin embargo, para combatir a las bacterias resistentes que ya existen es necesario desarrollar nuevos antibióticos con estructuras moleculares no descritas hacia los cuales las bacterias no hayan desarrollado aún mecanismos de resistencia.

1.2.- Antimicrobianos en productos naturales

Una gran parte de los antibióticos han sido obtenidos a partir de algún producto natural. El ejemplo más común de esto es la penicilina, producida por un hongo con la capacidad de excretar esta molécula para garantizar su supervivencia sobre los microorganismos a su alrededor^[6]. Según las estadísticas, aproximadamente la mitad de los 1881 nuevos medicamentos aprobados por la FDA, o agencias equivalentes, provienen de productos naturales o se sintetizan a partir de algún producto natural ^[7]. Esto debido a que los productos naturales se encuentran optimizados por la evolución, regulando mecanismos de defensa endógenos e interacciones con otros organismos^[8]. Los antibióticos provenientes de productos naturales se han aplicado para el tratamiento de infecciones virales, bacterianas y fúngicas, cáncer, alergias e incluso enfermedades cardiovasculares ^[9].

Sin embargo, en los últimos años se ha detectado una importante velocidad de incidencia de la RAM con respecto al descubrimiento de nuevos antibióticos. Por lo tanto, para aumentar la velocidad de identificación de nuevos antibióticos es necesario el desarrollo de nuevas técnicas de escrutinio, que permitan identificar nuevos antibióticos dentro de la gran diversidad de productos naturales presentes en la naturaleza. En particular en esta tesis se muestra interés por la identificación de microorganismos productores de moléculas con actividad antibiótica. La gran diversidad de microorganismos presentes en la naturaleza permanece aún inexplorada, por lo tanto, resultan una fuente muy prometedora de productos naturales ^[10].

Cada año se generan aproximadamente 1300 millones de toneladas de desperdicio de alimentos debido a la pérdida y acumulación de estos en el mundo. En ocasiones, estos alimentos orgánicos en descomposición sirven de composta, ya que dicho compostaje posee comunidades microbianas las cuales consisten en varias especies microbianas que van desde cepas cultivables a no cultivables que pueden interactuar entre sí y con el entorno en el que coexisten^[11]. Los microorganismos que se encuentran en dichos alimentos en descomposición producen enzimas que degradan la materia orgánica en material estable, dado que los desperdicios consisten mayormente en carbohidratos, proteínas y grasas. Las enzimas producidas por las bacterias rompen enlaces entre macromoléculas y resultan beneficiosas para la conversión de residuos a través de procesos bioquímicos, de modo que, mitigan los efectos de patógenos nocivos ^[11].

En cuestión de ejemplos sobre productos naturales antimicrobianos aislados de microorganismos en alimentos en descomposición se encuentra un estudio guiado a la obtención de biosurfactantes. Diversos grupos de microorganismos (levaduras, bacterias y hongos) producen biosurfactantes los cuales poseen diferentes funciones naturales entre estos la actividad antimicrobiana. En dicho artículo se realizó un estudio exhaustivo de detección y caracterización de cepas bacterianas productoras de biosurfactantes de alto potencial de diferentes productos relacionados con los alimentos, frutas en mal estado y aguas residuales del procesamiento de alimentos, obteniendo la cepa de *P. aeruginosa* MA01. ^[12]

En residuos de fermentación cervecera se buscaron compuestos bioactivos en levaduras de cerveza desechadas después de la fermentación capaces de biocontrolar a *Aspergillus* sp, un hongo que acumula sus micotoxinas en alimentos y bebidas generando un impacto negativo en la salud humana y la seguridad alimentaria. De estos residuos se obtuvieron *Saccharomyces cerevisiae* MBELGA62 y *Pichia kudriavzevii* MBELGA61, las cuales demostraron tener propiedades bacteriostáticas y ser eficientes en la reducción del

crecimiento de hongos, disminuyendo la tasa de crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* hasta un 37,8% y un 42,5%, respectivamente. [13]

Además, se ha descrito en la literatura el aislamiento de un total de 75 cultivos bacterianos de diferentes muestras de alimentos. De manera que se purificaron y examinaron para registrar su actividad antimicrobiana contra algunos cultivos bacterianos estándar que deterioran los alimentos y hongos que se aislaron de frutas y verduras en mal estado. En este ensayo se encontró que de 75 aislados, tres aislados, IP-1 (aislado de melocotón podrido), IVP-2 (aislado de vermicompost) e IRF-1 (aislado de un pez teleósteo Rohu podrido, *Labeo rohita*) tienen una actividad contra cultivos bacterianos estándar y hongos. [14]

1.3.- Microfluídica

La microfluídica es una tecnología distinguida por su capacidad de manipulación de volúmenes de muestra en escalas que van desde los microlitros a los picolitros. Además, permite realizar preparaciones de muestras, reacciones, separaciones y análisis químicos, todo en dispositivos que tienen microcanales de entre 10 y 1000 μm de diámetro. Un área específica de la microfluídica está basada en el uso de microgotas. En este campo de estudio se utilizan dos líquidos inmiscibles (aceite y agua) que fluyen a través de microcanales que se intersectan, de manera que el flujo de la fase oleosa rompe la superficie de la fase acuosa generando la formación de microgotas. [16], [15]

Entre los métodos convencionales para generar microgotas se encuentra un dispositivo de enfoque de flujo en donde la fase acuosa fluye por un canal central y la fase oleosa fluye en dos canales exteriores (Figura 1).

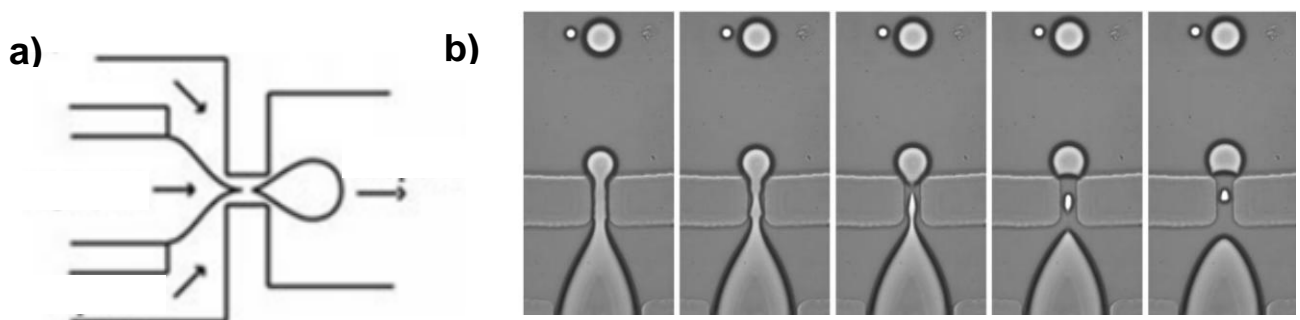


Figura 1. a) Diseño esquemático del “enfoque de flujo” imagen modificada de [17]. b) Imágenes experimentales de secuencias de ruptura de gotas en el uso del enfoque de flujo imagen modificada de [17]

Entre los materiales utilizados para elaborar los dispositivos de microfluídica se encuentra el polidimetilsiloxano (PDMS), un material hidrófobo, ópticamente transparente, y biocompatible, que favorece la generación de gotas de agua en aceite dentro de los dispositivos.^[18]

Las distintas ventajas que poseen las microgotas son: alta velocidad de producción (centenas a miles de hertz), baja dispersidad en el tamaño, manipulación sencilla, bajo consumo de muestras y reactivos, así como una disminución considerable del tiempo necesario para realizar ensayos con un gran número de muestras.^[16]

1.3.1.- Microfluídica basada en microgotas en microbiología

Con relación a los cultivos de microbios, en los últimos años se han desarrollado estrategias para aumentar el rendimiento y recuperar cepas diversas. Sin embargo, el uso de métodos tradicionales con medios de crecimiento sólidos o líquidos para el cultivo de células en masa genera la problemática del crecimiento excesivo de células de rápido crecimiento dejando atrás el cultivo de microbios de crecimiento lento. Una de las soluciones que se ha encontrado es el aislamiento de células individuales en compartimientos antes del cultivo para eliminar la competencia de recursos y efectos inhibidores entre los microorganismos. Así se genera mayor riqueza taxonómica y esto se ha logrado a través de la generación de miles a millones de microgotas de agua en aceite (Figura 2) ^[19].

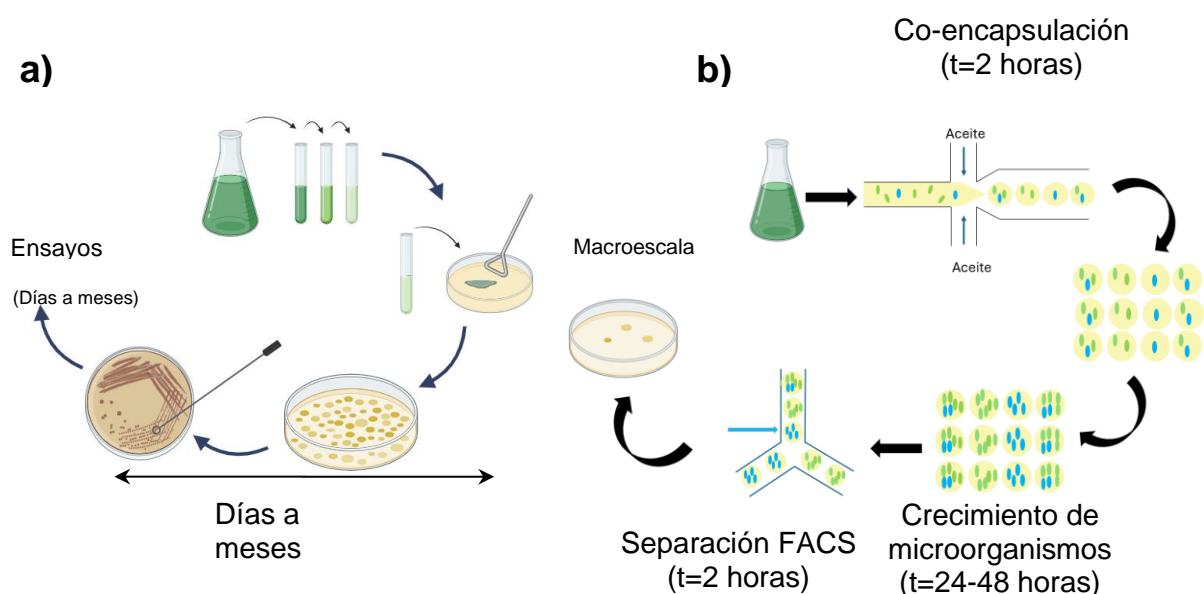


Figura 2. Esquema de comparación de técnicas manuales vs el uso de la microfluídica basada en microgotas.

Se ha logrado la generación de cultivos microbianos desde una sola célula hasta una densidad celular muy alta en una microgota.^[20] Asimismo, si se adiciona agarosa en la fase acuosa es posible transformar a las microgotas en microgeles. El uso de agarosa tiene la ventaja de biocompatibilidad, además de que la temperatura de gelificación es cercana a las condiciones necesarias para el crecimiento de bacterias, del mismo modo, su costo es relativamente bajo^[21]. Se ha demostrado que la incubación de microgeles que contienen bacterias permite la formación de microcolonias. De igual manera, se ha demostrado que los aceites fluorados y las paredes del PDMS de los microcanales facilitan el intercambio de gases en las células en cultivo tanto procariontas como eucariotas^[22]. Los microgeles se producen con el medio adecuado para proporcionar nutrientes a los microorganismos encapsulados.

Mediante microfluídica basada en microgotas se ha logrado controlar entornos químicos de células individuales mediante su encapsulación y su posterior incubación dentro de microgotas de agua en aceite con volúmenes en el orden de los nanolitros a los picolitros. Durante su incubación dentro de las microgotas es posible analizar el crecimiento bacteriano mediante microscopía de campo claro y/o de fluorescencia. Mediante la incubación de microorganismos por técnicas de microfluídica basada en microgotas se han estudiado las interacciones que suceden entre células. En un ejemplo, se logró aislar una cepa de *Bacillus* con actividad antimicrobiana contra *S. aureus* dando paso a descubrimientos de nuevos antibióticos.^[23]

Retomando el argumento del uso de productos naturales como fuente de fármacos y estableciendo el uso de la microfluídica en microbiología, se han desarrollado plataformas para el crecimiento de microbios no cultivados previamente utilizando diluciones y suspensiones en microgotas, así como una plataforma de detección de alto rendimiento basada en la encapsulación y cultivo de microfluidos unicelulares en microgotas ^[8].

1.4 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

La clasificación de células activadas por fluorescencia, o FACS por sus siglas en inglés (Fluorescence Activated Cell Sorting), es una técnica especializada de la citometría de flujo que permite el análisis, y la separación de células. Esta técnica aprovecha las características físicas (tamaño y forma) y fluorescentes de las células u otras entidades biológicas para el análisis y clasificación de diversas células de interés.

Los citómetros de flujo tipo FACS de última generación poseen la capacidad de analizar células a velocidades muy altas (hasta aproximadamente 40 000 eventos por segundo) con alta sensibilidad, pudiendo detectar tan solo 50 moléculas fluorescentes por célula [24]. La característica más importante de los equipos FACS es que, permiten redirigir las células electrónicamente a placas o tubos de recolección separados de acuerdo a sus propiedades físicas y de fluorescencia. [24]

Para poder analizar las microgotas en FACS, se tiene que: a) convertir las gotas a microgeles y transferirlos a un medio acuoso o b) formar una doble emulsión de agua/aceite/agua, debido a que las microgotas de microfluídica son de un líquido y son estables siempre y cuando haya aceite. En cambio, los microgeles son sólidos y se pueden retirar del aceite y poner en agua (lo que es esencial para manipular por FACS). Las dobles emulsiones o microgeles generadas por microfluídica encapsulan células individuales, de manera que se aíslan química y físicamente. Estas dobles emulsiones o microgeles se pueden clasificar después utilizando un equipo de FACS. Dichas dobles emulsiones o microgotas/microgeles pasan por un láser, el cual se desviará por refracción (dispersión de ángulo hacia adelante) o reflexión (dispersión de ángulo lateral). Como consecuencia, los parámetros de refracción y reflexión del láser sirven como mediciones de tamaño y de complejidad interna de la(s) célula(s) dentro de los microgeles. La refracción del haz de luz incidente permite la medición de la dispersión frontal, Forward Scatter (FSC), en este parámetro cuantas más “células” deba atravesar el haz incidente en la microgota, más luz se dispersa. Por otra parte, la reflexión del haz de luz incidente permite la medición de dispersión lateral, Side Scatter (SSC), la cual se utiliza como medida de complejidad interna de la microgota, ya que, al atravesar, el haz de luz se encuentra con las células dentro de la microgota y la luz se refleja en estas estructuras en todas direcciones, cuanta más luz se detecte en ángulo de 90° con respecto al haz de luz, más compleja es internamente. Además, el láser excitará los fluoróforos o tintes que se encuentren dentro de las células. Dicha información se recopila, convirtiéndola en pulsos electrónicos. El fluido envolvente contiene sales como lo son sulfato de sodio y sales de sodio, esta composición genera que se pueda ejercer sobre cada microgel una carga y de esta manera pueden ser desviados por placas electromagnéticas de manera que se analizan en un software específico para el equipo y el usuario decide cómo clasificar cada región obtenida para separarla en distintos tubos. (Figura 3).[25]

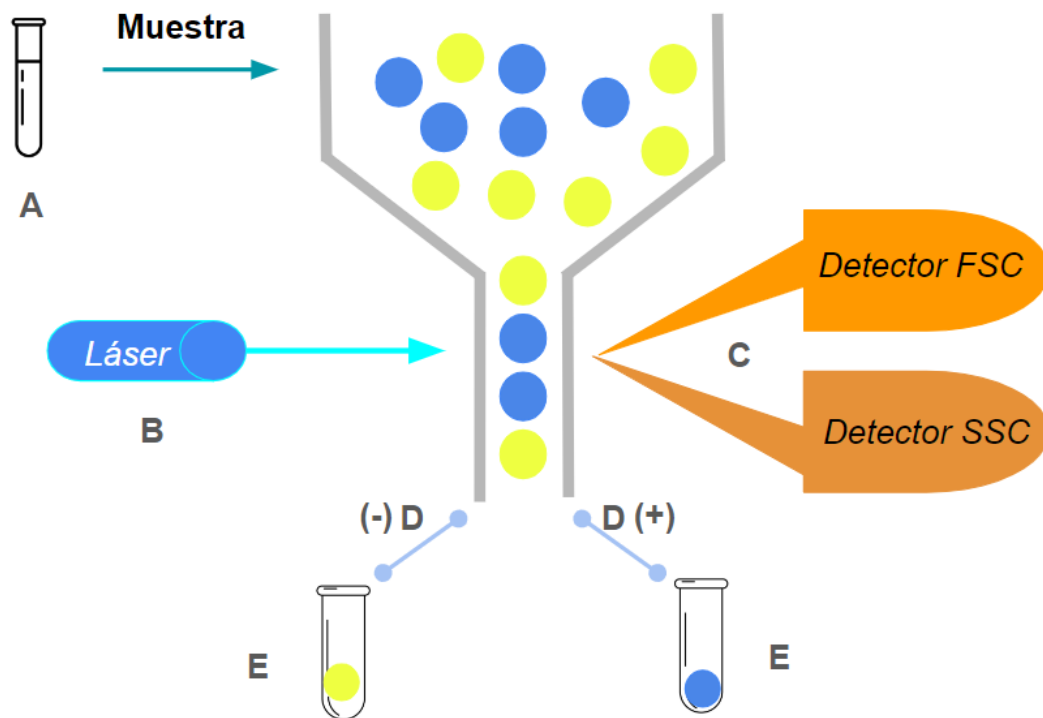


Figura 3. (A) Las células o microgeles que se van a clasificar se cargan en el instrumento y se presuriza el tubo de muestra. Las células o microgeles viajan a través de una línea de muestra hasta una boquilla. Las células o microgeles descienden por la boquilla a través de una aguja en el centro de la boquilla y se unen con la corriente del fluido envolvente en la punta de la boquilla. (B). El flujo continúa, a medida que las células pasan el láser (C), desviarán el haz por refracción (dispersión de ángulo hacia adelante) o reflexión (dispersión de ángulo lateral). El láser también excitará los tintes o fluoróforos utilizados en la preparación de células para su clasificación. (D) Se envía un pulso eléctrico a través del fluido envolvente cargando el microgel que contiene el evento, este microgel ahora puede ser desviado por placas electromagnéticas (E) a diferentes puntos de recogida. Imagen modificada de la referencia 5.

1.4.1.- Uso de FACS junto con microgotas o microgeles de microfluídica

Aprovechando la compartimentación de microgotas de microfluidos y la clasificación de células activadas por fluorescencia se han logrado detectar diferentes enzimas.^[23] De la misma manera, para el análisis de células se tienen referencias de experimentos que utilizan la intensidad de fluorescencia total de las células encapsuladas en las micropartículas para el uso de equipos capaces de medir esta propiedad. ^[21] En consecuencia, las microgotas generadas ofrecen la posibilidad de ser microambientes confinados donde las células, bacterias u organismos individuales pueden ser encapsuladas y permiten su manipulación y análisis. ^[20]

Como ejemplo, se elaboró una plataforma de detección de *Aspergillus niger* (Figura 4) compuesta por dispositivos microfluídicos. Con el uso del sustrato fluorogénico almidón

marcado con múltiples fluoróforos BODIPY®FL, da como resultado un aumento de la fluorescencia verde^[22]. Los microgeles recolectados se analizan y se clasifican dependiendo de la actividad enzimática según la intensidad de fluorescencia.

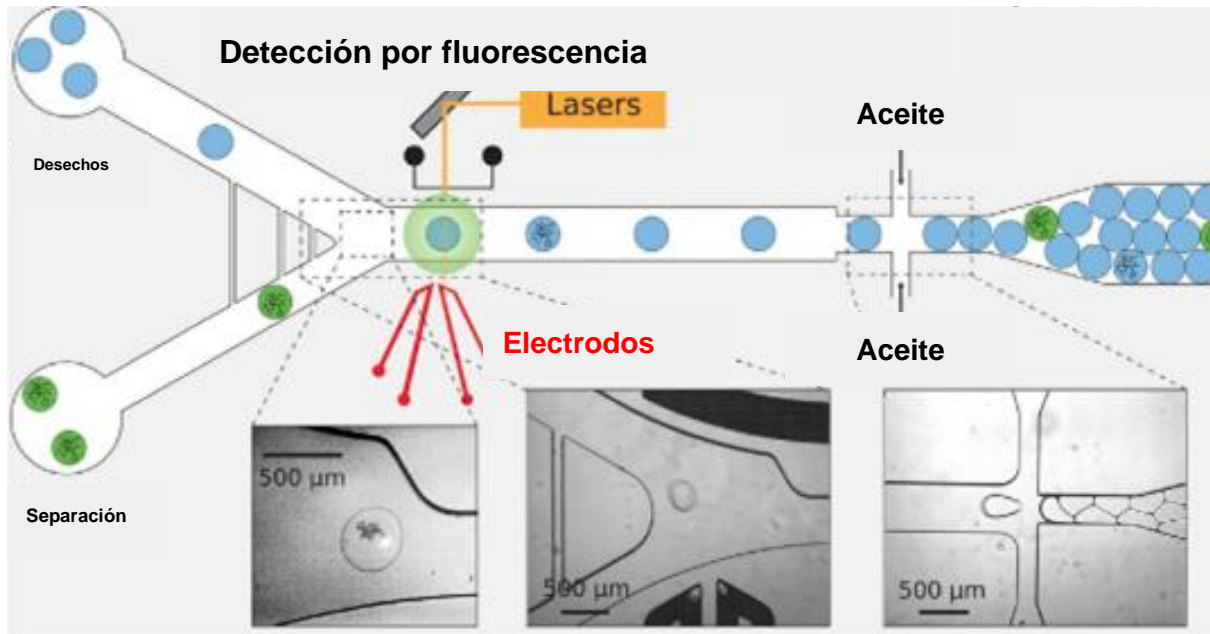


Figura 4. Ejemplo de plataforma de detección de *Aspergillus niger* utilizando dispositivos de microfluídica y detección con fluorescencia.

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo general

Aislar e identificar microorganismos provenientes de un chile poblano (*Capsicum annuum* L.) en descomposición que inhiban el crecimiento de bacterias de *Escherichia coli*, utilizando microgeles formados en un dispositivo de microfluídica y un equipo de FACS para la separación y clasificación de los microgeles generados.

2.2.- Objetivos particulares

- ❖ Generar microgotas de un tamaño homogéneo utilizando dispositivos de microfluídica
- ❖ Establecer una relación entre la densidad óptica (DO_{630}) de un cultivo de microorganismos y el valor experimental del número promedio de células encapsuladas por microgel
- ❖ Analizar, separar y recuperar los microgeles con microorganismos antagonistas frente a *E.coli*-GFP a través de la técnica de FACS
- ❖ Optimizar la metodología de la búsqueda de cepas inhibidoras frente a *E.coli*-GFP
- ❖ Aislar las cepas que presentan inhibición frente a *E.coli*-GFP para la secuenciación de su Gen 16S-RNA

2.3.- Hipótesis

Existen microorganismos en fuentes naturales, como un alimento en descomposición, que poseen la capacidad de inhibir a la cepa de estudio *E.coli*-GFP. Si se co-encapsulan dichos microorganismos, uno por cada microgel, junto con células de *E.coli*-GFP, entonces se podrán encontrar microorganismos antagonistas que eviten el crecimiento de la cepa fluorescente de estudio. Mediante el uso de microfluídica se podrán fabricar cientos de miles de microgeles y utilizando el equipo de FACS se podrán analizar y seleccionar aquellos microgeles en los que se encuentren microorganismos con actividad antagonista.

3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL/ METODOLOGÍA

3.1.- Descripción general

En la metodología de este proyecto se utiliza como cepa diana y reportera una cepa de *Escherichia coli* con la capacidad de expresar la proteína verde fluorescente de manera constitutiva (*E. coli*-GFP). Para la búsqueda de microorganismos productores de antibióticos contra *E. coli*-GFP se utilizaron muestras de microorganismos obtenidas de chiles poblanos en descomposición.

Los ensayos de interacción implican, co-encapsular, mediante la técnica de microfluídica basada en microgotas, células de *E. coli*-GFP dentro de microgeles junto con una célula de un microorganismo proveniente del Chile. Sin embargo, como la encapsulación es un proceso aleatorio que sigue la distribución de Poisson ^[26], se buscó encapsular células de *E. coli*-GFP dentro de los microgeles tal que en promedio hubiera cinco células de *E. coli*-GFP encapsuladas por microgel. De esta manera el 99.3% de los microgeles producidos resultan ocupados por al menos una célula de *E. coli*-GFP y vacíos en un 0.7%. En cambio, la densidad utilizada de microorganismos provenientes del Chile fue mucho menor, tal que sólo el 25.6% de los microgeles generados logran encapsular una o dos células de alguno de los microorganismos en la muestra, mientras que 74.1% serán vacíos. Por otro lado, cuando se mezclan las poblaciones de *E. coli*-GFP con los microorganismos del Chile y se co-encapsulan, teóricamente el 22.1% logran co-encapsular una célula proveniente del Chile con una o más células de *E. coli*-GFP. Además, el 74.1% de los microgeles quedarían solo con células de *E. coli*-GFP.

Durante la co-encapsulación de *E. coli*-GFP junto con los microorganismos provenientes del Chile en descomposición se busca lo siguiente:

1. En todos los microgeles esté encapsulada *E. coli*-GFP
2. Exista un microorganismo aislado de Chile por microgota, con *E. coli*-GFP
3. Existen microorganismos con o sin capacidad antagonista (Figura 5).

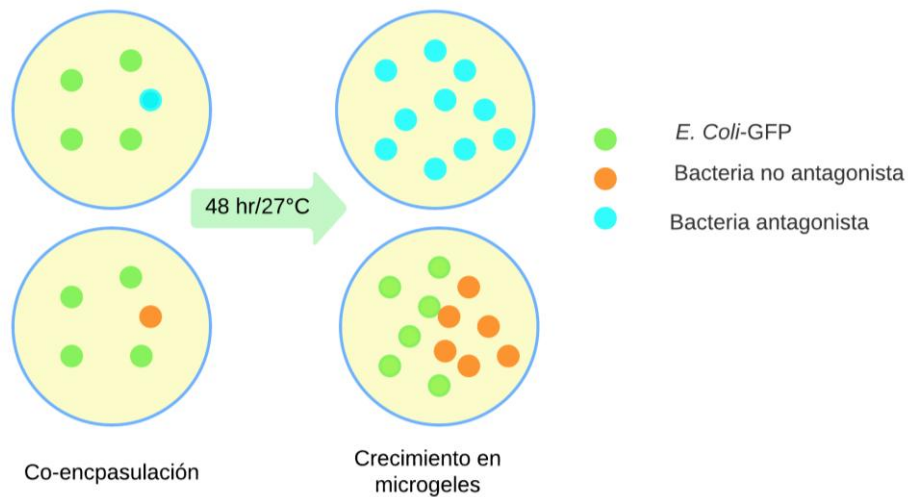


Figura 5. Esquema teórico de co-encapsulación.

Posterior a su formación, los microgeles cargados con microorganismos se incuban a 27°C durante 48 horas para inducir su crecimiento. Después de la incubación, el crecimiento bacteriano dentro de los microgeles se analiza en una pequeña muestra de geles mediante microscopía de campo claro y de fluorescencia. *E.coli*-GFP genera microcolonias verde fluorescentes mientras que los microorganismos aislados de Chile forman microcolonias no fluorescentes dentro de los microgeles. En las co-encapsulaciones se observan algunos microgeles donde un microorganismo aislado de Chile inhibe el crecimiento de las microcolonias de *E.coli*-GFP, lo que puede ser evaluado mediante la intensidad de fluorescencia de las colonias co-encapsuladas. En cambio, en otros microgeles, donde inicialmente se co-encapsula *E. coli*-GFP junto con algún microorganismo no antagonista, se observa la proliferación del microorganismo no fluorescente y de *E.coli*-GFP en el mismo microgel.

Tras el análisis por microscopía, el total de los microgeles se cambia desde la fase oleosa hacia una fase acuosa compuesta por PBS para su posterior análisis y separación utilizando Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Los microgeles se analizan con FACS y se separan en regiones de acuerdo a sus propiedades de dispersión de la luz (dispersión lateral, SSC, y dispersión frontal, FSC), así como por su intensidad de fluorescencia. Las distintas poblaciones de microgeles se recuperan mediante FACS dentro de tubos eppendorf independientes. Después, con las distintas poblaciones de microgeles recuperados se inoculan placas de agar para crecer a macro escala los microorganismos seleccionados y así aislar a los diferentes microorganismos. De acuerdo con la morfología de las colonias que se forman sobre las placas de agar tras 24 o 48 horas de incubación, se hacen pruebas de

actividad antagonista contra *E.coli*-GFP. Finalmente, aquellas cepas con inhibición pasan por un proceso de secuenciación genética para caracterizarlas.

3.2.- Fabricación de microchips de microfluídica

3.1.1.- Fabricación de molde maestro

Se utilizó Adobe Illustrator para dibujar el diseño de microcanales deseado para la producción de microgeles, el diseño se imprimió en un acetato en negativo para obtener la fotomáscara del molde maestro.

Para la fabricación del molde maestro, se centró una oblea de silicio (76 mm de diámetro) en la plataforma giratoria de la máquina de revestimiento por rotación nivelada (Spin coater, WS-650, Laurell Technologies Corp.) utilizando una herramienta de centrado que viene con este equipo. La oblea se fija a la plataforma giratoria aplicando vacío para mantenerla en su sitio. Para las óptimas condiciones del proceso se debe de tener limpias y secas las obleas de silicio, para lo cual se requiere colocarlas en el horno a 45°C para retirar humedad antes de centrar en el spin coater.

Con la oblea centrada en el spin coater se vierte un poco de isopropanol anhidro sobre la superficie de la oblea y se evapora haciendo rotar la oblea durante 1 minuto esto sirve para retirar cualquier partícula de polvo sobre la superficie de la oblea, esto debido a que al colocar el disolvente y después rotar, un paso de aceleración adicional expulsará el exceso de material de la oblea. Después se agregan aproximadamente 3 mL de resina fotosensible (SU-8 3035, Microchem) en el centro de la oblea desde una distancia corta evitando cualquier formación de burbujas. Se utiliza un programa de giro de dos pasos: primero a 500 rpm durante 10 segundos con una aceleración de 100 rpm/s para distribuir la resina sobre la oblea; y después a 5000 rpm durante 30 segundos con una aceleración de 400 rpm/s para generar una capa uniforme (Figura 6- A).

Posteriormente, se transfirió la oblea a una parrilla de calentamiento ajustada a 105°C y se calentó durante 12 min para evaporar los disolventes en la resina (Figura 6- B). Después, se deja enfriar a temperatura ambiente y entonces se coloca la fotomáscara sobre la oblea recubierta con SU8. La oblea y la fotomáscara alineadas se colocan entre dos placas de vidrio de 6 mm de espesor, de modo que ambas queden en contacto directo. Se expone durante 50 segundos bajo una lámpara de luz ultravioleta (100 W, B100AP, Analytik Jena, USA) para polimerizar la resina por donde logra pasar la luz a través de la fotomáscara, de manera la resina se solidifica y se adhiere de forma covalente a la oblea de silicio formando paredes de resina sólida con la geometría y arreglo de canales deseado (Figura 6- C). Después, se retira

la fotomáscara, se calienta la oblea durante 1 minuto en una parrilla de calentamiento a 75° C para después transferir la oblea a una segunda parrilla de calentamiento a 105° C durante 5 minutos para terminar la reacción de polimerización del SU-8 (Figura 6- D). Se realizaron lavados con (propilenglicol acetato de monometiléter, Sigma-Aldrich) durante 8 minutos. Se añadió isopropanol anhidro hasta que no se forme un precipitado blanco y después se dejó secar a temperatura ambiente, finalmente se calentó durante 20 minutos a 200°C en un parrilla de calentamiento para terminar el proceso de polimerización (Figura 6- E).

3.1.2- Fabricación de réplicas

Para obtener las réplicas del molde maestro se preparan 25 g de polidimetilsiloxano (PDMS, Sylgard 184; Dow Corning Corp) para el llenado de una caja petri y se añade un 8.5% en masa del agente entrelazante (Sylgard 184; Dow Corning Corp), mezclando enérgicamente durante 3 min (Figura 6- F). A continuación, la mezcla se coloca en un desecador con vacío hasta eliminar todas las burbujas de aire. Se vierte lentamente la mezcla de PDMS sobre el molde y se coloca en un horno precalentado a 70°C durante una noche (Figura 6- G). Al día siguiente, se recortan los moldes con el uso de un bisturí y con una espátula se retiran de la caja petri y se perforan todas las entradas y salida de los canales con un punzón de biopsia de 0.75 mm de diámetro (Electron Microscopy Sciences). (Figura 6- H)

Por otro lado, se limpia la superficie de un portaobjetos (26 x 76 mm; MADESA) para evitar que tenga polvo y después con un equipo Corona Treater (BD.20AC, Electro Thecnic Products) se realiza una descarga de plasma sobre la superficie del portaobjetos durante 75 s e inmediatamente una descarga de plasma sobre el recorte de la réplica de PDMS durante 15 s de manera que el plasma esté en contacto con el relieve de los microcanales. El proceso de utilizar el equipo Corona Treater permite la unión del PDMS con el portaobjetos de vidrio ya que al utilizar oxígeno y el tratamiento con plasma se generan grupos silanol Si-OH que permiten reacciones de condensación para producir enlaces Si-O-Si. Enseguida, se ponen en contacto ambas superficies presionando para retirar las burbujas de aire que queden atrapadas entre el PDMS y el vidrio y posteriormente se coloca dentro de un horno a 65°C durante una noche. Este calentamiento permite que los radicales libres formados por el plasma en el PDMS y en el portaobjetos, reaccionen y se unan covalentemente. (Figura 6- I)

Para el uso posterior en la formación de microgeles, se toman aproximadamente 100 µL de NOVEC (3M™ Novec™ 1720) en una jeringa de 1 mL y se conecta una tubería de PTFE de #30 para posteriormente conectar a la salida del microchip y recubrir las paredes con el NOVEC hasta observar el líquido salir por las entradas de aceite y de la fase acuosa, de

manera que al observar la salida del fluido se colocó en una parrilla de calentamiento a una temperatura de 100°C para lograr evaporar el NOVEC. El uso de de este NOVEC genera que las paredes de los microcanales sean más hidrofóbicas con la fase acuosa y evite la malformación de las microgotas dentro del microchip.

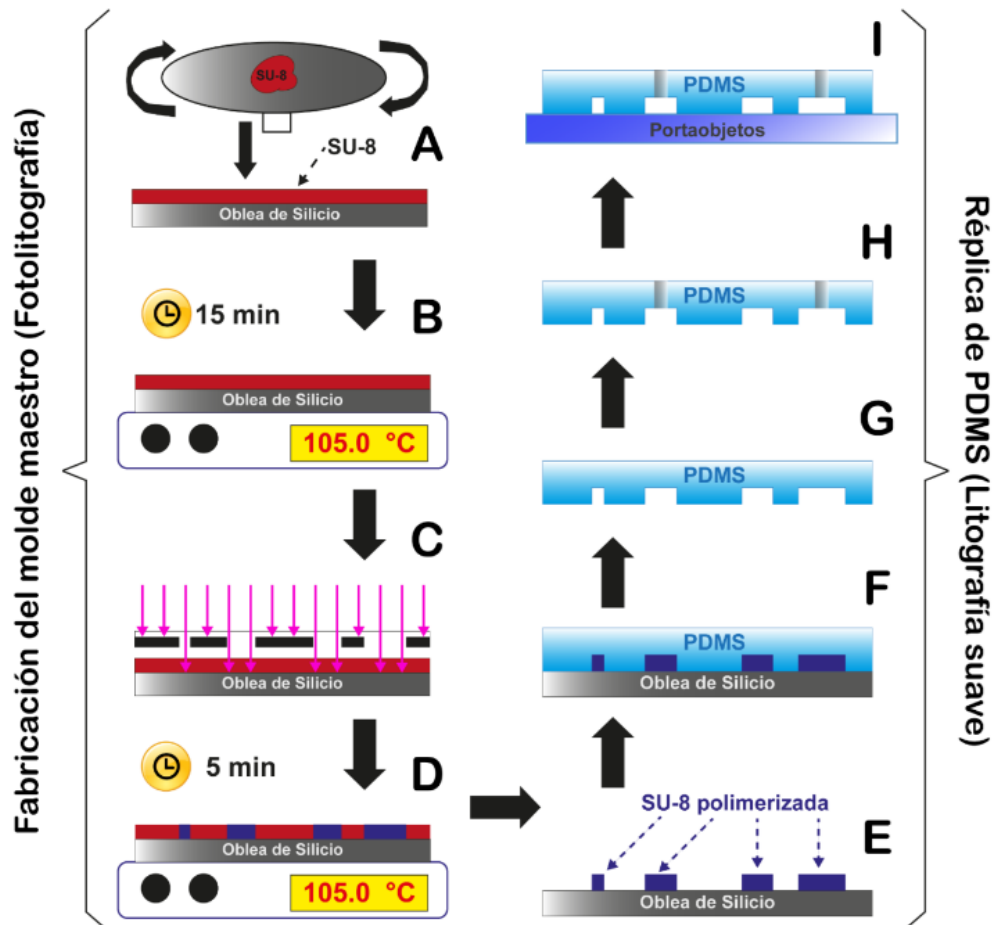


Figura 6. Esquema de fabricación de dispositivos microfluídicos. El procedimiento se inicia con la fabricación del molde maestro a través de la técnica de fotolitografía como lo muestra la figura a la izquierda. Posteriormente, se describe a la derecha el proceso de obtención de los dispositivos utilizando PDMS por medio de litografía suave. (A) Se coloca una capa de resina fotosensible SU-8 sobre una oblea de silicio. (B) Se evaporan los disolventes de la resina con calentamiento. (C) Se expone a una luz UV la oblea de silicio con la máscara de acetato que tiene el diseño de los microcanales de manera que se realiza una reacción de polimerización de la resina sobre la oblea. (D) Para finalizar dicha reacción se calienta de nuevo. (E) Utilizando un revelador se obtienen los microcanales. (F) Se agrega sobre el molde una mezcla del prepolímero de PDMS con su agente entrecruzante. (G) El PDMS polimeriza y se forma un sólido transparente con los microcanales. (H) Se perforan las entradas y salidas con un punzón de biopsia. (I) Utilizando un tratamiento de plasma se logra la unión de PDMS a la superficie de un portaobjetos de vidrio. Texto e Imagen de [27]

3.3.- Caracterización de dispositivo de formación de microgeles

El diseño de los dispositivos de microfluídica utilizados en este trabajo para la producción de microgeles se muestra en la Figura 7. Tiene un diseño de enfoque de flujo con dos entradas para la inyección de las fases acuosa y oleosa y una salida. La fase oleosa utiliza aceite fluorinado y un tensoactivo fluorinado (Ran Biotechnologies) disuelto al 0.5% m/m. La fase acuosa se inyecta en la entrada central del microchip y está compuesta por agarosa de bajo punto de fusión disuelta al 2.8 % en medio de cultivo LB, según se indique en esta fase se deben de suspender las diferentes bacterias involucradas en el ensayo. Para caracterizar las medidas exactas de los microcanales se obtuvieron fotografías de ellos utilizando un microscopio y se utilizó una regla para microscopio (PYSER-SGI LIMITED) para comparar las dimensiones de los canales en las imágenes, tal como se muestra en el primer capítulo de resultados.

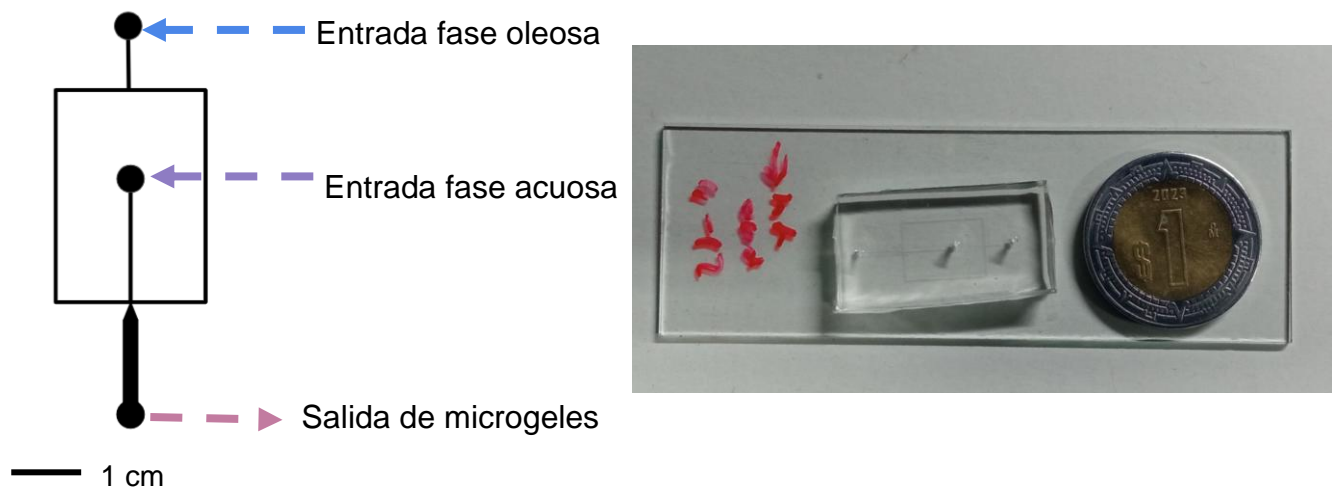


Figura 7. a) Diseño de dispositivo de microfluídica con enfoque de flujo, b) fotografía alusiva al tamaño del microchip comparada con una moneda de peso mexicano

3.4.- Soluciones empleadas y medios de cultivo

3.4.1.-Preparación de PBS

La solución fosfato buffer salino, PBS por sus siglas en inglés Phosphate Buffered Saline es una disolución no tóxica, en la cual, contrariamente a lo que ocurre con el agua, previene la ruptura de las células y su contracción debida a la ósmosis equilibrando la concentración de sal alrededor de las células. PBS y otras soluciones amortiguadoras se utilizan habitualmente en laboratorios biológicos para lavar células, para inmunohistoquímica y para otras técnicas celulares [28]

Para un stock de PBS concentración 10x, se pesaron 0.178 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (J.T. Baker), 0.024 g de KH_2PO_4 (Sigma Aldrich), 0.8 g de NaCl (Distribuidora Química Alvi), 0.02 g

de KCl (J.T. Baker) y se disolvieron en 10 mL de agua Milli-Q, la solución se esterilizó en autoclave y después se dividió en alícuotas de 1 mL y se guardaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados. Para los ensayos, las alícuotas de PBS 10x se descongelaron y diluyeron en 10 mL con agua destilada estéril.

3.4.2.- Tinción de bacterias con el marcador fluorescente BackLight Green

El colorante bacteriano BacLight™ Green (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific; Life Technologies Corporation) es un marcador fluorescente que no tiñe a los ácidos nucleicos y es útil para la detección y monitoreo de bacterias vivas^[29]. Las bacterias teñidas con BacLight Green se pueden observar mediante citometría de flujo. Mediante microscopía de fluorescencia es posible observar eficazmente la tinción con BacLight green de una gran variedad de especies de bacterias diferentes. La intensidad de la tinción depende de varios factores, incluido el carácter de Gram, la composición de la membrana externa y la integridad general de la membrana en las bacterias tratadas con este marcador.

Para una solución madre 1 mM del BacLight Green, se dejó un vial de la tinta a temperatura ambiente antes de abrirlo en una campana de flujo laminar. Después, se preparó la disolución madre de tinte de 1 mM disolviendo el contenido del vial en 74 µL de DMSO (Sigma Aldrich). Posteriormente, se preparó la solución de trabajo del tinte bacteriano, 100 µM de la tinción bacteriana BacLight agregando 2 µL de la solución madre 1 mM a 18 µL de DMSO. Para la tinción de la muestra de bacterias se añadió 1 mL de la solución de tinte de trabajo preparada a 1 mL de la muestra de bacterias para posteriormente incubar la muestra durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.4.3.- Medio Luria Beltrani (LB)

La preparación de 60 mL de medio de cultivo líquido LB se realizó pesando:

0.6 g de peptona (SIGMA)

0.3 g de extracto de levadura (Fluka Analytical)

0.3 de NaCl (Distribuidora química ALVI)

Dichos reactivos se mezclaron y se agregó agua destilada hasta un volumen de 60 mL.

Posteriormente, la mezcla se esterilizó en una autoclave a 120°C durante 20 minutos.

3.4.4.- Caldo de soya y tripticaseína

Se utilizó el medio comercial Caldo de soya y tripticaseína (DIBICO). Se hidratan 30 g de medio en un litro de agua destilada y se dejan reposar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando

frecuentemente hasta ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Distribuir en volúmenes requeridos y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

3.5.- Preparación de muestras de microorganismos

3.5.1.- E.coli-GFP

Se utilizó una cepa fluorescente *Escherichia coli* Top10 (*E.coli*-GFP) para aislar microorganismos con actividad antagonista a esta. Dicha *E.coli*-GFP contiene el plásmido pHT315 con el gen *bla* para la resistencia al antibiótico ampicilina, este gen fue modificado en trabajos anteriores mediante la inserción de una fusión transcripcional donde el promotor Pspac y el gen *gfp* generan fluorescencia constitutiva de GFP. ^[30] *Escherichia coli* es una bacteria anaerobia facultativa y gram negativa que habita en los intestinos y heces de animales y reptiles de sangre caliente. *E.coli* se ha determinado como fácil de aislar y cultivar en el laboratorio por lo cual se ha utilizado para estudios de genética de poblaciones por décadas. ^[31] En cada experimento de encapsulación se preparó un cultivo de *E.coli*-GFP en caldo LB tomando dos colonias de una placa de agar con medio LB, las dos colonias se agregaron a un tubo de ensayo con 2 mL de caldo LB. Además, para conservar el plásmido en las células de *E.coli*-GFP se agregó una disolución de ampicilina a una concentración de 100 µg/mL. Se incubó por 24 horas a 27°C con agitación (200 rpm). Después, se centrifugó durante 2 minutos a 8000 rpm obteniendo un pellet y desechando el sobrenadante para después resuspender con 2 mL de caldo LB estéril. El procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, este volumen se filtró utilizando un filtro de 70 µm (Cell strainer; NWR; 70 µm Nylon; DNase/RNase Free).

3.5.2.- Recuperación de microorganismos en chiles poblanos en descomposición

De una muestra de chile poblano en descomposición (aproximadamente 1 mes y medio, a temperatura ambiente. Se tomaron tres muestras de aproximadamente 1 g y se colocó cada una en un tubo falcon de 50 mL. A cada uno se le agregó un volumen de 10 mL de agua esterilizada y se colocó en una incubadora con agitación a 27°C durante 60 min. Posteriormente, cada muestra se filtró con un colador para células (Cell strainer; NWR; 70 µm Nylon; DNase/RNase Free) de 70 µm para eliminar los trozos de chile recibiendo la suspensión filtrada dentro de un tubo falcon de 15 mL. Para homogeneizar las muestras se mezclaron los tres tubos falcón en uno solo obteniendo 30 mL de líquido de muestra. Después, se dividió de nuevo 10 mL en cada tubo falcon. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 18 min. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se agregaron 2 mL de PBS para resuspender el pellet de

microorganismos. Luego, se filtró con un cell strainer de 70 μm y se colocó en un eppendorf, a este se le agregó glicerol al 20% y se guardó en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y poder preservar las muestras de microorganismos del chile para su posterior uso en los experimentos. Para los ensayos, la muestra se descongeló y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos para formar un pellet y desechar el líquido sobrante después se resuspendió en 2 mL de medio de cultivo LB estéril.

3.6.- Tratamiento de muestras de microorganismos previo a encapsular.

Las muestras descritas a continuación son fases acuosas independientes utilizadas para los diferentes controles con microgeles que se describen en esta tesis.

a) Microgeles vacíos (solo medio LB sin microorganismos encapsulados)

Se tomaron 150 μL de la muestra de caldo LB y se agregaron 150 μL de caldo LB con 2.8 % m/m de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma Aldrich) a una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ aprox. En seguida, se homogeneizó en un vortex durante 1 minuto, obteniendo una concentración final de agarosa de 1.4% m/m. La suspensión resultante se cargó en una jeringa de 1 mL precalentada a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el horno. La jeringa se cubrió con una compresa a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante su manipulación para la formación de microgeles.

b) Diluciones de *E.coli*-GFP y de microorganismos aislados de chile para encapsulación independiente en microgeles.

Para encapsular un promedio de 5 células de *E.coli*-GFP por microgel a partir de los cultivos de una noche *E.coli*-GFP descritos en la sección 3.4.1. *E.coli*-GFP se realizó una dilución con medio LB estéril hasta obtener una $\text{DO}_{630\text{ nm}} = 0.130$.

Para encapsular los microorganismos aislados del chile las suspensiones descritas en la sección 3.4.2. se diluyeron con caldo LB estéril para obtener un promedio de encapsulación de células por gota de 0.3, para ello la suspensión se diluyó hasta obtener una $\text{DO}_{630\text{ nm}} = 0.029$. De tal forma, teóricamente, 74.1% de los microgeles formados resultan vacíos, 22.2% con una célula por microgel y el 3.7% con dos o más células.

Una vez obtenidas las diluciones de trabajo se tomaron 300 μL de la dilución a encapsular, se centrifugaron a 2500 rpm por 2 minutos, inmediatamente después, se desecharon 150 μL del sobrenadante y se resuspendieron en los 150 μL restantes, agitando en un vortex por 1 minuto, dichos 150 μL restantes se pasaron a través de un filtro de 40 μm . Posteriormente, se

agregaron 150 μL de caldo LB con 2.8 % m/m de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma Aldrich) a una temperatura de 50 °C aprox. En seguida, se homogeneizó en un vortex durante 1 minuto, obteniendo una concentración final de agarosa de 1.4% m/m. Ver nota anterior. La suspensión resultante se cargó en una jeringa de 1 mL precalentada a 40 °C en el horno. La jeringa se cubrió con una compresa a 40 °C durante su manipulación para la formación de microgeles.

c) Co-encapsulación de *E.coli*-GFP con microorganismos provenientes de Chile

Se mezclaron 300 μL de una muestra de *E. coli*-GFP a una $\text{DO}_{630} = 0.130$ y 300 μL de la muestra de microorganismos aislados de Chile $\text{DO}_{630} = 0.029$. Dicha mezcla se centrifugó a 2500 rpm por 2 minutos, inmediatamente se desecharon 450 μL del sobrenadante y el pellet se resuspendió en los 150 μL restantes, agitando en un vortex por 1 minuto, dichos 150 μL restantes se pasaron a través de un filtro de 40 μm . Posteriormente, se agregaron 150 μL de la agarosa caliente de bajo punto de fusión con medio LB al 2.8 % m/m. En seguida, se homogeneizó en un vortex durante 1 minuto, obteniendo una concentración final de agarosa de 1.4% m/m. De manera que con las probabilidades calculadas con la distribución de Poisson, el 22.2% de los microgeles estarán encapsulados con una o más células de *E.coli*-GFP junto con una sola cepa de la cepa de microorganismos aislados de Chile.

3.7.- Montaje del sistema para la producción de microgeles

Para la producción de microgeles se utilizaron dos bombas para jeringa (NE-300 Just Infusion™ Syringe Pump New Era Pump Systems, Inc). Una para la fase acuosa (la muestra con bacterias o medio LB) que se inyecta a través de una jeringa de 1.0 mL de diámetro interno = 4.699 mm y precalentada a 40° C. La fase acuosa se administró a un flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{h}$. La segunda bomba de jeringas fue utilizada para inyectar la fase oleosa con el tensoactivo al 0.5 % m/m, . La fase orgánica (aceite fluorinado HFE 7500 con un tensoactivo fluorinado (Ran Biotechnologies) disuelto al 0.5% m/m) se cargó en una jeringa de 3.0 mL (diámetro interno = 8.585 mm) y se administró dentro del microchip a un flujo de 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$. Para conectar las jeringas con los líquidos al microchip, cada aguja de la respectiva jeringa se conecta a un extremo de tubería de PTFE del número 24. Antes de conectar el otro extremo de la tubería al microchip, esta se llena completamente de la fase correspondiente para evitar la entrada de aire dentro de los canales de microchip.

3.8.- Recolección y registro de la formación de microgeles

Se montó el sistema para la producción de microgeles como lo describe la sección 3.7.- *Montaje del sistema para la producción de microgeles*. La jeringa de la fase acuosa se envolvió en una compresa con una temperatura de 40 °C para evitar la solidificación de la agarosa durante todo el tiempo de formación de las microgotas las cuales se recolectaron durante 15 minutos. La formación de microgotas se monitoreo con el uso de una cámara rápida (AMETEK, MIRO M11, Vision Research), tomando videos con una velocidad de captura de 800 cuadros/s, un tiempo de exposición de 100 μ s y una resolución de 512 x 512 pixeles. Utilizando el software PCC 2.2 (AMETEK) la cual permitió determinar la frecuencia de la formación de las microgotas.

La recolección de las microgotas formadas se llevó a cabo con una tubería de PTFE (Cole Parmer, ID = 0.56 mm de PTFE del número 24 dentro de un tubo de 1.5 mL sumergido en hielo favoreciendo el cambio de la fase acuosa a la fase gel formada por la agarosa, formando la emulsión de microgeles dispersos en la fase de aceite fluorinado.

Una vez realizada la encapsulación en los microgeles, los tubos se transfirieron del hielo a una incubadora (Excella E24, New Brunswick Scientific) y se mantuvieron durante 48 horas a 27°C con una agitación constante de 200 rpm.

3.9. - Observación de microgeles por microscopía de fluorescencia

Para observar los microgeles de las muestras independientes después de encapsular se tomaron 10 μ L de la muestra de microgeles y se colocaron en una cámara de Neubauer (SIGMA-ALDRICH), Modelo 717805; Profundidad 0.1 mm), la cual fue colocada sobre la platina de un microscopio de fluorescencia invertido (LEICA, DMI3000-B), utilizando los objetivos 63x/0.75 (LEICA). Para inducir la fluorescencia de la proteína GFP en *E. coli*-GFP se utilizó una lámpara de halógeno (PhotoFluor II, 89 North). La luz emitida se dirigió al arreglo óptico del microscopio mediante un cable de fibra óptica. Dicho arreglo consta de dos filtros y un espejo dicroico (Semrock, FITC-5050A/LP-C), de manera que se logró observar la fluorescencia emitida por GFP siendo este el fluoróforo para indicar el crecimiento bacteriano. La luz proporcionada por la lámpara de halógeno pasa a través del filtro de excitación el cual transmite solo la luz que es capaz de excitar la muestra (450-500 nm (Figura 8). Esta luz se encuentra con un espejo dicroico que refleja la luz por debajo de los 500 nm hacia la muestra a través del objetivo del microscopio. La luz induce la fluorescencia de la GFP que emite luz verde con longitudes de onda de 500 nm a 600 nm (Figura 9). Parte de la luz verde que emite la GFP regresa a través del objetivo del microscopio que transmite por encima de longitudes

de onda de los 500 nm. Finalmente, la luz de fluorescencia se encuentra con un filtro de emisión que solo permite el pasó de luz entre 525 y 565 nm. La luz se registra mediante una Cámara Canon (EOS REBEL SL3) acoplada al arreglo óptico del microscopio.

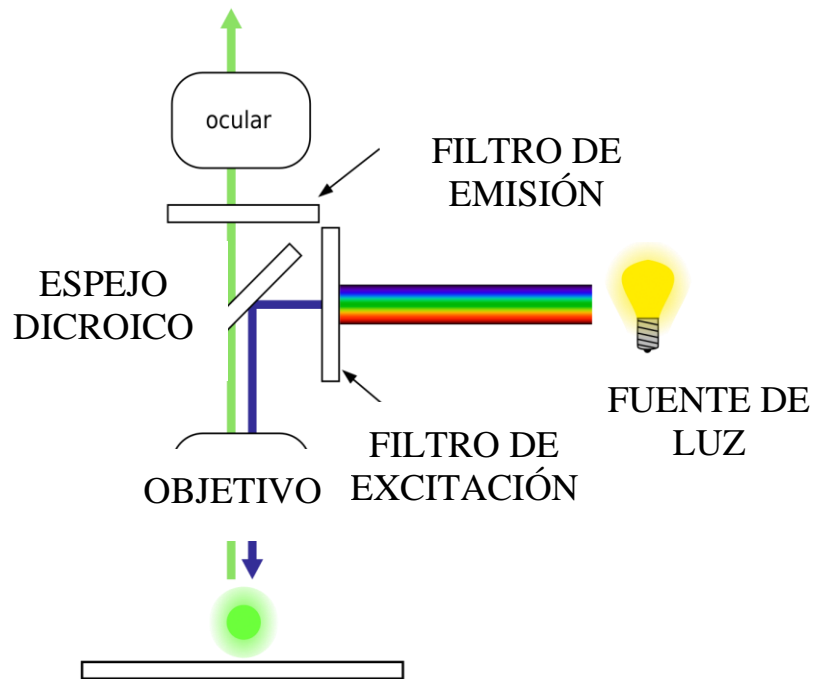


Figura 8. Esquema de arreglo de microscopio de fluorescencia

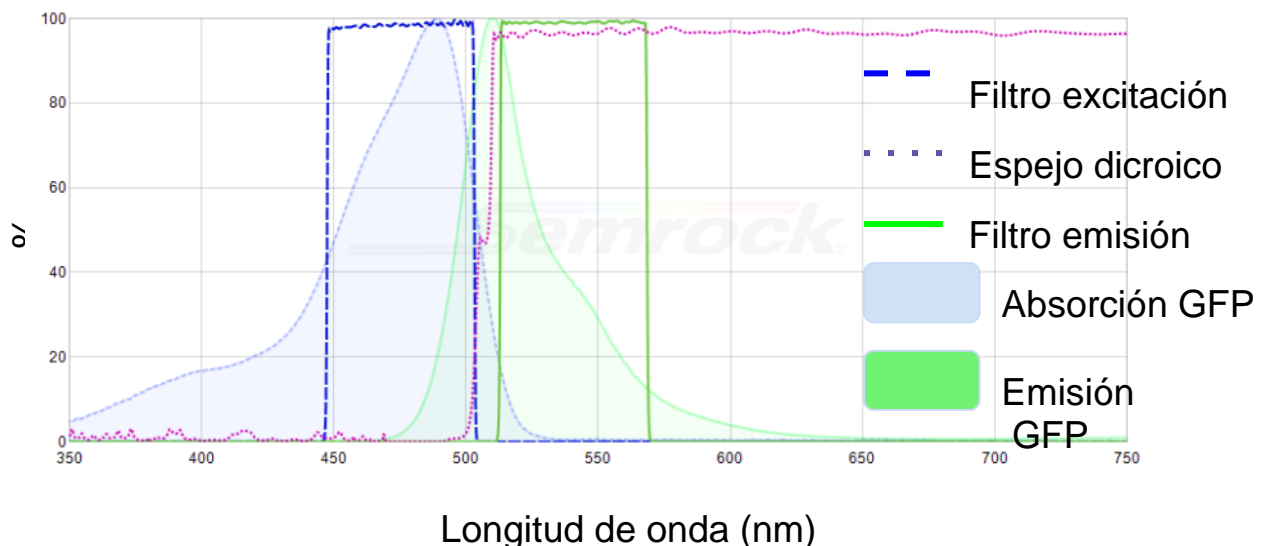


Figura 9. Espectro de absorción y emisión para la GFP de la cepa *E. coli*-GFP así como espectros de transmitancia de los componentes del arreglo de filtros y espejos utilizados en el microscopio de fluorescencia.

3.10.- Tratamiento de los microgeles previo a FACS

Después del tiempo de incubación, los microgeles se transfieren desde la fase oleosa en la que se encuentran hacia una fase acuosa la cual es caldo líquido de LB previamente filtrado con un filtro de 0.22µm o PBS filtrado según se indique. Para esto, con una jeringa se retira tanto aceite como sea posible de la suspensión de microgeles en aceite, después, se agregan 25 µL de 1H, 1H, 2H, 2H-Perfluorooctanol (PFO, Sigma-Aldrich) y 200 µL de caldo líquido de LB filtrado o PBS. Enseguida, se agita durante 2 s con la ayuda de un vortex y se centrifuga a 1000 rpm durante 15 s generando una mezcla bifásica. En la fase superior se encuentran los microgeles suspendidos de interés en caldo líquido LB mientras que en la fase inferior se encuentra el tensoactivo, el aceite fluorinado y el PFO. Finalmente, se transfiere la fase acuosa a un tubo estéril utilizando una micropipeta y se agregan 600 µL de caldo líquido LB o PBS filtrado. Dicho tubo se coloca en hielo durante su manipulación previa al análisis con FACS.

3.11.- FACS

Para llevar a cabo el análisis y clasificación de los microgeles obtenidos, se utilizó el equipo de FACS Moflo Astrios (Beckman Coulter) equipado con una boquilla de 100 µm y utilizando el software Summit V6.3.1.16945. Como fluido envolvente se utilizó PuraFlo 8x Sheath Fluid (Beckman Coulter). Además, se utilizó un láser azul de 488 nm como fuente de luz para la detección de fluorescencia verde. La luz incidente se dispersa dependiendo de las características de cada microgel, de tal manera que dicho equipo recibe señales con base en la complejidad que tiene el microgel el cual se detecta con Side Scatter (SSC) y con base en el tamaño el cual se detecta con el Forward Scatter (FSC). Para realizar las separaciones, en el software se colocan ventanas que permiten la selección de las diferentes poblaciones de microgeles que se pueden llegar a observar en una muestra. Una vez seleccionadas las ventanas, las diferentes poblaciones de microgeles se separan y se recuperan en tubos de 1.5 mL para cada región, cada uno con 100 µL de medio líquido LB filtrado y previamente adicionado.

Para la obtención de los gráficos y análisis de las muestras de microgeles, se utilizó el programa FlowJo (FlowJo Engine v5.00000), permitiendo observar las diferentes poblaciones de microgeles de acuerdo con su intensidad de fluorescencia y su capacidad de dispersión de la luz.

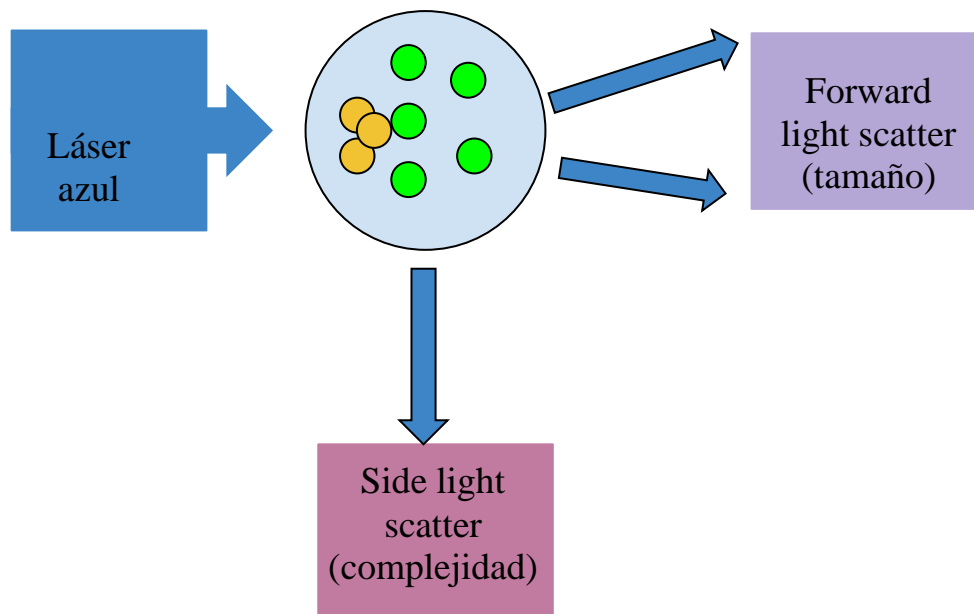


Figura 10. Esquema de dispersión generada en los microgeles en el equipo de FACS. La imagen fue tomada y modificada de la referencia número 32

3.12.- Tratamiento de microgeles clasificados y separados con FACS

Después de clasificar con FACS los microgeles, los microorganismos que estos contenían se recuperaron a macroescala utilizando diluciones consecutivas de 1 en 10 del líquido que contenía a los microgeles diluyendo con caldo líquido LB, para así utilizar las diluciones para inocular placas de agar-LB e incubarlas a 27°C durante 48 horas. Posteriormente, se tomaron fotografías de las colonias obtenidas utilizando una cámara (Canon, EOS, Rebel SL3, EFS 18-55 mm). Para observar si había fluorescencia en las colonias, se utilizó microscopía de fluorescencia colocando la caja petri sobre la platina del microscopio con el objetivo 4x (LEICA, 4x/0.1).

3.13.- Ensayos de inhibición

Para determinar la actividad antagonista de las colonias se realizaron ensayos sobre placas de agar mediante la técnica de *spot-on-lawn*. Después de obtener las placas inoculadas con los microgeles recuperados del FACS se tomaron con un palillo colonias con diferente morfología y se colocaron en placas de agar LB inoculadas con un césped de un cultivo overnight de *E.coli*-GFP a diferentes concentraciones y se incubaron durante 48 horas a 27°C. Una vez observado el crecimiento de las colonias, se aislaron aquellas que presentaron halos de inhibición y se estriaron en nuevas placas de agar LB para obtener cepas puras de los

microorganismos inhibidores (48 horas a 27°C). Finalmente, se preservaron dichas placas a 4.9°C para su posterior uso.

3.14.- Ensayos de actividad antimicrobiana con microorganismos aislados del chile

3.14.1.- Preparación de stocks

Aleatoriamente se escogieron 10 colonias que presentaron inhibición frente a *E.coli*-GFP en los ensayos anteriores de co-encapsulación para realizar stocks. Cada cepa se sembró por agotamiento en una placa de agar de medio LB de manera que quedaron limpias y separadas, posteriormente se tomó una colonia de cada cepa y se preparó un overnight con 2 mL de medio LB líquido durante 24 horas a 27°C. Finalmente se tomó 500 µL de dicho overnight y 500 µL de glicerol al 30% y dicha mezcla se homogeneizó y se congeló en un congelador a -80°C.

3.14.2.- Ensayos de inhibición del crecimiento de E. coli-GFP con extractos acuosos de las bacterias seleccionadas con FACS

Para obtener los extractos, se realizó el sembrado de cada stock en platos de agar, permitiendo el crecimiento durante 48 horas a 27°C. Después, se tomó de tres a cuatro colonias aisladas de mismo tamaño y forma para colocarlas en 2 mL de caldo LB estéril y se incubó a 27°C durante 24 horas, esto para generar los respectivos overnights. Posterior a las 24 horas de incubación, se centrifugó cada overnight de stocks a 8000 rpm durante 2 min y se recuperó el sobrenadante. Asimismo, se realizó el tratamiento de la muestra de *E.coli*-GFP como se describe en la sección 3.2.1.- *E.coli*-GFP. Se midió la absorbancia de *E.coli*-GFP y se realizaron diluciones hasta obtener una densidad óptica de 0.004 a 630 nm. Finalmente, en una placa de 96 pozos se agregaron 150 µL totales en cada pozo de controles de LB, *E.coli*-GFP, *E.coli*-GFP/antibiótico, *E.coli*-GFP/extractos y extractos solos por triplicado con su respectiva relación en volumen de extractos con *E.coli*-GFP. Se colocó la tapa al plato de 96 pozos, se selló con Parafilm se incubó a 27°C y 200 rpm por 24 h. Finalmente después de las horas se leyó la absorbancia del plato a 630 nm.

4.- RESULTADOS

4.1.- Caracterización del tamaño de los canales de los dispositivos de microfluídica

El tamaño de los microgeles de microfluídica depende de dos factores principalmente: el tamaño de los microcanales y los flujos utilizados durante su formación. Por esta razón, se realizó una caracterización del ancho y alto de los microcanales que se utilizaron. Para ello, se realizaron cortes transversales en los microchips utilizando una hoja de bisturí y mediante microscopía de campo claro se determinó el alto y el ancho de los canales de aceite y agua en el diseño utilizado (Figura 11- a y b). Además, se midió desde un plano frontal los canales en la intersección (Figura 11- c).

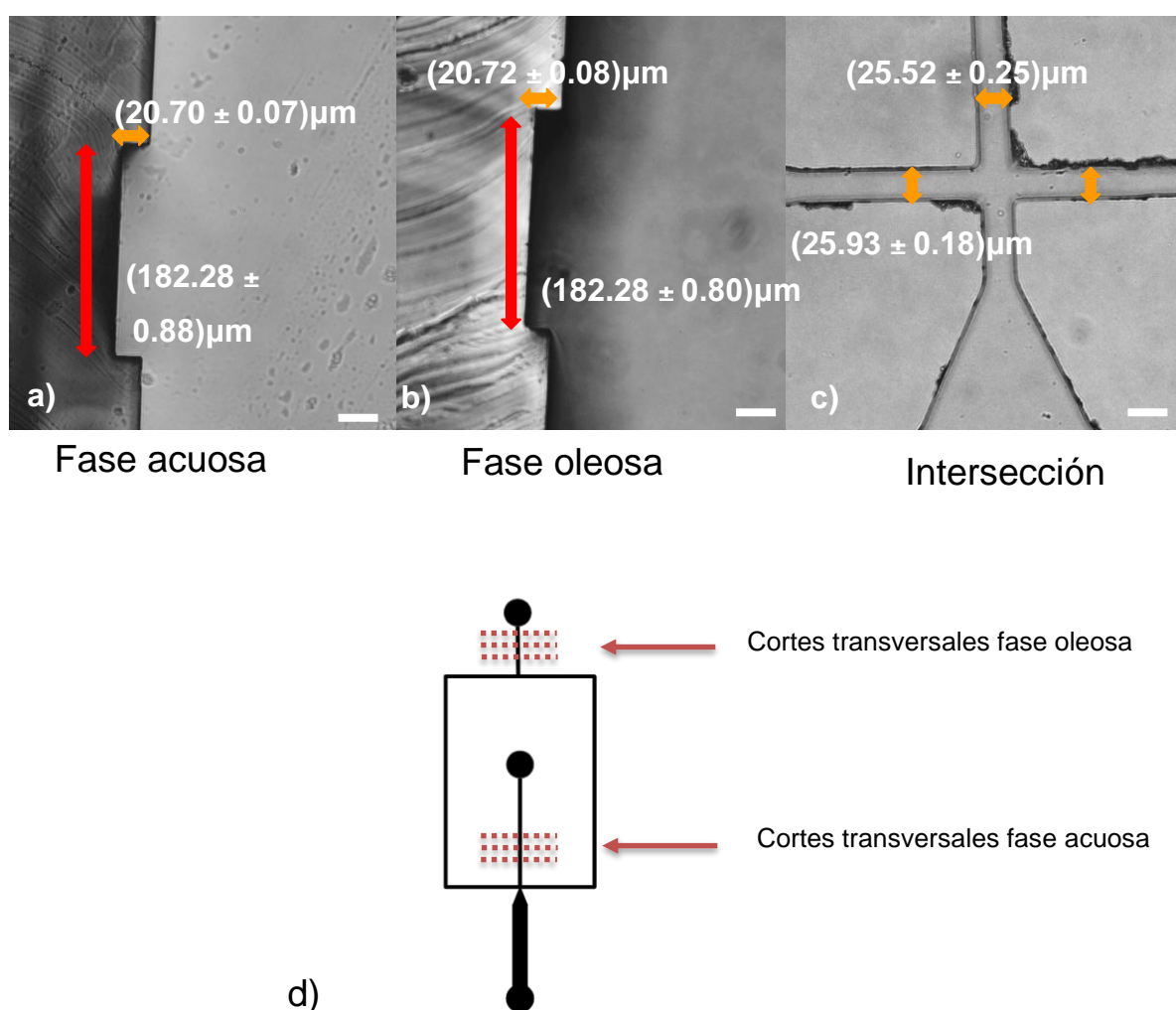


Figura 11. Fotografías de microscopía de los microcanales utilizados para la producción de microgeles. a) Medidas del ancho y alto del canal de la fase acuosa b) Medidas del ancho y alto del canal de la fase oleosa. c) Medidas de longitud de ancho para canales en la intersección. d) Esquema de cortes transversales para la caracterización Barra de escala $20 \mu\text{m}$

Se promediaron diez mediciones de la misma sección utilizando distintas fotos y los resultados se muestran en la Figura 12.

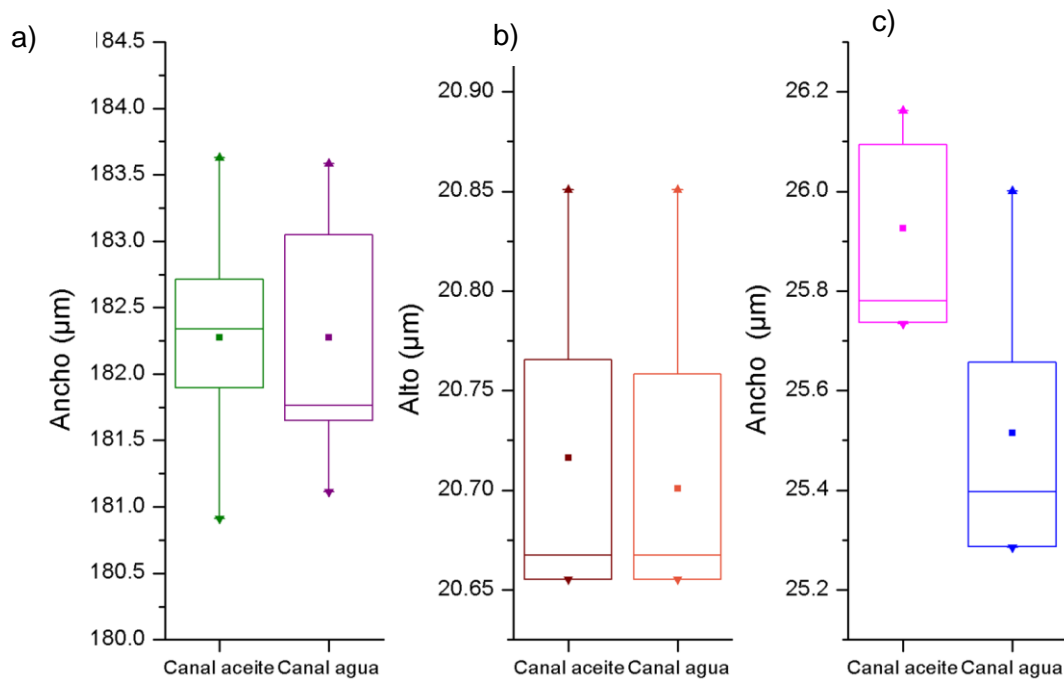


Figura 12. Diagramas de cajas con las mediciones de longitudes realizadas para la caracterización del chip; a) Ancho de los canales del agua y del aceite medidos con cortes transversales; b) Alto de los canales medidos con cortes transversales; c) Ancho de los canales en la intersección de las fases para la formación de microgotas.

Como se observa, los canales en la intersección se reducen cerca de siete veces en su ancho con respecto a los canales por donde se introducen las dos fases, esto debido a que, al reducir su tamaño, aumenta la velocidad de ambas fases y se favorece la formación de los microgeles.

4.2.- Caracterización de la frecuencia de formación y del tamaño de los microgeles.

Para obtener la frecuencia de formación de microgeles se realizó el análisis de videos tomados con la cámara de video de alta velocidad, esto dio como resultado una frecuencia de $1176 \frac{\text{microgotas}}{\text{segundo}}$

Para predecir el número de células de microorganismos encapsuladas en cada microgel es necesario conocer el volúmen de los microgeles. Para ello, se analizaron varias imágenes de microscopía de los microgeles formados en los dispositivos de microfluídica, en total se

analizaron 169 microgeles (Figura 13). Mediante una calibración con regla micrométrica graduada, se determinó un diámetro promedio de (25.1 ± 2.5) μm . Esto equivale a un volumen promedio de (8.28 ± 0.6) μL (Figura 14).

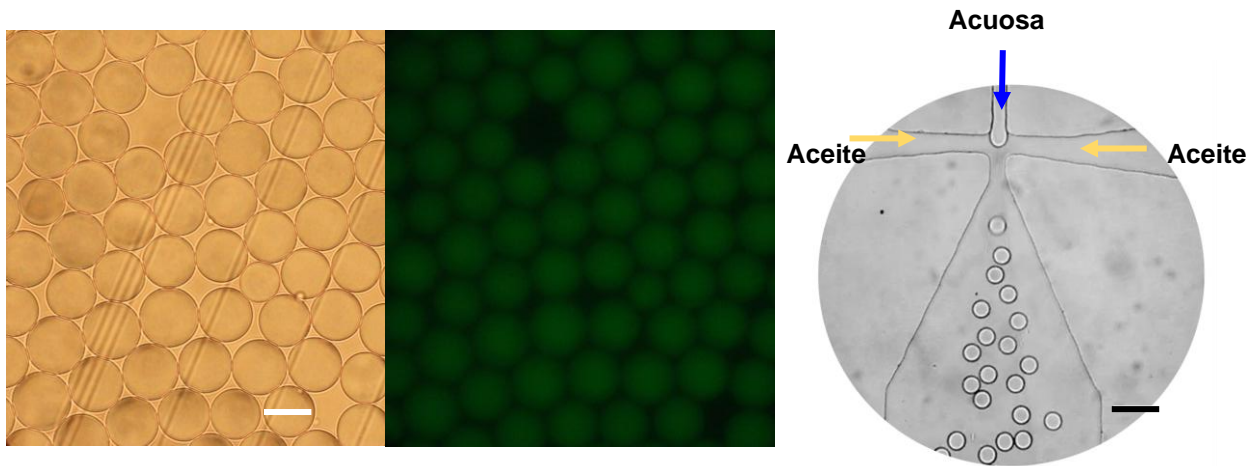


Figura 13. Microfotografía representativa de los microgeles utilizados para el cálculo de volumen. Barra 50 μm

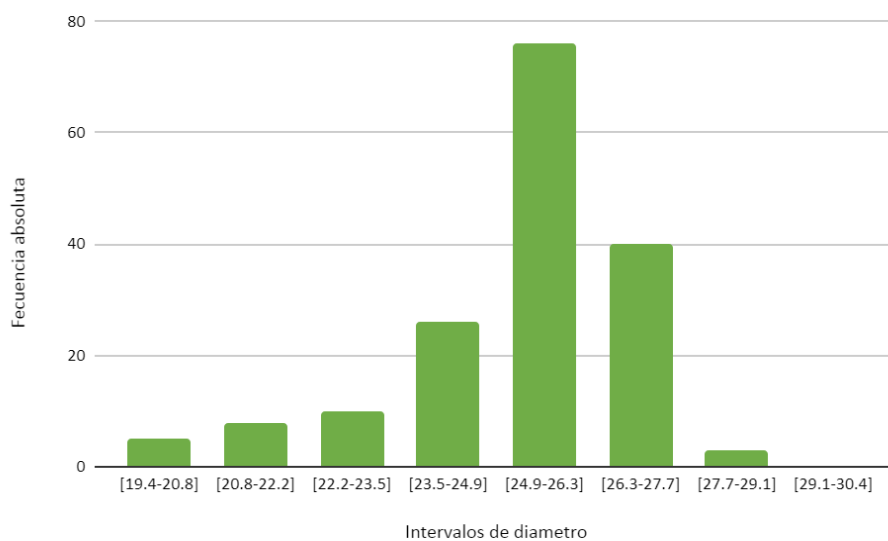


Figura 14. Histograma de los tamaños de los microgeles elaborado a partir del diámetro de 169 microgeles.

4.3.- Curvas de calibración del número de células por microgel vs. DO_{630} de los cultivos

4.3.1.- Distribución de Poisson

La encapsulación de las bacterias en los microgeles es un proceso aleatorio, sin embargo, se puede predecir de manera estadística la probabilidad de que cierto número de células (cero,

una, dos, tres, cuatro, etc) queden encapsuladas dentro de un microgel. Por lo tanto, se realizaron experimentos donde se determinó experimentalmente la cantidad de células de interés dentro de cada microgel, ya que en las co-encapsulaciones se pretende que solo haya un microorganismo proveniente del chile co-encapsulado con *E.coli*-GFP. Si hubiera dos o más y se presenta inhibición, no se podría determinar cuál microorganismo es el que posee la capacidad de inhibir a la cepa fluorescente (Figura 15). Asimismo, se busca que *E.coli*-GFP quede encapsulada en todas las microgotas para evitar que el microorganismo proveniente del chile quede co-encapsulado sin la cepa fluorescente y de una falsa respuesta de antagonismo. Los datos experimentales, se ajustaron a una distribución estadística tipo Poisson ^[33] como se refiere a continuación y con ello fue posible realizar predicciones del número de células por gotas.

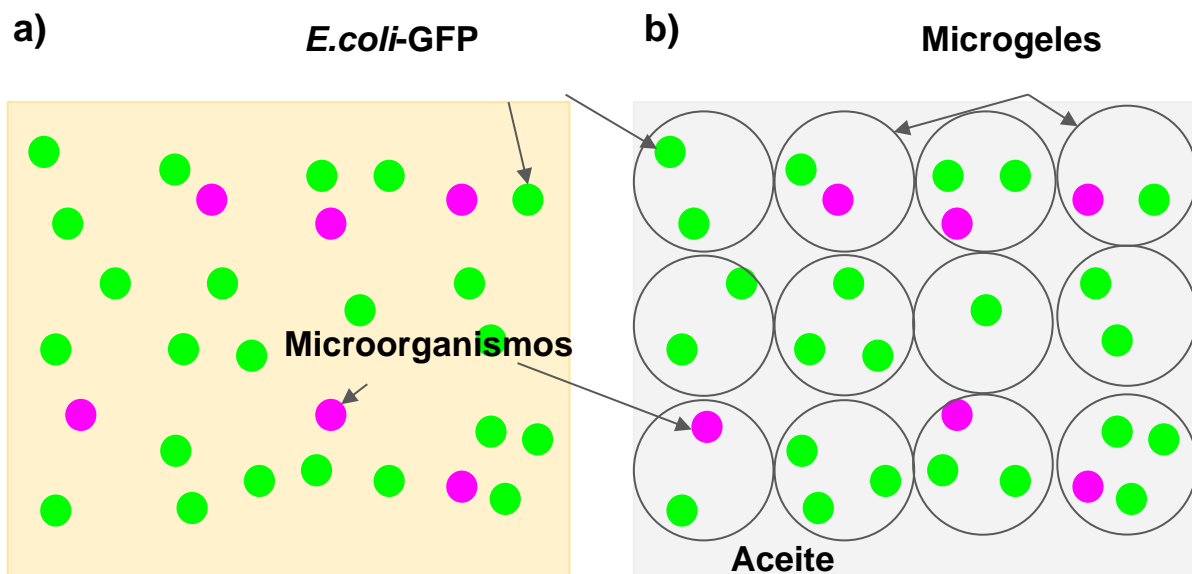


Figura 15. a) Cuando se genera un cultivo con una mezcla de todas las células, los productos celulares también están mezclados, lo que impide la identificación independiente de organismos antagonistas a *E.coli*-GFP. b) La co-encapsulación celular permite el análisis de células individuales al confinarlas dentro de un microambiente. Debido a que las células de *E.coli*-GFP se encuentran en una densidad mayor a los microorganismos aislados del chile, todas las gotas tienen *E.coli*-GFP y algunas están co-encapsuladas con solo un microorganismo del chile.

Para una adecuada distribución, se debe establecer un tamaño constante de microgeles para no afectar la co-encapsulación de las células. Esto solo se logra por microfluídica.

La metodología de encapsulación de bacterias dentro de los microgeles sigue la distribución de Poisson (Ecuación 1), la cual es una función de la probabilidad (P) que depende de dos variables:

$$P(x, \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!} \quad \text{Ecuación 1.}$$

λ , que es el número promedio de células encapsuladas por microgel y x que representa el número específico de células encapsuladas por cada microgel. El valor de λ depende de la densidad bacteriana en la suspensión utilizada para encapsular y del volumen de los microgeles que se forman (Ecuación 2)

$$\lambda = (D)(V) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde

$D = \text{Densidad de bacterias en suspensión } \left[\frac{UFC}{pL} \right]$

$V = \text{Volumen promedio de microgeles } [pL]$

Con un tamaño constante de microgeles, al aumentar la densidad bacteriana aumenta el valor de λ . En esta tesis se utilizaron valores de λ igual a 0.3 para microorganismos aislados de Chile y λ de 5 para células de *E.coli*-GFP. Al observar la Figura 16 en específico $\lambda = 0.3$, para los microorganismos aislados de Chile hay un 74.08% de probabilidad de geles vacíos, 22.2% de geles con una célula y 3.70% de que existan dos o más células. Por lo tanto, para las co-encapsulaciones, el 25.4% de los microgeles formados teóricamente estarán ocupados por al menos una célula de *E.coli*-GFP junto con una célula de algún microorganismo proveniente del Chile poblano.

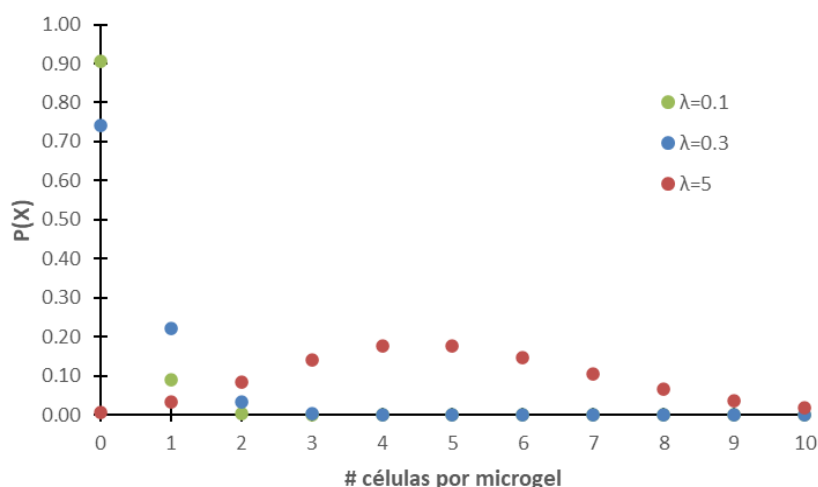


Figura 16. Distribución de probabilidades de Poisson para la metodología de encapsulación de bacterias dentro de microgeles. En el eje Y se calculó la probabilidad $P(x)$ para cada valor de número de células por microgel (Eje X) con la ecuación 1, utilizando un valor específico de λ .

4.3.2.- Curva de calibración de DO_{630} de cultivos de *E.coli*-GFP vs. λ

Como se mencionó en la sección anterior, conociendo la concentración de las bacterias y el volumen de las microgotas se puede calcular el valor teórico de λ (Ec. 2) y con la función de Poisson determinar el porcentaje de microgeles con cierto número de microorganismos en su interior. Experimentalmente, para determinar de manera rápida y reproducible la densidad de bacterias en un caldo de cultivo se utilizó la densidad óptica a 630 nm de suspensiones bacterianas con diferente densidad de células por mililitro. Para obtener la curva de calibración de *E.coli*-GFP, se realizaron distintas diluciones (ver Tabla 1) de un cultivo de toda la noche y se midieron sus absorbancias a 630 nm. Posteriormente, cada dilución se encapsuló en microgeles y se les tomaron fotografías mediante microscopía de fluorescencia y de campo claro inmediatamente después de ser formados (tiempo = 0 horas). Mediante el análisis de estas fotografías se realizó el conteo de células de *E.coli*-GFP encapsuladas en cada microgel y se realizaron las gráficas mostradas en la Figura 17. Utilizando el programa de cómputo Origin se ajustó la ecuación de distribución Poisson a los datos experimentales. El ajuste proporcionado por este software permitió determinar el valor de lambda que se obtiene para cada dilución de bacterias utilizada.

Tabla 1. Diluciones preparadas a partir de la suspensión bacteriana de *E.coli*-GFP

Dilución	DO_{630}	λ (obtenida a partir del ajuste de la ecuación de Poisson a los datos experimentales)
C_0 Muestra sin diluir	0.264 ± 0.025	10.07
$\frac{1}{2} C_0$	0.171 ± 0.011	5.95
$\frac{1}{3} C_0$	0.103 ± 0.002	4.65
$\frac{1}{10} C_0$	0.049 ± 0.003	1.85

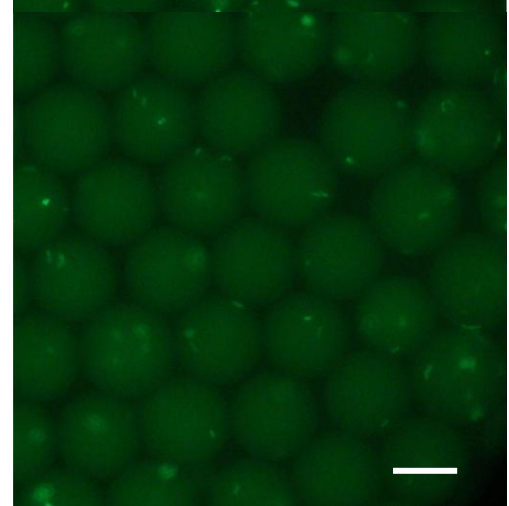
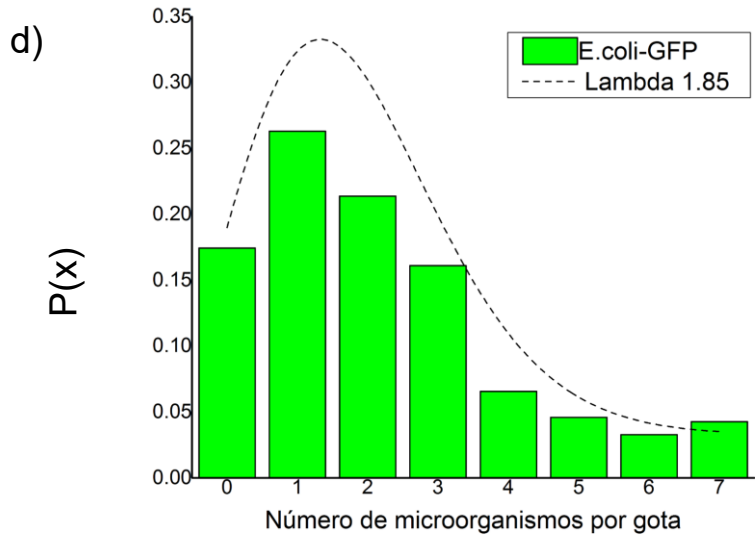
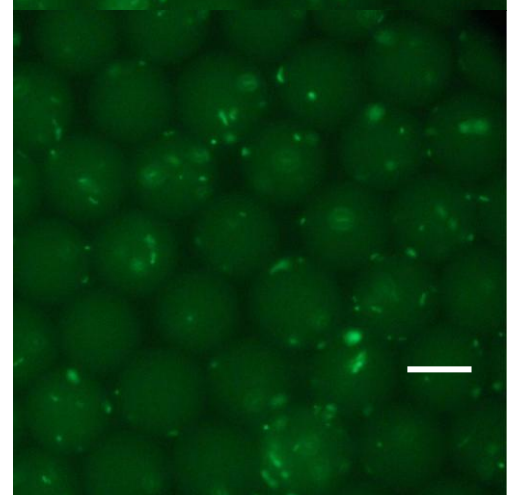
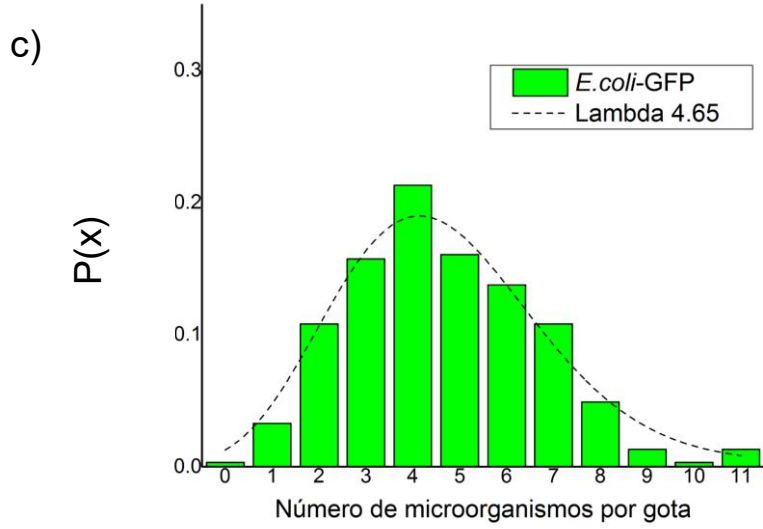
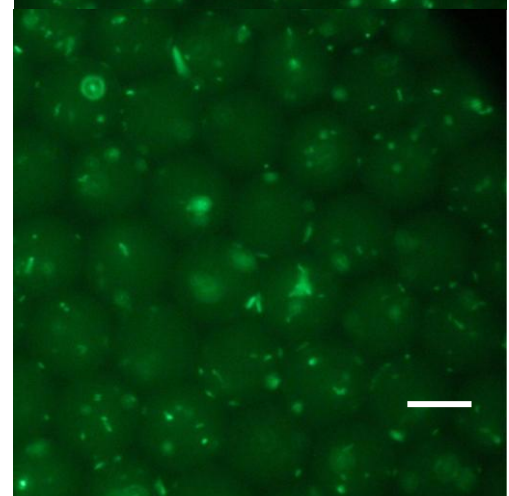
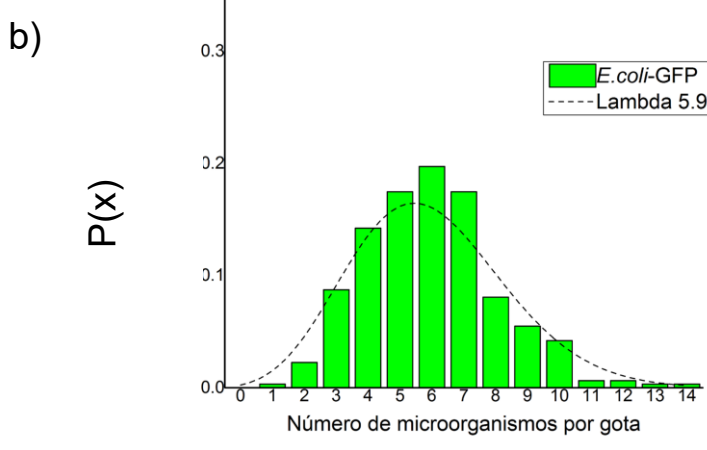
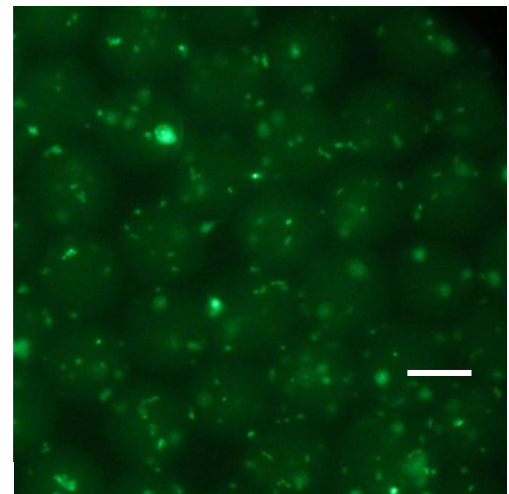
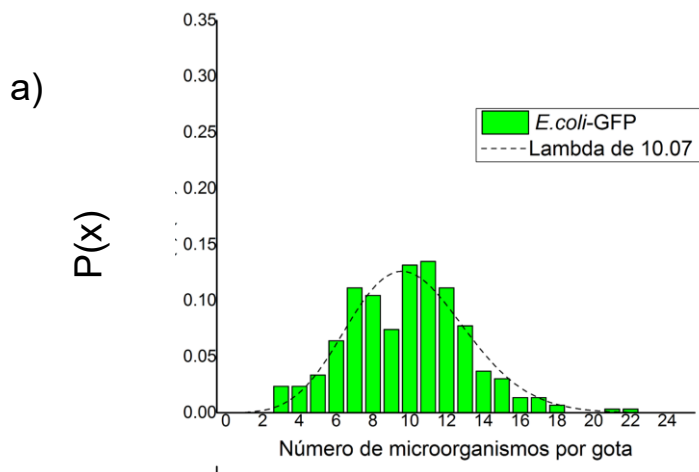


Figura 17. Las barras representan los datos experimentales del conteo de células dentro de cada microgel de cada disolución para microorganismos *E.coli*-GFP. Las líneas punteadas representan el ajuste de la función de Poisson obtenidas con el programa Origin. a) Muestra C_0 de 296 microgeles ; b) Dilución $\frac{1}{2} C_0$ de 309 microgeles; c) Dilución $\frac{1}{3} C_0$ de 305 microgeles ; d) Dilución $\frac{1}{10} C_0$ de 304 microgeles. Barra de escala de $25 \mu\text{m}$

Con los resultados de cada dilución (Tabla 1) se logró construir la curva de calibración de DO_{630} de cultivos de *E.coli*-GFP vs. λ (Figura 18). El resultado es lineal y es lo esperado debido a que se pretende establecer una relación directamente proporcional, ya que a medida que aumenta la densidad óptica (mayor concentración), el número promedio de células dentro de los microgeles aumenta.

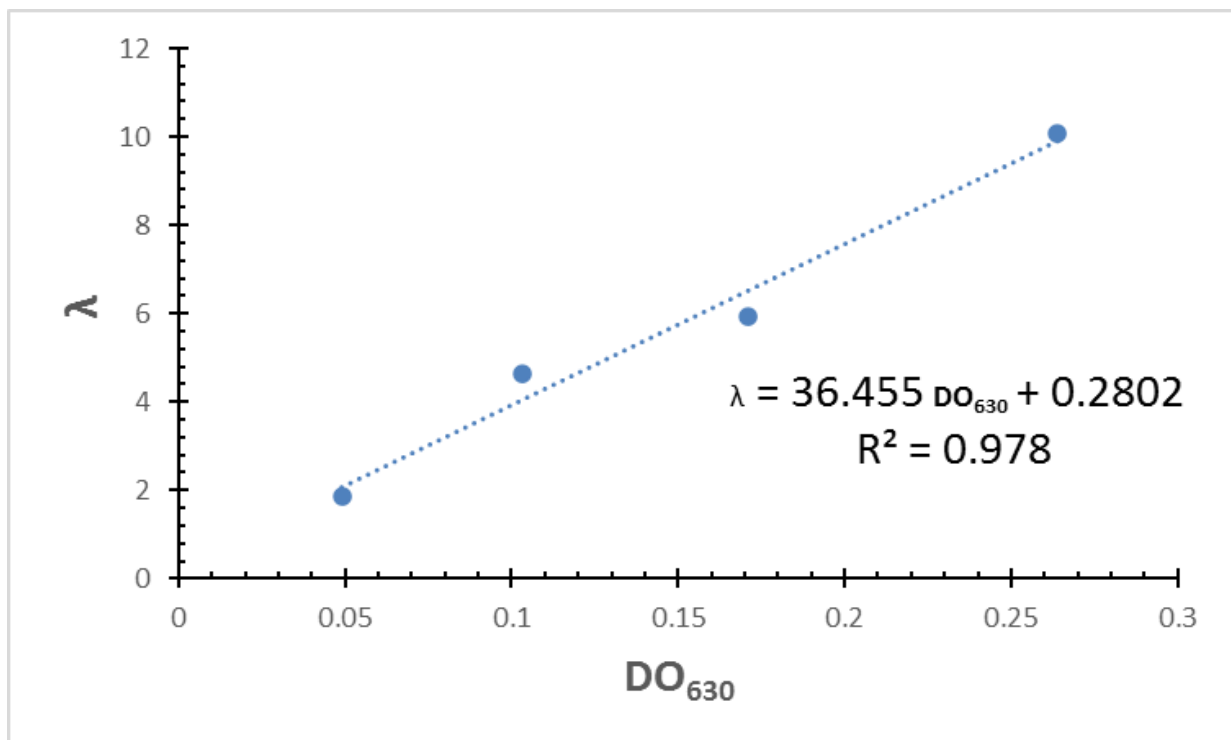


Figura 18. Curva de calibración del número promedio de microorganismos de *E.coli*-GFP por microgel(λ) contra la DO_{630} de un cultivo de *E.coli*-GFP.

4.3.3.- Crecimiento de *E.coli*-GFP en los microgeles

Para determinar si *E.coli*-GFP es capaz de crecer dentro de los microgeles se tomó una muestra de un cultivo de una noche y se diluyó a la mitad ($\frac{1}{2} C_0$). La densidad óptica de la suspensión resultante fue $\text{DO}_{630} = 0.256$. Posteriormente, la muestra se encapsuló y se tomaron fotografías con microscopía de campo claro y fluorescencia de los microgeles producidos a las cero horas de incubación y después de 24 horas de incubación a 27°C (Figura 19).

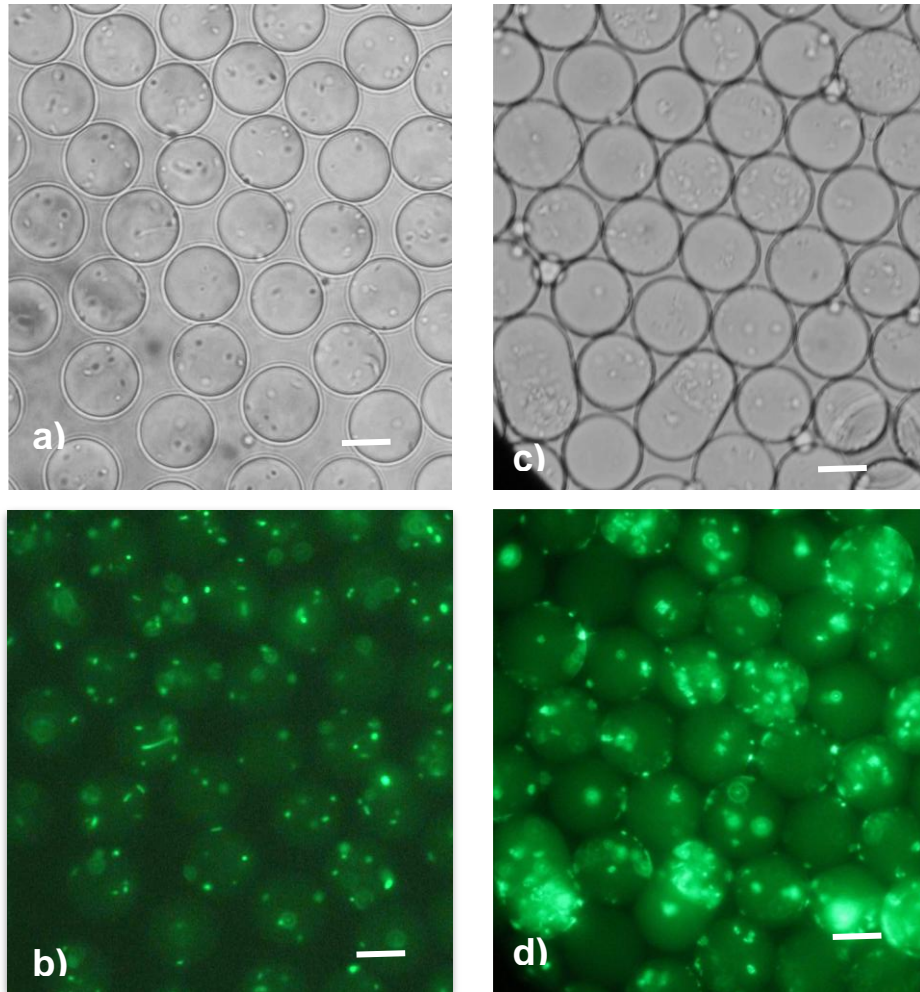


Figura 19. *E.coli*-GFP encapsuladas con una $\lambda = 5$ ($DO_{630} = 0.256$) a) cero horas de incubación imagen en campo claro; b) cero horas de incubación imagen en campo fluorescente; c) Microgeles después de 24 horas de incubación a 27°C, imagen en campo claro; d) imagen en campo de fluorescencia. Barra de escala de 25 μm .

En relación a las fotografías anteriores se determinó que en la encapsulación de *E.coli*-GFP dentro de microgeles con agarosa en caldo de cultivo LB hay crecimiento bacteriano debido a que se observa formación de microcolonias de dicha cepa. Éstas se observan más fluorescentes en comparación al tiempo 0 horas y al observar el campo claro en la Figura a) y b) los microgeles poseen rugosidad dentro de éstos, por lo cual, en los experimentos posteriores se puede evaluar su crecimiento o su inhibición con los microorganismos aislados de Chile poblano.

4.3.4- Curva de calibración de microorganismos aislados de Chile poblano en descomposición

Selección de medio de cultivo

Los microorganismos aislados del chile poblano se cultivaron por separado en placas con medio de cultivo sólido LB y en medio sólido soya-triptona. En las Figura 20 y 21 se observan las diferencias en el crecimiento de los microorganismos sobre estos dos medios de cultivo utilizados.

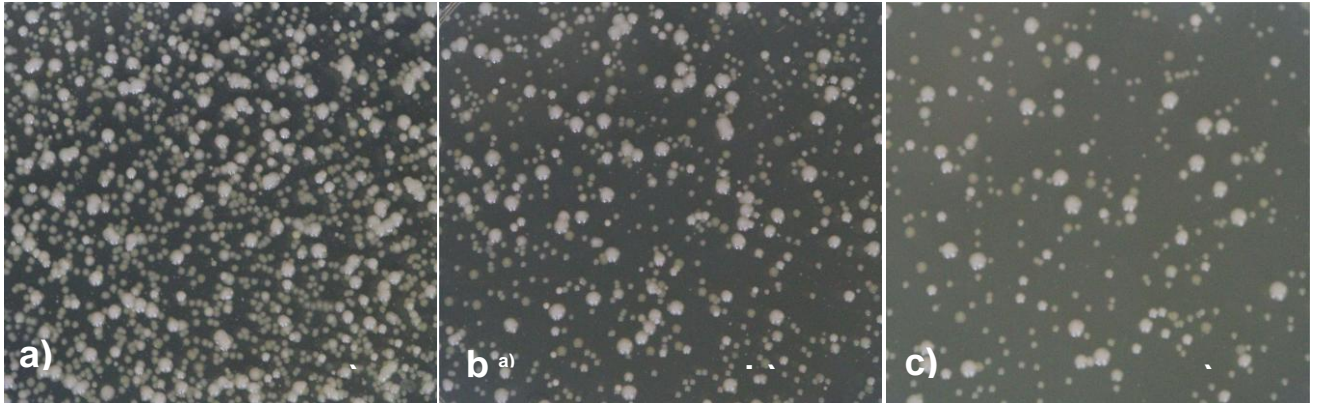


Figura 20. Placas de chile en medio LB incubadas a 27°C durante 24 horas; a) C_0 , b) $\frac{33}{100}$ de C_0 , c) $\frac{1}{10}$ de C_0

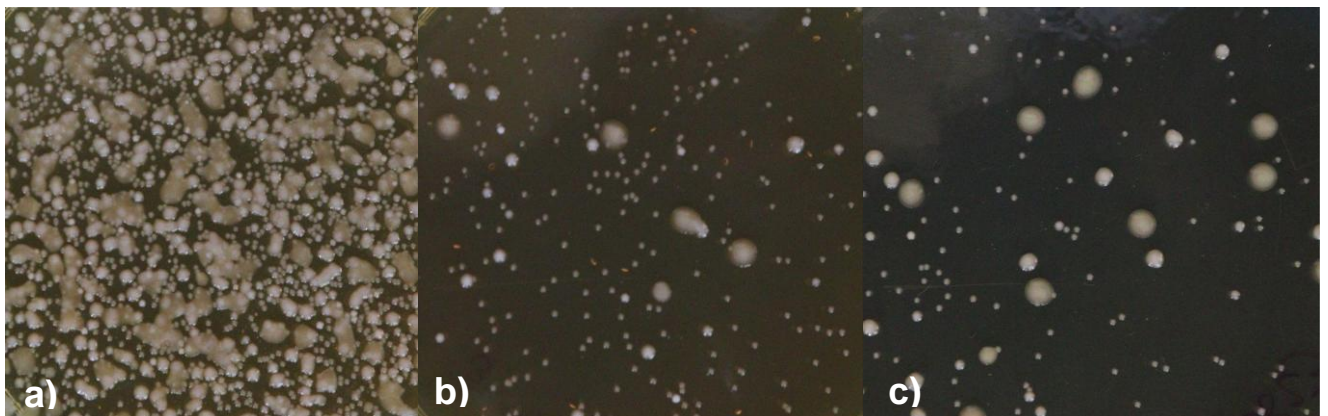


Figura 21. Placas de chile en medio soya incubadas a 27°C durante 24 horas; a) C_0 , b) $\frac{33}{100}$ de C_0 , c) $\frac{1}{10}$ de C_0

Con base en el crecimiento de ambos cultivos, se decidió utilizar el medio sólido de LB, debido a que se observó que, en las tres diluciones realizadas, se formó un mayor número de colonias con respecto a las observadas en el medio sólido de soya-triptona (Figura 21). Además, en el medio LB se observó una mayor diversidad en la morfología de las colonias microbianas que se formaron, lo que sugiere que usando este medio se logrará muestrear una mayor diversidad de microorganismos contra *E. coli*-GFP.

Para determinar el número de bacterias provenientes del chile que se encapsulan por microgel, se utilizó la tinta fluorescente BacLight Green. Esta tinta tiene la capacidad de marcar fluorescentemente a todas las bacterias presentes en la muestra, tanto viables como

no viables, por lo tanto, mediante microscopía es posible contar las bacterias presentes en cada microgel. La muestra teñida se llevó a una dilución $\frac{1}{2}$ de C_0 con una $DO_{630} = 0.164$, después se encapsuló y se tomaron fotografías (Figura 22) a tiempo de cero horas de incubación y 24 horas de incubación para comprobar el crecimiento bacteriano dentro de los microgeles.

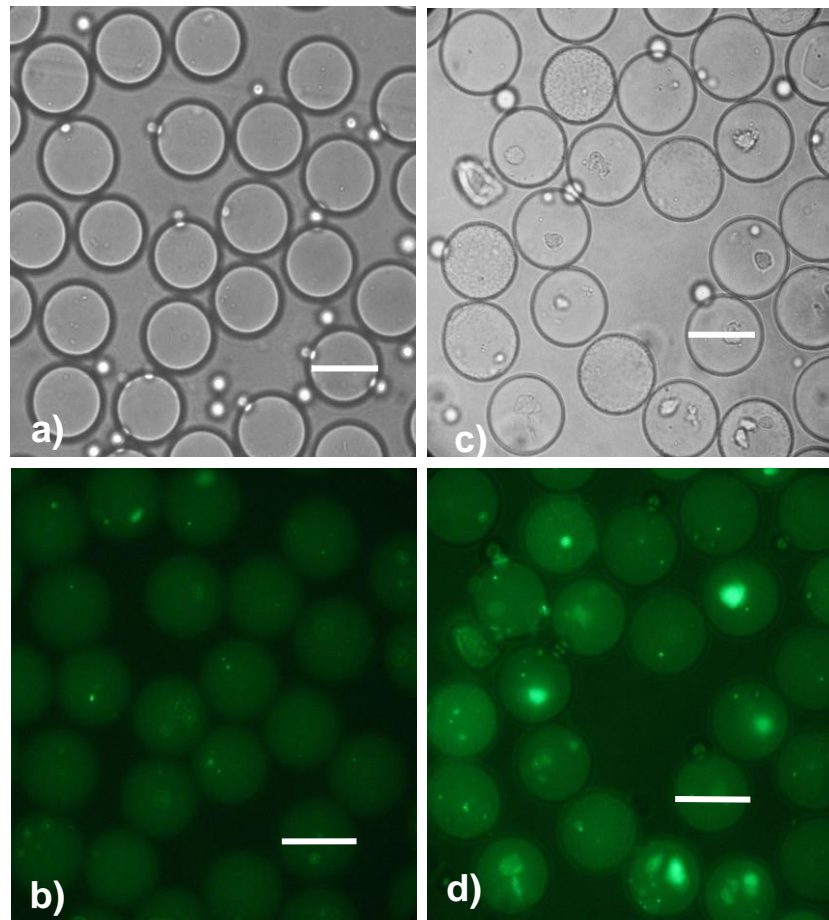


Figura 22. Tinción de microorganismos encapsulados aislados de chile poblano con BacLight Green. a) cero horas de incubación, imagen en campo claro; b) cero horas de incubación, imagen en fluorescencia c) 24 horas de incubación imagen en campo claro; d) 24 horas de incubación imagen en fluorescencia. Barra de escala de $25 \mu\text{m}$

Las fotografías anteriores demuestran el crecimiento de microcolonias bacterianas teñidas del chile poblano. Sin embargo, a las 24 horas algunas células no poseen una fluorescencia intensa. Esto puede deberse a que la tinta BacLight Green puede penetrar con diferente eficacia en las membranas celulares viéndose limitada en ciertos casos, por una menor permeabilidad de la membrana a este tinte o por una acumulación insuficiente del tinte^[34].

Para obtener la curva de calibración de λ contra DO_{630} para los microorganismos aislados de chile, se realizaron distintas suspensiones de células (ver Tabla 2) y se les

midieron sus densidades ópticas a 630 nm. Posteriormente, cada dilución se tiñó agregando 2.5 μL de BacLight Green. Después, se encapsuló en microgeles y se observó por microscopía de fluorescencia inmediatamente después de su formación (tiempo = 0 horas). Finalmente, se realizó el conteo de los microorganismos en cada gota. Los datos de la Figura 23 se ajustaron a la distribución Poisson (Ecuación 1) mediante el software Origin y a partir de este ajuste se obtuvieron los valores de lambda para cada una de las diluciones de microorganismos del chile que fueron utilizadas para encapsular en microgeles (Figura 23)

Tabla 2. Diluciones para microorganismos aislados de chile poblano

Dilución	Absorbancia DO_{630}	λ
C_0	0.122 ± 0.001	2.85
$\frac{1}{2} C_0$	0.071 ± 0.002	1.09
$1/10 C_0$	0.040 ± 0.001	0.47

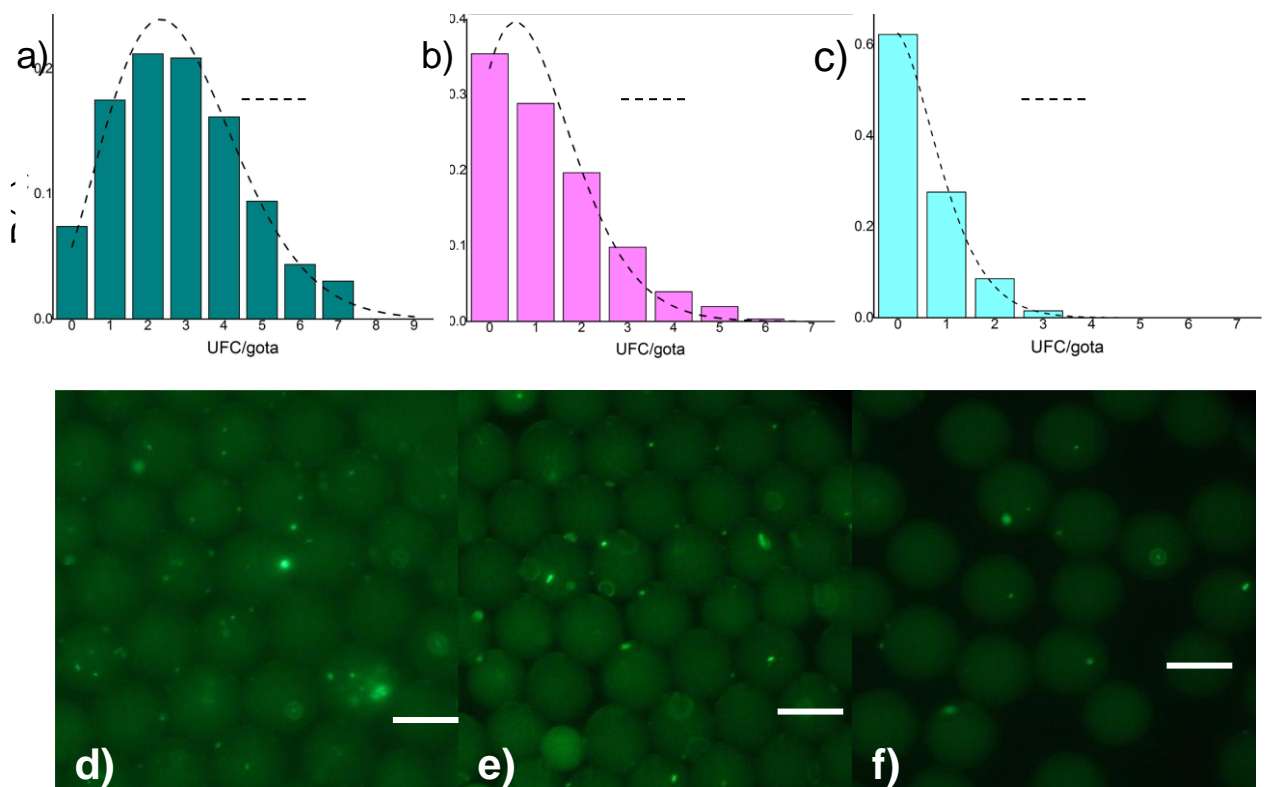


Figura 23. Las barras representan los datos experimentales del conteo de células dentro de cada microgel de cada dilución para microorganismos *E.coli*-GFP. Las líneas punteadas representan el ajuste de la función de Poisson obtenidas con el programa Origin. a),d) Muestra C_0 de 296 microgeles ; b),e) Dilución $\frac{1}{2} C_0$ de 309 microgeles; c),f) Dilución $1/10 C_0$ de 304 microgeles. Barra de escala de $25 \mu\text{m}$

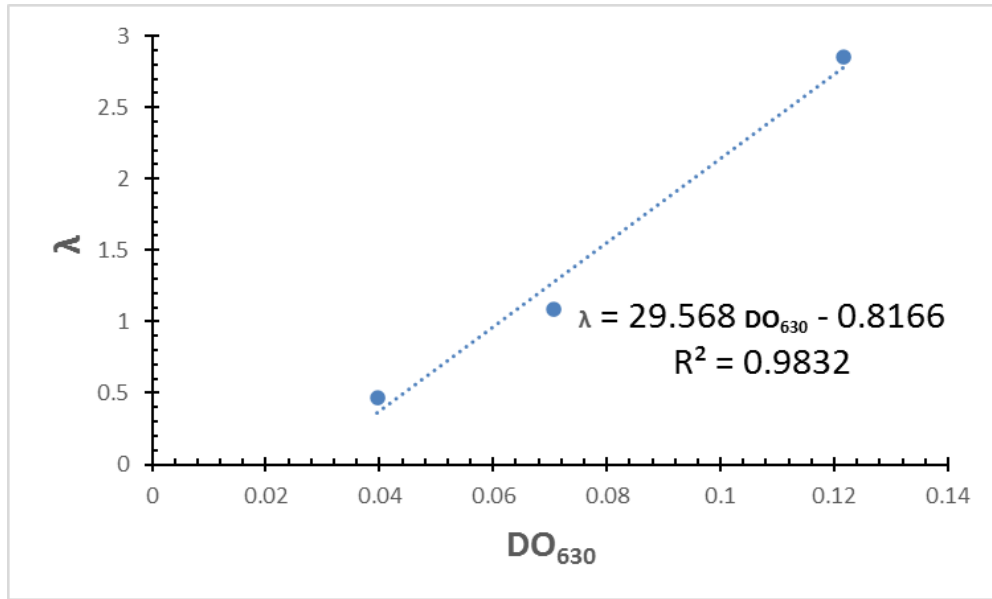


Figura 24. Diagrama de λ (CFU/gota) vs DO_{630} para microorganismos aislados del Chile.

El resultado es lineal y es lo esperado debido a que se pretende establecer una relación directamente proporcional como lo observado en la curva de calibración de *E.coli*-GFP. También, al ser una muestra diferente a *E.coli*-GFP, la pendiente se esperaba que fuera diferente y por ende se determinó experimentalmente.

Además de los experimentos descritos en los últimos párrafos, para evaluar el efecto de la tinta Backlight Green sobre el crecimiento microbiano dentro de microgeles se llevó a cabo el control de encapsulación de microorganismos de la muestra de Chile, esta vez sin teñir a los microorganismos en la muestra. Los microgeles cargados con estos microorganismos se incubaron durante 48 horas y entonces se analizaron mediante microscopía. Como se observa en la Figura 25 a pesar de la ausencia de la tinta, algunos de los microgeles cargados con microbios emiten una fluorescencia homogénea a través de todo el microgel. Esto podría deberse a que los microorganismos ahí encapsulados excretan moléculas que difunden en todo el microgel y provocan la fluorescencia completa del compartimento. En algunos pocos casos se observan microcolonias con una fluorescencia de baja intensidad, debido probablemente a la fluorescencia intrínseca de algún organismo del Chile encapsulado. Finalmente hay muchos otros microgeles encapsulando colonias no fluorescentes.

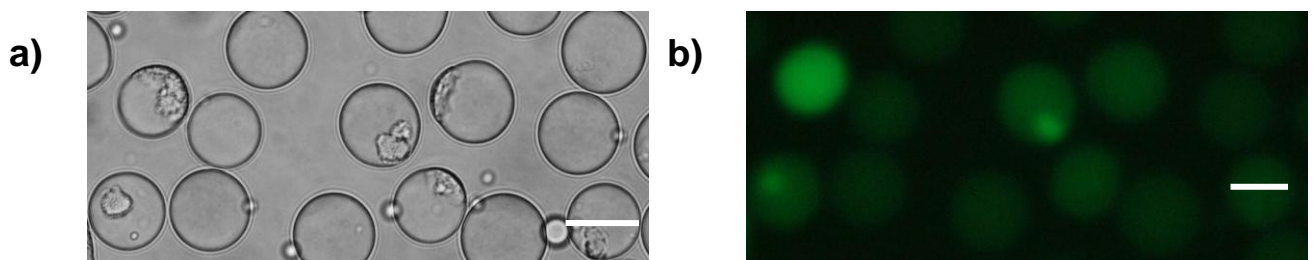


Figura 25. b) Campo claro con su correspondiente imagen b) en luz fluorescente de microgeles con microorganismos aislados del chile. Barra de escala 25 μm

4.4.- Primera co-encapsulación de *E.coli*-GFP con microorganismos aislados de chile

4.4.1.- Visualización en microscopio

De acuerdo con las curvas de calibración presentadas en las secciones anteriores, se realizaron diluciones de *E.coli*-GFP con una $\text{DO}_{630} = 0.130$ ($\text{Lambda} = 5$) y de los microorganismos aislados de chile con una $\text{DO}_{630} = 0.029$. ($\text{Lambda} = 0.3$). Estas suspensiones se mezclaron en proporciones de volúmenes iguales y se resuspendieron en medio líquido con agarosa de acuerdo a lo descrito en la sección 3.6 de la metodología. La suspensión resultante se emulsionó en microgeles y después de 48 horas de incubación a 27°C se tomaron fotografías para comprobar el crecimiento microbiano y los eventos de co-encapsulación. En la Figura 26 se muestran las fotografías en campo claro y fluorescencia de dos ejemplos de co-encapsulación de microcolonias características de *E. coli*-GFP junto con microcolonias no fluorescentes provenientes del chile. En estos dos ejemplos es muy posible que el microorganismo no tenga una capacidad antagonista pues logra crecer junto a *E. coli*-GFP. Sin embargo, también se logran observar algunos ejemplos donde predomina el crecimiento de las microcolonias no fluorescentes sobre *E. coli*-GFP (Flecha azul en la figura 26). Finalmente, en toda la muestra se observa la presencia mayoritaria de microgeles con solo *E.coli*-GFP que se distinguen por su fluorescencia (Flecha amarilla en la figura 26).

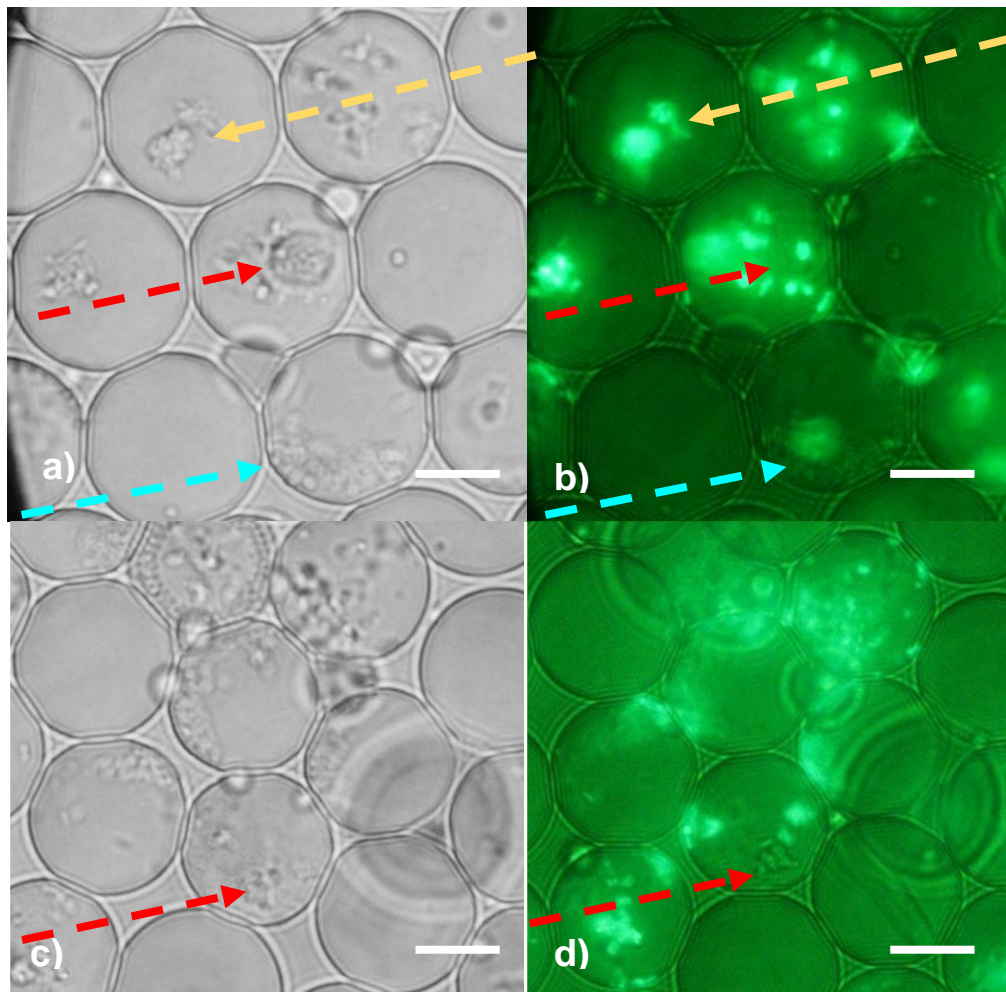


Figura 26. Fotografías de co-encapsulación después de 48 horas de incubación a)-b) primera fotografía en campo claro demostrativa y su respectiva fluorescencia. c)-d) segunda fotografía en campo claro demostrativa y su respectiva fluorescencia. Barra de escala $10\mu\text{m}$. Las flechas rojas señalan la presencia de microorganismos aislados de Chile junto con *E.coli*-GFP dentro de los microgeles. Flecha azul ejemplo donde predomina el crecimiento de las microcolonias no fluorescentes sobre *E. coli*-GFP. Flecha amarilla microgeles con solo *E.coli*-GFP que se distinguen por su fluorescencia.

4.4.2.- Análisis y selección de microgeles control

Para seleccionar microgeles que contengan microorganismos inhibidores de *E.coli*-GFP utilizando el equipo FACS, primero hay que realizar el análisis en FACS de tres diferentes muestras de microgeles incubados durante 48 h a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$: vacíos; con solamente *E.coli*-GFP y con solo microorganismos provenientes del Chile.

a) Análisis mediante FACS de microgeles vacíos

Todas las partículas analizadas mediante FACS pueden ser discriminadas de acuerdo a su tamaño (Forward Scatter, FSC), complejidad (Side Scatter, SSC) y su intensidad de fluorescencia (FL). Comúnmente es posible combinar dos de estas variables en un gráfico bidimensional. En esta tesis se correlacionó el parámetro de SSC contra la intensidad de fluorescencia dado que las diferentes poblaciones de microgeles se logran diferenciar de mejor manera mediante esta combinación. Para observar otras combinaciones entre las señales de las variables antes mencionadas se debe referir al Anexo III.

El control de microgeles vacíos sirve para diferenciarlos de los microgeles de la muestra que no tienen ningún organismo, de aquellos microgeles que se encuentran ocupados por microcolonias de cualquier microorganismo. Analizando el control de microgeles vacíos en FACS se obtuvo el gráfico de la Figura 27-a con las variables SSC vs FSC. El cual muestra una región rectangular señalada en rojo, correspondiente a pequeños fragmentos de microgeles de agarosa formados por la ruptura de una fracción de estos que se denominan *debris* (detritos en español). Estas partículas deben excluirse del análisis posterior de los microgeles, ya que no determinan alguna información importante para la obtención de microorganismos antagonistas. Para una discusión más amplia al respecto ver el Anexo II.

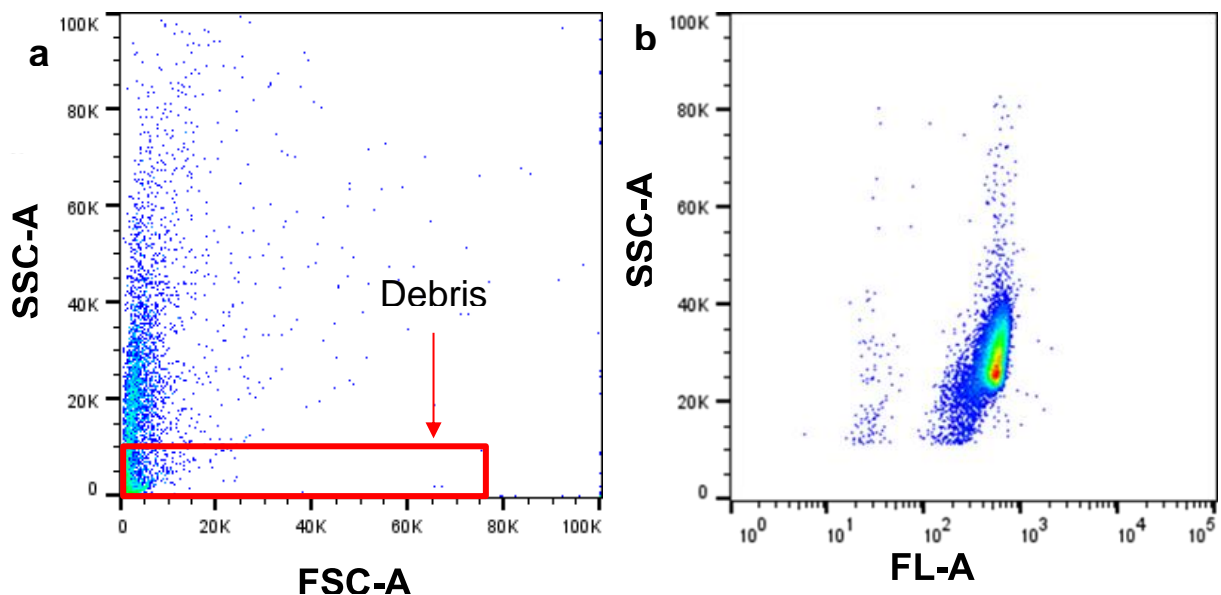


Figura 27. a) Gráfico de SSC vs FSC; b) SSC vs FL obtenido de FACS del análisis de microgeles vacíos.

Después de eliminar los debrís se grafican el resto de las señales con las variables SSC vs Fluorescencia (FL) Figura 27-b. En dicha figura los microgeles vacíos se encuentran mayoritariamente entre los 10 y 40 K en el eje “y” entre los 10^2 y 10^3 en el eje “x”.

b) Análisis independiente con FACS de microgeles con *E.coli*-GFP y microgeles con microorganismos aislados del chile

Se analizó por separado el control de microgeles cargados de *E.coli*-GFP ($\lambda= 5$) (Figura 28-a) y el control con microgeles cargados con microorganismos aislados de chile ($\lambda= 0.3$) Figura 28-b).

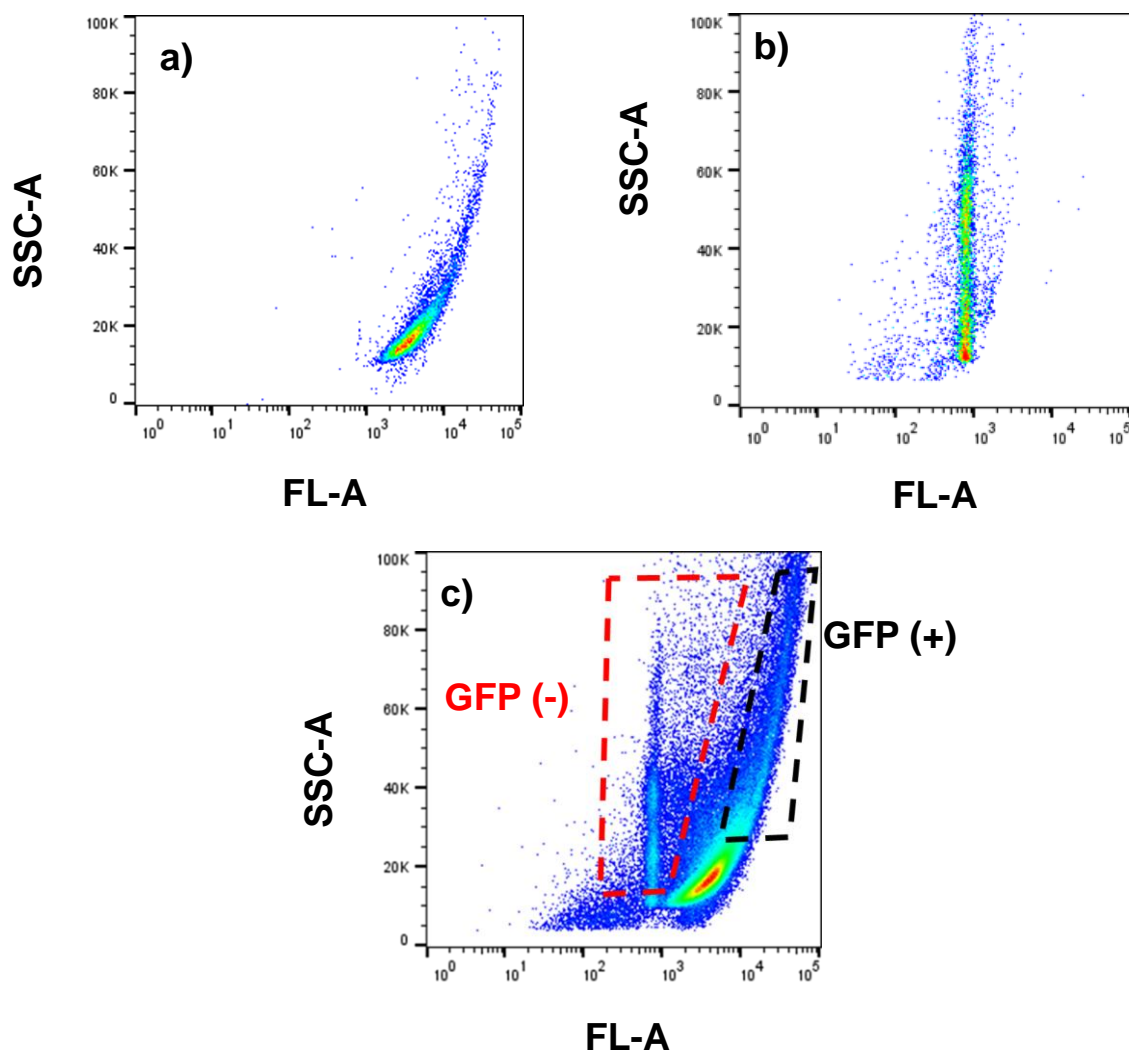


Figura 28. Gráficos obtenidos en el equipo de FACS después del análisis de: a) microgeles con *E. coli*- GFP; b) microgeles con microorganismos provenientes del chile y c) microgeles que co-encapsulan *E. coli*- GFP y microorganismos provenientes del chile.

En el análisis de los microgeles cargados con *E. coli*-GFP se puede observar que en el gráfico de SSC contra FL, los valores de fluorescencia se encuentran entre 10^3 y 10^5 . Además, se observa un barrido de señales a lo largo del eje vertical de SSC, dado que al incrementar los valores en Y aumenta la complejidad dentro del microgel, lo cual, quiere decir que en los microgeles se encuentran diferentes tamaños de microcolonias para dicha muestra. Por lo tanto, los microgeles con mayor complejidad presentan mayor fluorescencia, pues mientras más grande sea la colonia encapsulada, mayor es su intensidad de fluorescencia. Finalmente, en este gráfico se observa que no hay señales de microgeles vacíos.

Para los microgeles cargados con microorganismos aislados del Chile, las señales se encuentran entre 10^2 y 10^3 en el eje de la fluorescencia y entre los 10 y 100 K en SSC. La intensidad de fluorescencia de estos microgeles es significativamente menor a la observada para microgeles cargados con *E. coli*-GFP, lo cual es concordante con el análisis por microscopía. Esto permite que mezclas de microgeles cargados exclusivamente con *E. coli*-GFP o exclusivamente con microorganismos del Chile, pudieran ser separados fácilmente por el equipo FACS. Por otro lado, en estos microgeles sí se observa un traslape entre vacíos (señales entre 10 y 40 K) y ocupados por microorganismos del Chile (superiores a los 40 K). Debido a que la λ es 0.3 se esperaría tener un 74.1% de microgeles vacíos.

4.4.3.-Análisis y selección de microorganismos co-encapsulados en microgeles utilizando FACS.

Para la muestra de microgeles en los que se co-encapsularon e incubaron bacterias de *E. coli*-GFP ($\lambda = 5$) junto con los microorganismos provenientes del Chile poblano ($\lambda = 0.3$) se obtuvo el gráfico de SSC contra intensidad de fluorescencia que se muestra en la Figura 28-C. Se observa que hay un conjunto de señales intensas en forma de “jota” en la misma zona que se detectaron los microgeles con solo *E. coli*-GFP (fluorescencia entre 10^3 y 10^5). Esto debido a que, como se mencionó anteriormente, el 74.1% de los microgeles tendrán la cepa fluorescente sin ningún otro tipo de microorganismo. Por otro lado, el 22.1% logran co-encapsular una célula proveniente del Chile con una o más células de *E. coli*-GFP. Por lo tanto, las señales que se observan alineadas verticalmente entre 10^2 y 10^3 deben de corresponder principalmente a aquellos microgeles cargados inicialmente con *E. coli*-GFP y alguno de los microorganismos antagonistas provenientes del Chile. Se presume que estos microorganismos logran impedir el crecimiento de *E. coli*-GFP y por lo tanto son microgeles sin fluorescencia. Además, se observan múltiples señales dispersas entre los dos conjuntos mencionados anteriormente, cuyas fluorescencias son menores que las del conjunto de *E. coli*-GFP, pero mayores a la zona donde solo hay microgeles sin fluorescencia. Estos geles

también podrían corresponder a eventos en donde los microorganismos provenientes del Chile, ejercen una actividad antagonista moderada que no permite un crecimiento adecuado de *E. coli*-GFP, pero que no elimina completamente a la cepa fluorescente.

A partir de este análisis se establecieron dos regiones o zonas de interés. La primera se denominó GFP (+) y sirvió para seleccionar a la población de microgeles cargados con solo microcolonias de *E.coli*-GFP. Esta región no abarcó el total de las señales de la “jota” debido a que el gran número de estas señales llenaba rápidamente los tubos de recolección de los microgeles seleccionados. La segunda región se denominó GFP (-) y es donde se cree que se encuentran aquellos microgeles cargados con posibles microorganismos antagonistas y microgeles vacíos, Figura 28-c. Mediante esta estrategia de selección, el equipo FACS llevó a cabo la clasificación, separación y recuperación de estas poblaciones.

La Tabla 3. muestra la cantidad de microgeles (hits) clasificados dentro de las regiones GFP (+) y GFP (-). Los hits totales corresponden a aquellos que se registran en toda la ventana del software.

Tabla 3. Número de hits recuperados mediante el uso de FACS

Totales	Región	Número de hits recuperados
354,470	GFP (+)	14680
	GFP(-)	23900

Una vez separados los microgeles en dos regiones, se procedió a inocular una muestra de cada grupo en un medio de cultivo sólido.

4.4.4.- Sembrado de los microgeles seleccionados en cada zona

Para cada una de las poblaciones recuperadas, GFP (+) y GFP (-), se realizaron diluciones 1/10 y las suspensiones obtenidas se utilizaron para inocular 20 µL en platos de agar. Después, los platos se incubaron durante 48 horas a 27°C, obteniendo las fotografías que se muestran en la Figura 29. En las placas inoculadas con los microgeles provenientes de la región GFP (+) se observan colonias de microorganismos con al menos tres morfologías

diferentes Figura 29-a. Esto se podría explicar debido a que existen microgeles donde se encapsuló *E.coli*-GFP junto con algún microorganismo del chile sin actividad antagonista y que permitió el crecimiento normal de ambas cepas (*E.coli*-GFP y del chile) y por lo tanto tenían fluorescencia y sus señales se encontraban en GFP (+). En la placa inoculada con los microgeles seleccionados dentro de GFP (-) se observa una mayor diversidad de microorganismos en las colonias formadas, Figura 29-b.

Para tener más información de las colonias obtenidas en cada placa, estas se observaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando un objetivo de 2.5x. Como se observa en la Figura 30 inciso a) correspondiente a colonias provenientes de los microgeles recuperados de GFP (+), las colonias de menor tamaño presentan fluorescencia y son características de *E. coli*-GFP. Sin embargo, las colonias de mayor tamaño no presentaron fluorescencia ni tampoco halos de inhibición contra *E. coli*-GFP, por lo que se refuerza la idea de que las cepas podrían provenir de microgeles en los que ambas cepas crecieron sin inhibirse. En la figura 30-b se muestran algunas colonias provenientes de los microgeles recuperados de GFP(-), ninguna de estas colonias presenta fluorescencia. Por lo tanto, se puede concluir que el equipo de FACS logra separar eficientemente aquellos microgeles cargados con microorganismos no fluorescentes de aquellos cargados con *E. coli*-GFP. Para saber si son microorganismos antagonistas a *E. coli*-GFP se hicieron las pruebas que se detallan a continuación.

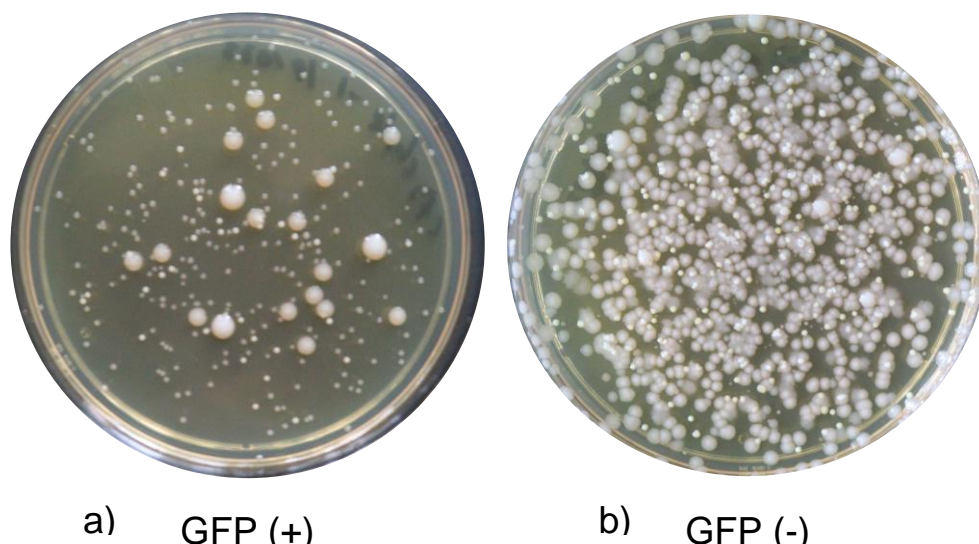


Figura 29. Colonias obtenidas después de sembrar los microgeles separados por FACS; a) Dilución 1/10 de C_0 de GFP(+); b) Dilución 1/10 de C_0 de GFP(-)

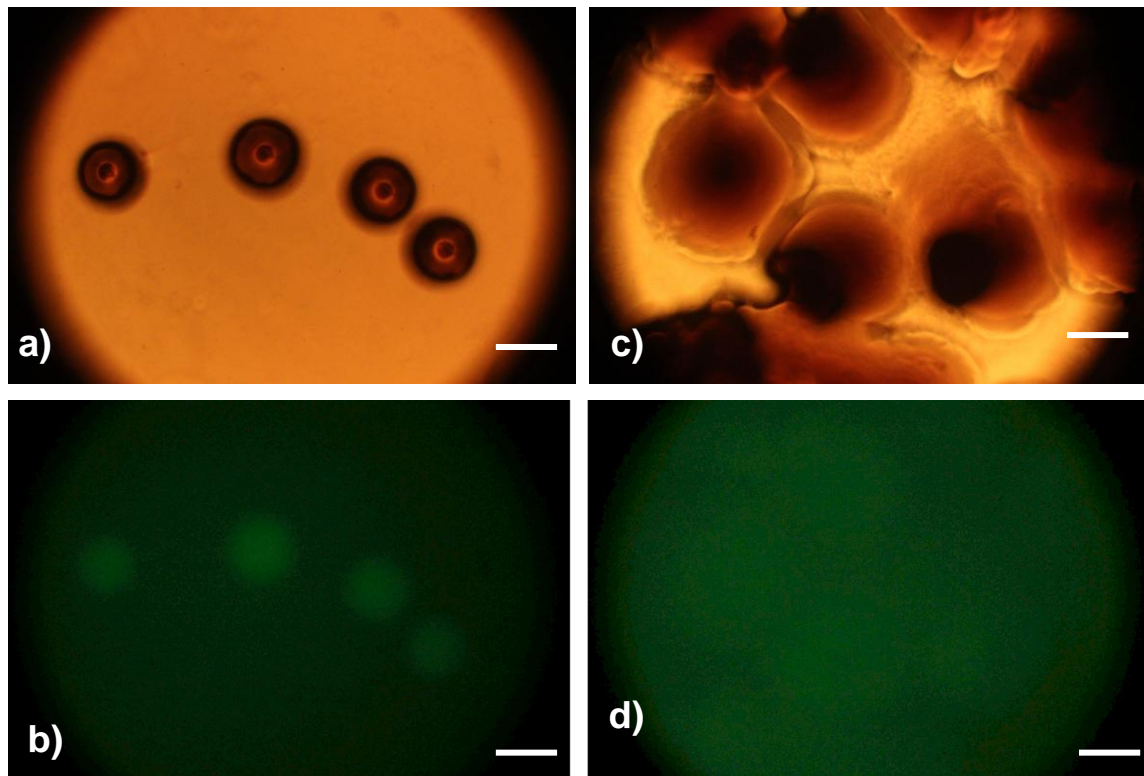


Figura 30. Fotografías de platos de medio sólido LB a) Dilución 1/10 de C_0 de GFP(+); b) Fotografías en fluorescencia de a) ; c) Fotografías de platos de medio sólido LB Dilución 1/10 de C_0 de GFP(-); d) Fotografías en fluorescencia de c). Barra de escala de $100 \mu m$

4.4.5.- Ensayos de inhibición

A partir de las colonias obtenidas de GFP (-) se seleccionaron ocho colonias para realizar un ensayo de antagonismo contra *E. coli*-GFP con la técnica Spot on law. (Sección 3.13)

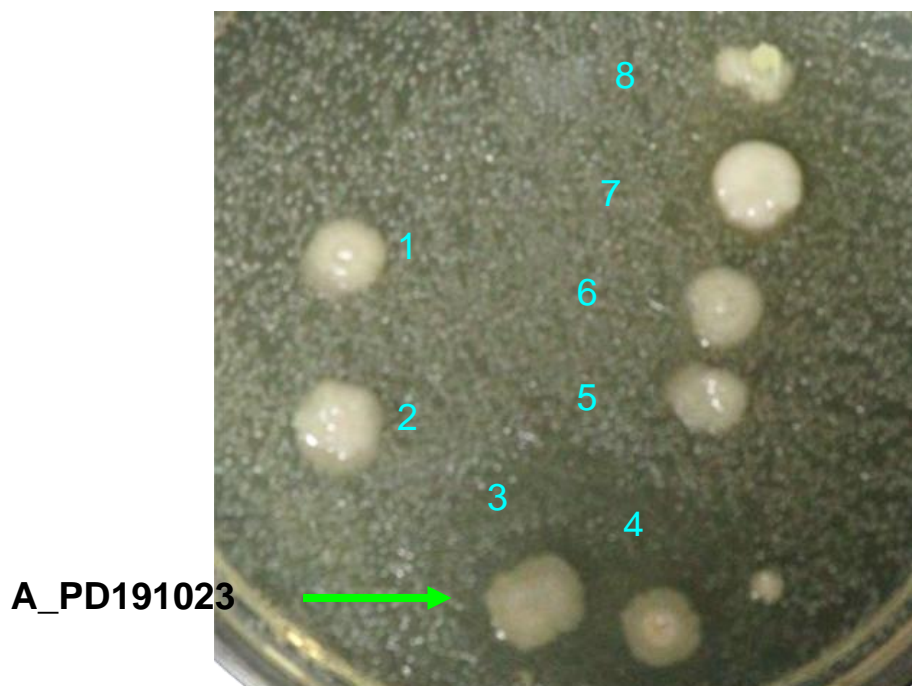


Figura 31. Ensayo de antagonismo por enfrentamiento directo utilizando un césped de *E.coli*-GFP dilución 1/10 de C_0 y ocho cepas aisladas de la selección por FACS, cada una con morfología diferente.

De las ocho colonias seleccionadas, sólo en una se observó inhibición, por lo cual se aisló y etiquetó para su posterior caracterización. Con base en este resultado, se obtuvo un porcentaje de microorganismos inhibidores del 12.5 %. Sin embargo, al localizarse en una región no fluorescente se esperaba que todos los microorganismos tuvieran actividad antagonista. Entre los factores que pueden causar se encuentran: algunos microorganismos del Chile pueden crecer más rápido que *E.coli*-GFP y debido a que los nutrientes en la microgota se encuentran limitados, si los aprovechan de manera más rápida, pueden inhibir o limitar el crecimiento de *E.coli*-GFP sin la necesidad de excretar metabolitos que sean antibióticos. Por otra parte, al analizar las probabilidades de qué organismos se encapsula dentro de cada microgel, el porcentaje de que una bacteria de microorganismos de Chile quede sin ninguna de *E.coli*-GFP es del 0.17% (0.15% para 1 célula de Chile + 0.02% para 2 células, ambos casos sin *E. coli*-GFP). Si se analizaron 354,470 microgeles (Tabla 3), el 0.17% corresponden a 603 microgeles que también se seleccionarían en GFP (-) y podrían ser organismos no inhibidores. Finalmente, es importante mencionar que en este ensayo se seleccionaron ocho colonias con diferentes morfologías, pero podría haber diferentes especies con morfologías muy similares y que no fueron seleccionadas.

Se decidió repetir el experimento dado que al tratarse de una muestra ambiental podría poseer una enorme diversidad de microorganismos. Además, en los gráficos de FACS se observaron zonas que pueden recuperarse y sería importante indagar en ellas para analizar si los microorganismos con capacidad antagonista se encuentran en alguna de estas otras regiones y que no fue considerada en este primer ensayo.

4.5.- Segunda co-encapsulación de *E.coli*-GFP con microorganismos aislados de Chile

Se realizó por segunda vez el experimento de co-encapsulación dentro de microgeles de células de *E. coli*-GFP junto con los microorganismos provenientes de un Chile poblano en descomposición. Los microorganismos se co-cultivaron dentro de los microgeles y después de 48 h de incubación a 27 °C los microgeles se analizaron por microscopía. También, se encapsularon controles de *E.coli*-GFP ($DO_{630} = 0.130$) y microorganismos aislados de Chile ($DO_{630} = 0.029$) (Figura 32) por separado. El análisis por microscopía de los tres tipos de microgeles antes de su estudio en FACS demostró el crecimiento de microorganismos

después de las 48 horas de incubación (Figura 32). En algunas fotografías se presenta un crecimiento notorio de *E.coli*-GFP distinguido por su fluorescencia, flecha verde inciso c de la Figura 32, mientras que en otras no fluórese de la misma manera, por lo cual se presume que hay inhibición, flecha roja, inciso c de la Figura 32.

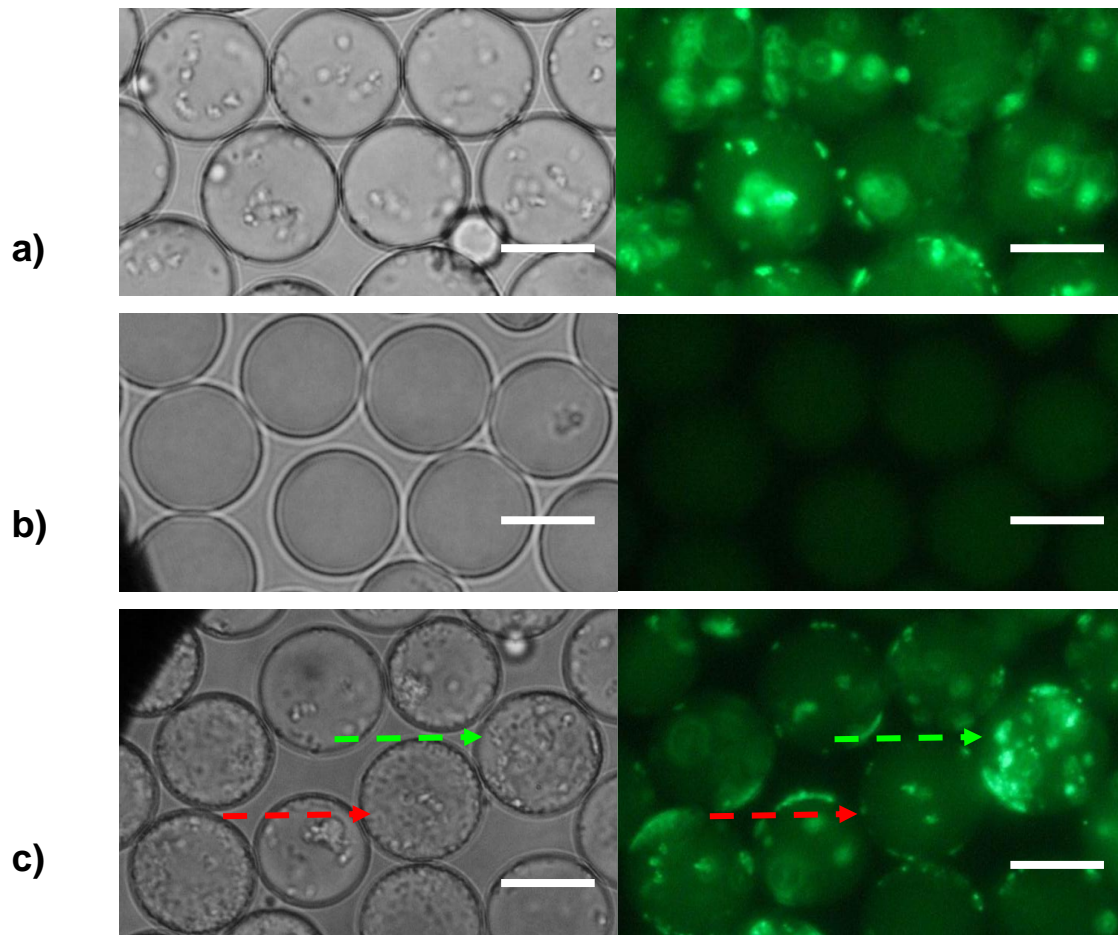


Figura 32. a) Campo claro con su correspondiente imagen en luz fluorescente de microgeles con sólo *E. coli*-GFP y 48 h de incubación. b) Campo claro con su correspondiente imagen en luz fluorescente de microgeles con microorganismos aislados del Chile y 48 h de incubación. c) fotografías de co-encapsulación después de 48 horas de incubación. Barra de escala $10\mu\text{m}$. La flecha roja muestra rugosidad dentro de microgel donde existe un microorganismo antagonista, en la flecha verde se observa un crecimiento normal sin antagonistas.

Posteriormente, se realizó el análisis de cada una de las diferentes muestras de microgeles por FACS (Figura 33-a; 33-B y 33-c).

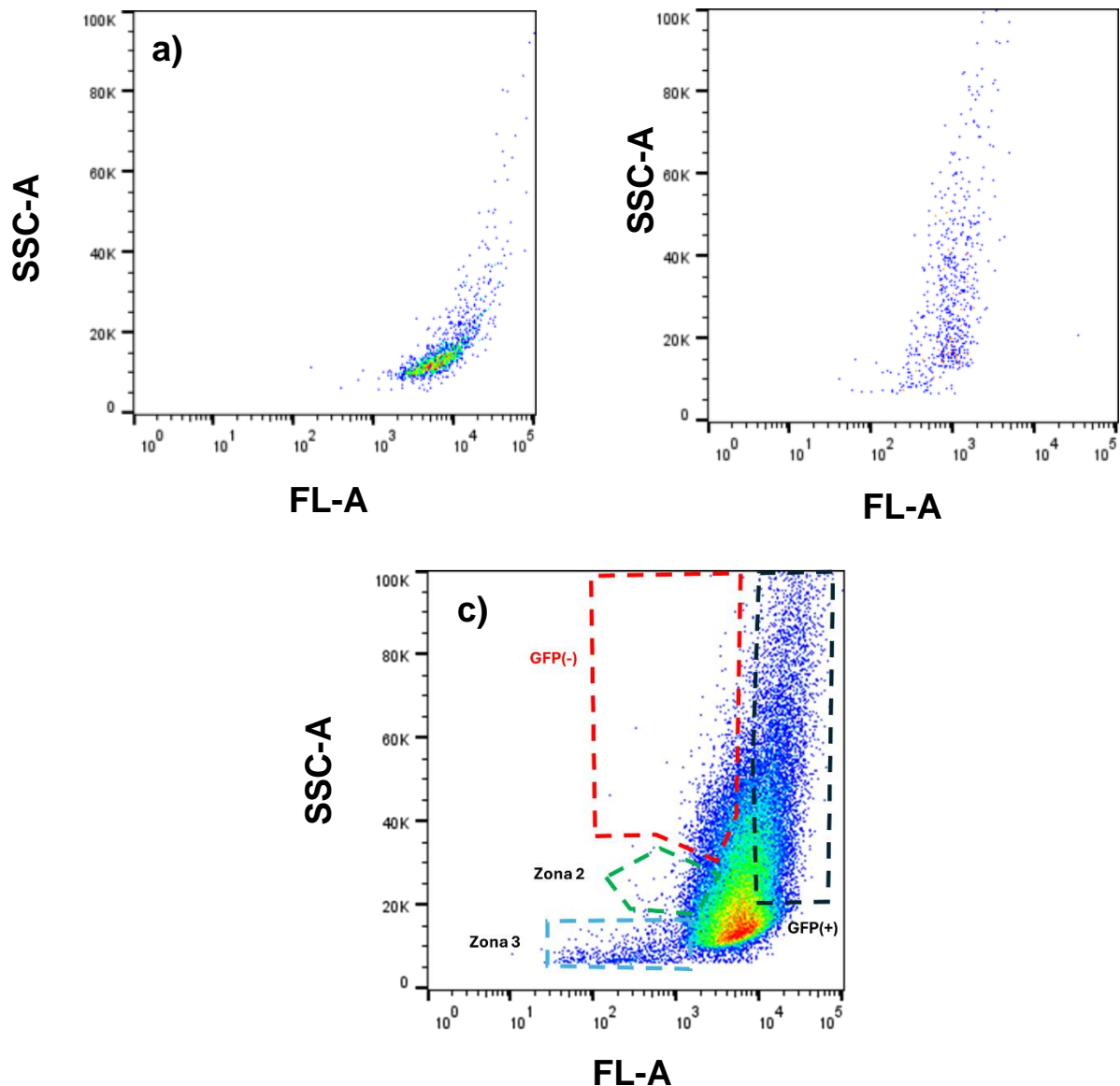


Figura 33. Gráfico obtenido de FACS del análisis de microgeles a) *E. Coli*- GFP; b) microorganismos aislados del chile; c) microgeles de la co-encapsulación.

Al analizar la Figura 33-c (co-encapsulación), se observa que las señales no se separaron en las dos regiones definidas como GFP(+) y GFP (-) que sí se mostraron en la primera co-encapsulación. Por lo cual, se establecieron 3 zonas diferentes para analizar la presencia de microorganismos antagonistas en cada una de ellas. En la Tabla 4 se muestran el número de microgeles recuperados de cada región.

Tabla 4. Número de microgeles (hits) recuperados mediante el uso de FACS.

Región	Número de hits recuperados
Zona 2	5010
Zona 3	2570
GFP(-)	2440
GFP(+)	8130

4.5.1.- Sembrado de cada zona

Se realizaron diluciones 1/10 de cada muestra recolectada y de manera independiente se inocularon 20 μ L de cada dilución en platos de agar. Después de 48 horas a 27°C, se evaluó el crecimiento microbiano sobre las placas de agar observando colonias con morfologías diferentes en las tres regiones (Figura 34) y ninguna con fluorescencia. Para la región de GFP(+) se observaron colonias con morfologías idénticas entre ellas y con fluorescencia (Datos no mostrados).

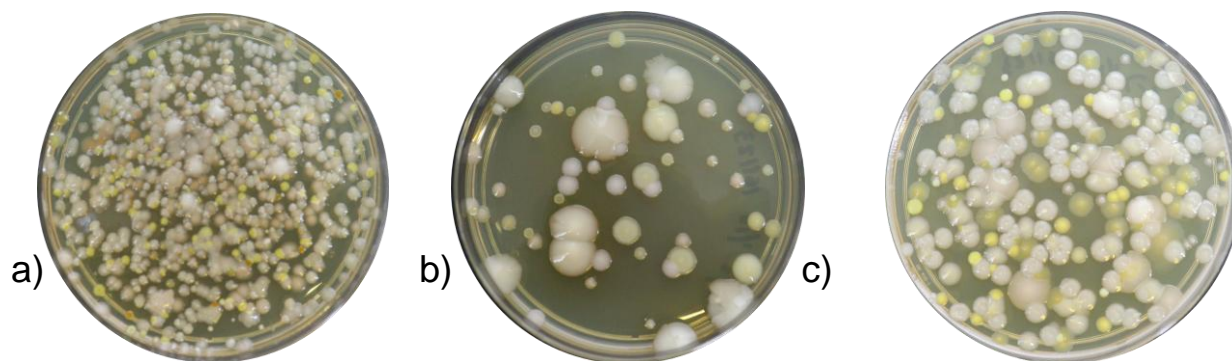


Figura 34. Zonas sembradas de los obtenido de FACS; a) Dilución 1/10 de C_0 de Zona 2; b) Dilución 1/10 de C_0 de la Zona 3; c) Dilución 1/10 de C_0 de GFP(-).

4.5.2.- Ensayos de inhibición

De los platos incubados en la Figura 34, se aislaron colonias a las cuales se les veía diferente morfología. Dichas colonias fueron utilizadas para inocular placas de agar cuya superficie había sido previamente sembrada de forma masiva con *E. coli*-GFP a dos diferentes densidades (20 μ L de un césped de *E.coli*-GFP dilución 1/10 de C_0 y 20 μ L de un césped de *E.coli*-GFP dilución 1/100 de C_0). Para observar posibles halos de inhibición, zonas claras

que se forman alrededor de un agente antimicrobiano, se incubaron las placas durante 48 horas a 27°C y su crecimiento se observa en la Figura 35. En la Tabla 5. Se coloca el número de cepas ensayadas de cada región.

Tabla 5. Cepas que presentaron inhibición de cada región

Región	Número de cepas aisladas para ensayo	Número de cepas inhibitorias	Nombres
Zona 2	4	2	1_PD161123 2_PD161123
Zona 3	5	2	3_PD161123 4_PD161123
GFP(-)	7	5	5_PD161123 6_PD161123 7_PD161123 8_PD161123 9_PD161123

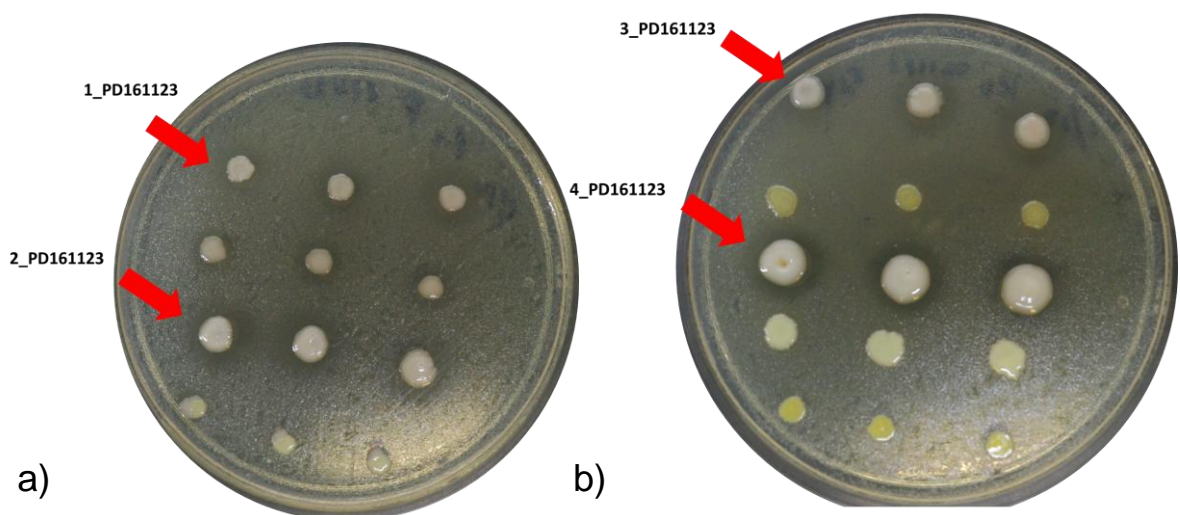


Figura 35. a) Zona 2 en un césped de *E.coli*-GFP 1/10 de C_0 ; b) Zona 3 Césped de *E.coli*-GFP 1/10 de C_0

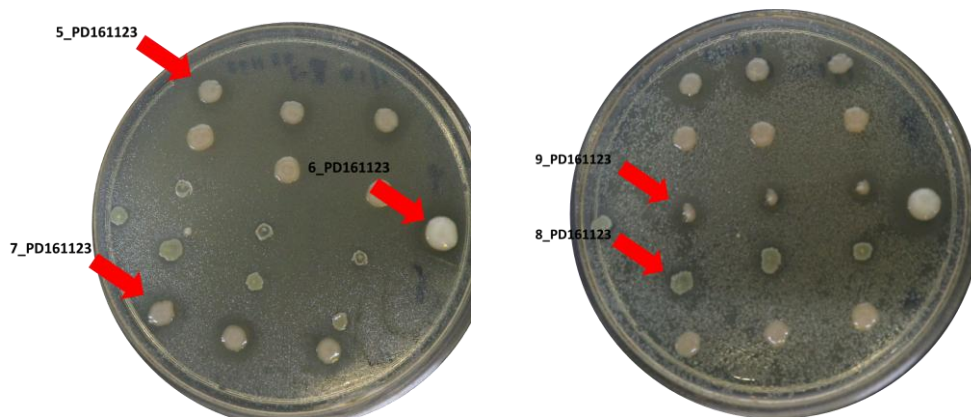


Figura 36. GFP (-) en un césped de *E.coli*-GFP; a) Césped de *E.coli*-GFP 1/10 de C_0 ; b) Césped de *E.coli*-GFP 1/100 de C_0

Con base en los halos de inhibición se concluyó que el porcentaje de colonias para cada región separada con actividad antagonista es del 50% para la Zona 2, 40% para la Zona 3 y 71% para la Zona de GFP(-).

En la placa de la Zona de GFP (-), las cepas 9_PD161123 y 8_PD161123 solo inhibieron a un concentración diez veces menor de césped de *E.coli*-GFP, mientras que 7_PD261123 no inhibe a menor concentración. Esto pudiera deberse a que al aislar las colonias de la Figura 34 c) Dilución 1/10 de C_0 de GFP(-) se hubieran mezclado dos colonias y alguna de ellas sí tenía capacidad inhibidora. Para corroborar sus inhibiciones se repitió el ensayo para estas tres cepas (Figura 37). Concluyendo que 8_PD161123 no tiene inhibición.



Figura 37. Cepas en césped de *E.coli*-GFP 1/100 de C_0 por triplicado.

Comparando los gráficos de SSC contra FL del primer y segundo ensayo se observó que en ambas figuras se encuentra la señal de microgeles cargados con *E. coli*-GFP entre 10^3 a 10^5 en el eje de fluorescencia. Sin embargo, en el segundo ensayo no se observa definida la zona que anteriormente se nombró como GFP(-) (señal orientada verticalmente entre 10^2 y 10^3 en el primer ensayo). Por el contrario, se observó que aumentó la señal “intermedia” que estaba

entre las zonas de GFP(+) y GFP(-) de manera que en el segundo experimento hay un continuo de puntos desde la "J" hacia la izquierda. Estos microgeles podrían corresponder a eventos en donde los microorganismos provenientes del Chile ejercen una actividad antagonista moderada que no permite un crecimiento adecuado de *E. coli*-GFP, de manera que tienen menor fluorescencia que los controles, empero, no elimina completamente a la cepa fluorescente y no se observa la señal en valores de 10^2 y 10^3 . Además, al analizar las fotografías por microscopía, se observó una rugosidad diferente en los microgeles con co-encapsulación. En algunos de ellos, *E. coli*-GFP no mostraba la misma fluorescencia que al estar sola. Por lo cual, estos microgeles podrían corresponder a aquellas señales entre 30 a 80K y 10^3 a 10^4 , respectivamente.

En el segundo ensayo se obtuvieron más cepas inhibidoras que en el primero, esto puede ser debido a una mejor homogeneización de la muestra de microorganismos del Chile aislados antes de encapsularse. Por otro lado, la selección por morfologías es un factor importante al momento de aislar los microorganismos a macroescala ya que a pesar de verse una morfología similar, la bacteria puede ser diferente, por lo cual en el segundo caso se escogieron más bacterias aunque se repitiera la apariencia de la morfología. La zona de GFP (-) fue la que mayores cepas inhibidoras tenía y sería la preferida para indagar en otros experimentos. No obstante, en las zonas 2 y 3, con bajos valores de SSC, también se recuperaron cepas antagonistas y valdría la pena en un futuro hacer más experimentos para explicar mejor las diferencias entre estas señales.

4.6.- Ensayo de enriquecimiento de cepas inhibidoras

Con la idea de conseguir una metodología que permitiera recuperar porcentajes mayores de cepas inhibidoras de *E. coli*-GFP en los platos de agar, se realizaron dos ensayos consecutivos de co-encapsulación en microgeles y selección por FACS.

Para comenzar el ensayo se procedió como la metodología propuesta anteriormente utilizando los dos controles de microgeles habituales: los primeros encapsulaban *E. coli*-GFP y los segundos microorganismos aislados de Chile de manera independiente. Después, se co-encapsularon los dos tipos de microorganismos. Se obtuvieron las fotografías de la Figura 38 después de 48 horas de incubación a 27°C. Posterior a su crecimiento en las microgotas se realizó la clasificación utilizando FACS con las ventanas de la Figura 39. inciso C)

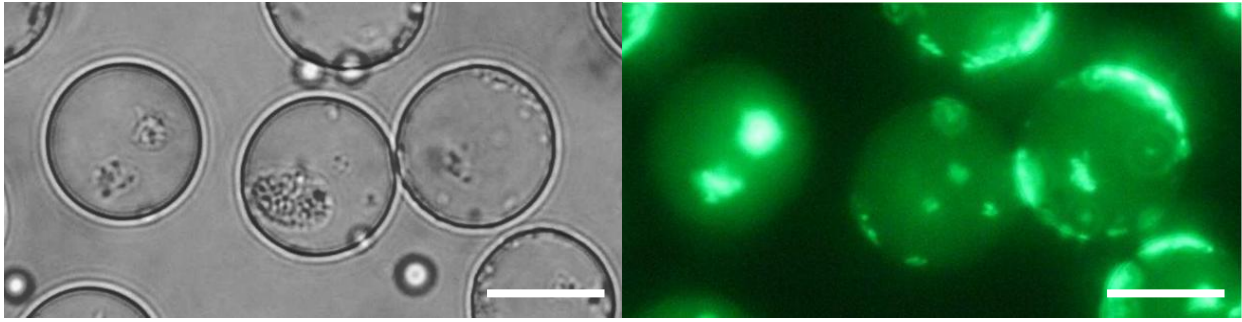


Figura 38. Campo claro con su correspondiente imagen en luz fluorescente de microgeles co-encapsulados en el primer ciclo. Barra de escala $10\mu\text{m}$

4.6.1.- Primer ciclo

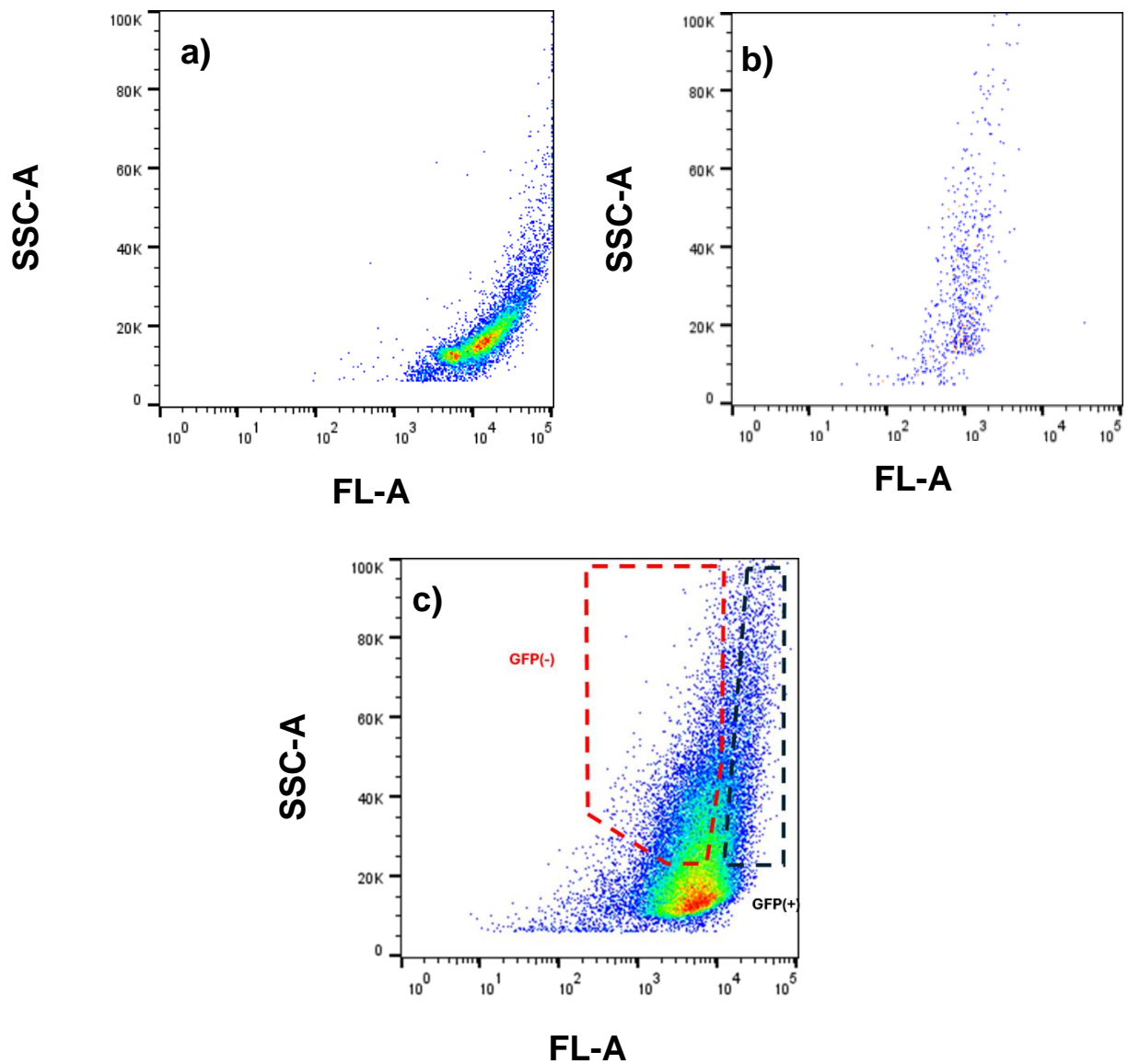


Figura 39. Gráfico obtenido de FACS del análisis de microgeles del primer ciclo; a) *E. Coli*-GFP; b) microorganismos aislados de Chile; c) análisis de microgeles de la co-encapsulación

Los microgeles recuperados de la región GFP (-) fueron utilizados para inocular 2 mL de medio líquido LB que se incubó a 27°C durante 48 horas y favorecer así el crecimiento de los microorganismos seleccionados. Después, los microorganismos que crecieron, fueron utilizados para llevar a cabo una segunda co-encapsulación ($\lambda= 0.3$), junto con *E.coli*-GFP ($\lambda= 5$) dentro de microgeles y fueron incubados durante 24 horas a 27°C. Finalmente, se realizó el procedimiento para analizar y clasificar los microgeles usando el equipo FACS utilizando los controles de encapsulaciones independientes (Figura 39-a y b). Para esta segunda ronda de selección, se colocaron las ventanas que se muestran en la Figura 39. inciso c). En la Tabla 6 se muestra el número total de partículas analizadas con el equipo de FACS en cada ciclo, así como el porcentaje que fue seleccionado dentro de la ventana GFP (-).

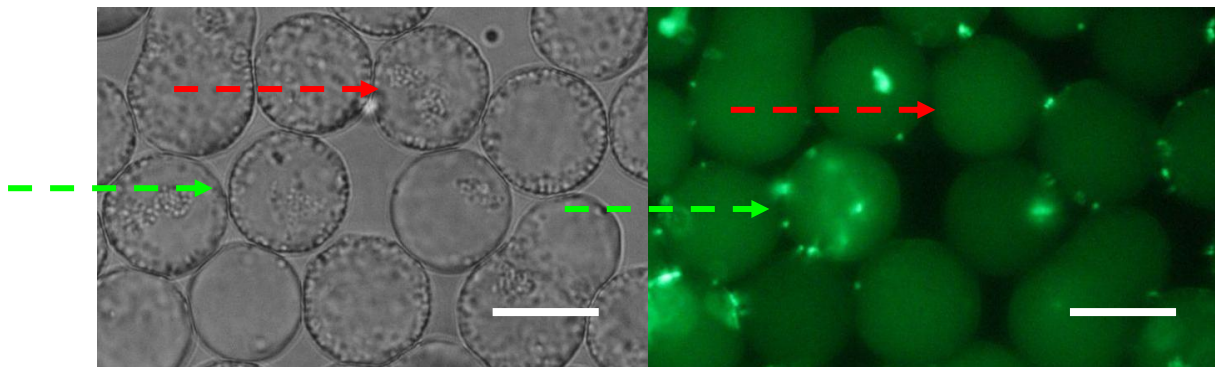
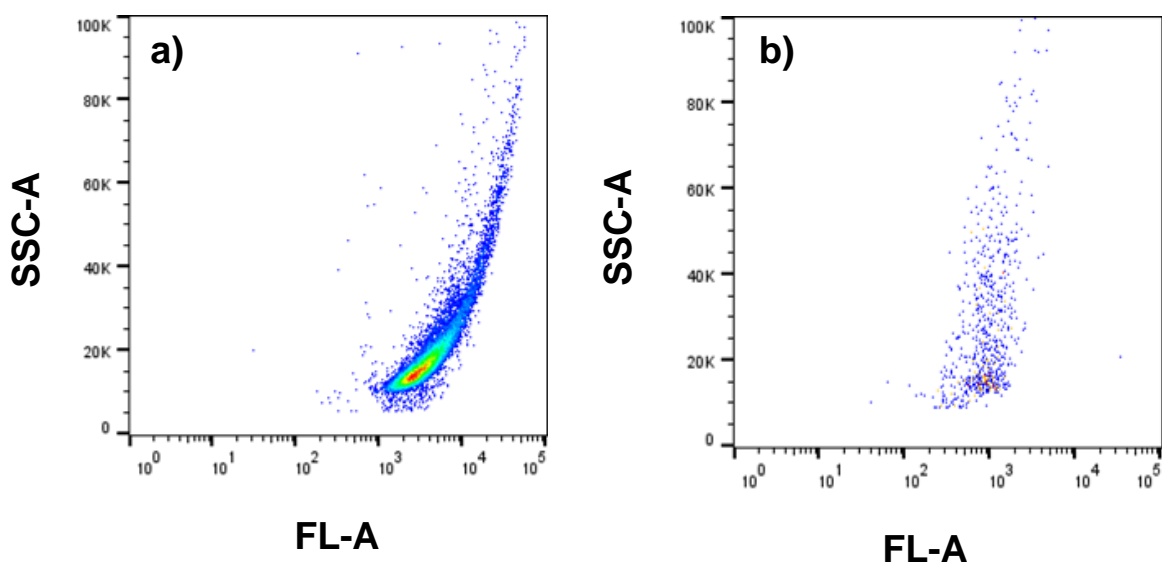


Figura 40. Campo claro con su correspondiente imagen en luz fluorescente de microgeles co-encapsulados en el segundo ciclo.

4.6.2.- Segundo ciclo



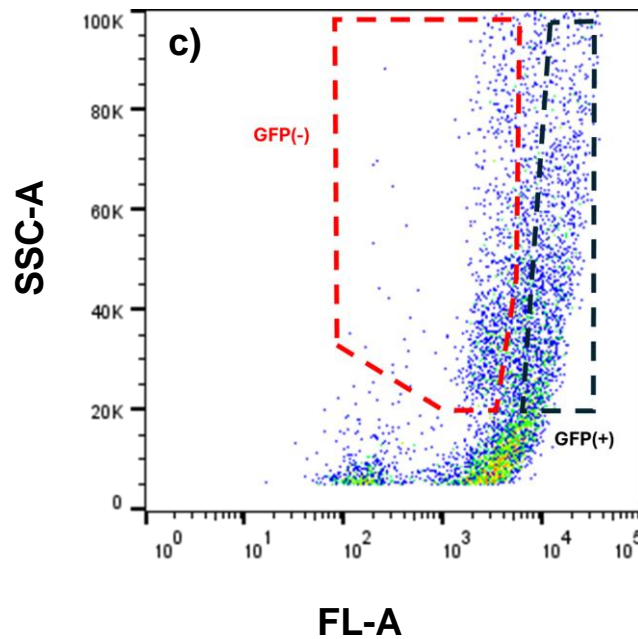


Figura 41. Gráfico obtenido de FACS del análisis de microgeles; a) *E. Coli*- GFP; b) microorganismos aislados de Chile; c) análisis de microgeles de la co-encapsulación.

Al comparar los gráficos de SSC-A vs. intensidad de fluorescencia (FL) de la co-encapsulación en el primer ciclo contra el mismo gráfico obtenido para el segundo ciclo, se observa que las diferentes poblaciones de microgeles (GFP + y GFP -) se diferencian de mejor manera en el segundo ciclo de co-encapsulación.

Tabla 6. Número total de eventos (hits) detectados en cada ciclo y número de eventos recuperados en la ventana de GFP (-)

Número de hits totales		Número de hits recuperados en la zona de GFP (-)	
Ciclo I	Ciclo II	Ciclo I	Ciclo II
20110	9510	6130	939

4.6.3.- Sembrado sobre placas de agar de los microgeles recuperados de GFP (-) en el primer y segundo ciclo

En la Figura 42 se muestran las colonias de microorganismos que crecieron sobre placas de agar inoculadas con cada una de las diluciones de los microgeles recuperados de la región de GFP(-). El procedimiento se realizó tanto para el primero como para el segundo ciclo de co-encapsulación y selección.

a) Primer ciclo

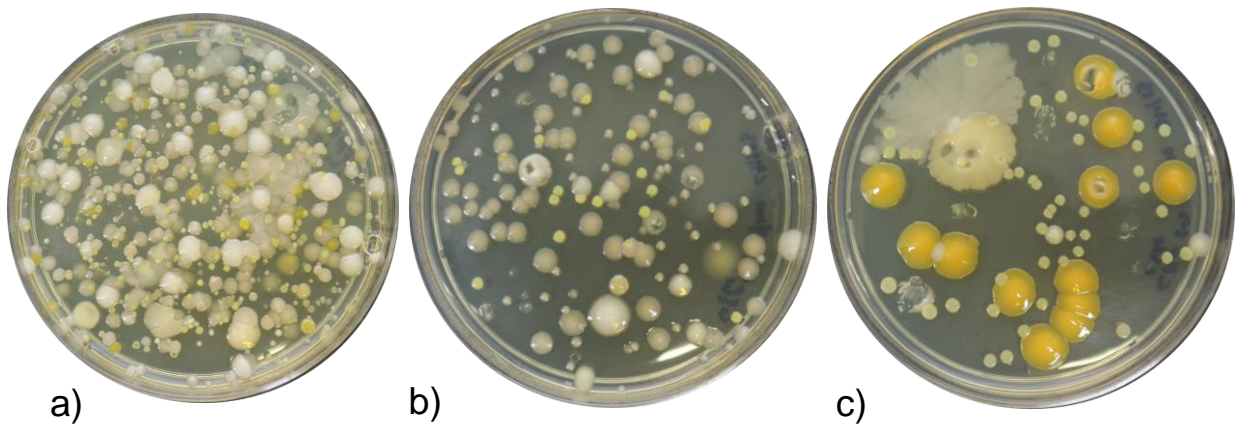


Figura 42. Crecimiento a las 24 horas de las diluciones de GFP(-) del primer ciclo. agregando 20 μ L en cada placa. a) dilución 1/10 de C_0 ; b) dilución 1/100 ; c) repetición de la dilución 1/100.

b) Segundo ciclo

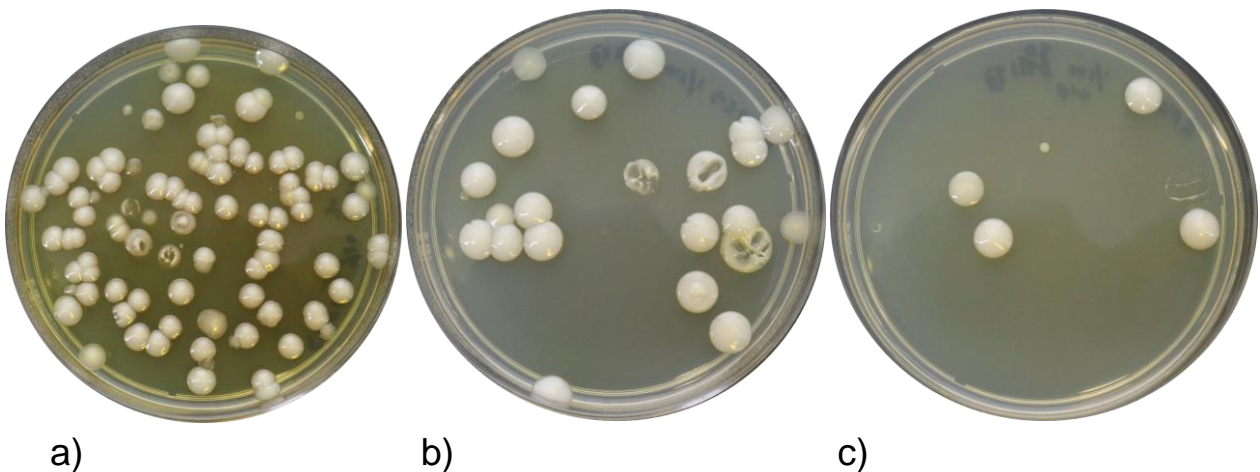


Figura 43. Crecimiento a las 24 horas de las diluciones de GFP(-) del segundo ciclo agregando 20 μ L en cada placa. a) dilución 1/10 de C_0 ; b) dilución 1/100 ; c) dilución 1/1000.

4.6.4.-Ensayos de inhibición

a) Primer ciclo

De una de las placas con las colonias recuperadas de GFP (-) (Figura 42 y 43) se aislaron 14 colonias con morfología diferente y cada una fue colocada por triplicado en placas de agar.

Se escogió una concentración de césped de *E.coli*-GFP dilución 1/100 ya que a esta concentración el crecimiento de *E. coli*-GFP sobre la superficie del agar fue la más adecuada para observar halos de inhibición. Estas placas se incubaron a 27°C durante 48 horas, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 44.

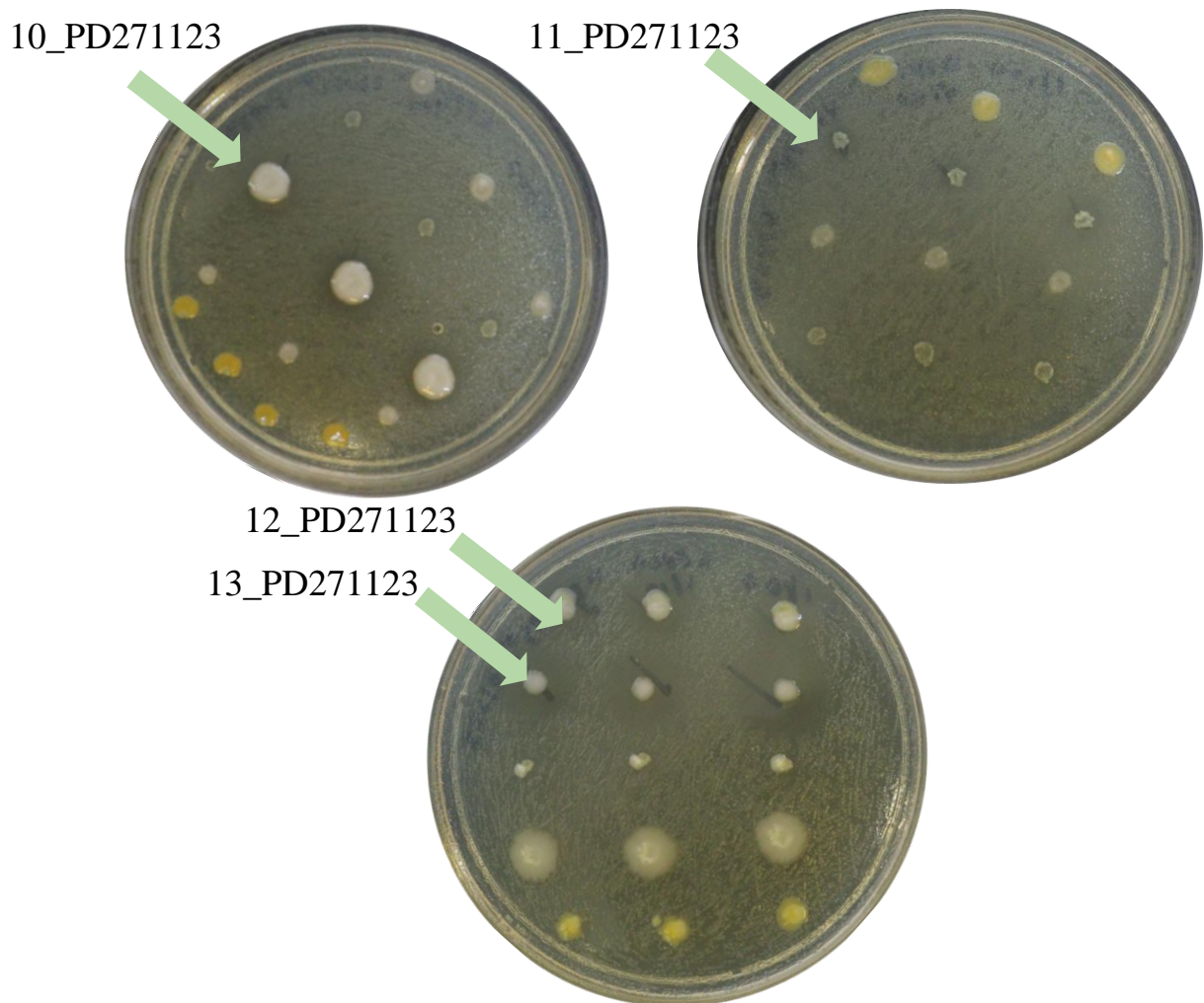


Figura 44. Ensayos de inhibición de cepas aisladas del primer ciclo de selección de la ventana de GFP (-) contra *E.coli*-GFP. Para sembrar el césped de *E.coli*-GFP se utilizó una dilución 1/100 de un cultivo overnight. Las flechas verdes señalan las colonias que mostraron inhibición y su respectiva etiqueta.

b) Segundo ciclo

Se repitió el mismo procedimiento descrito para las cepas recuperadas en el primer ciclo, sin embargo en esta ocasión la diversidad de las morfologías decreció notablemente, por lo que solo cuatro colonias fueron ensayadas. Se obtuvieron las placas mostradas en la Figura 45.

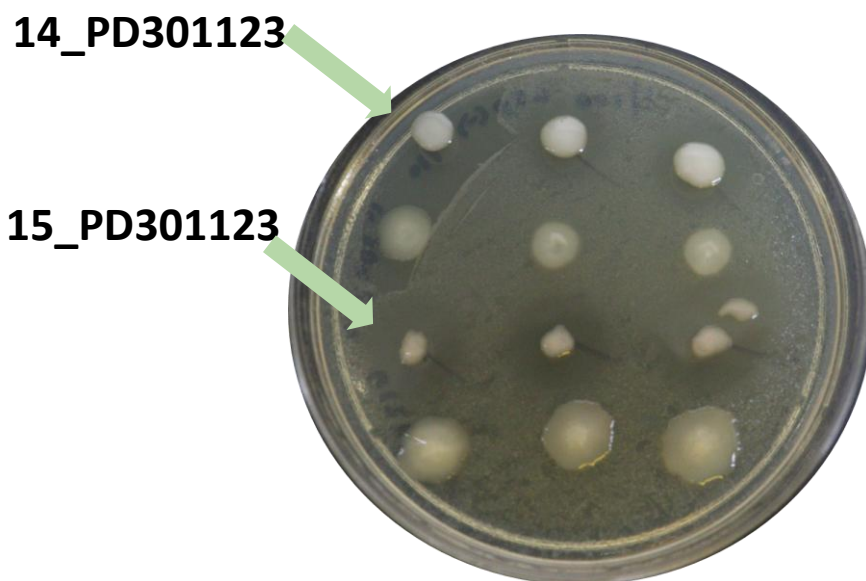


Figura 45. Ensayos de inhibición de cepas aisladas del segundo ciclo de selección de la ventana de GFP (-) contra *E.coli*-GFP. Para sembrar el césped de *E.coli*-GFP se utilizó una dilución 1/100 de un cultivo overnight. Las flechas verdes señalan las colonias que mostraron inhibición y su respectiva etiqueta.

En la Tabla 7 se muestran el total de cepas ensayadas en cada ciclo y el número de cepas con inhibición.

Tabla 7. Cepas aisladas del ensayo de enriquecimiento

	No. de cepas aisladas	No. cepas con inhibición	Nombres
Ciclo I	14	4	10_PD271123 11_PD271123 12_PD271123 13_PD271123
Ciclo II	4	2	14_PD301123 15_PD301123

Con base en la formación de halos de inhibición del primer ciclo se concluyó que el 29% de las cepas aisladas presentan inhibición frente a *E.coli*-GFP. Mientras que, en el segundo ciclo se concluyó que el 50% de las cepas aisladas presentan inhibición frente a *E.coli*-GFP. En el segundo ciclo se observan menos morfologías diferentes. Con este experimento se concluye

que el enriquecimiento de las bacterias es viable y se logran obtener menos microorganismos no antagonistas con base en su crecimiento en placas de agar-LB pero se conservan aquellos que inhiben a la cepa fluorescente.

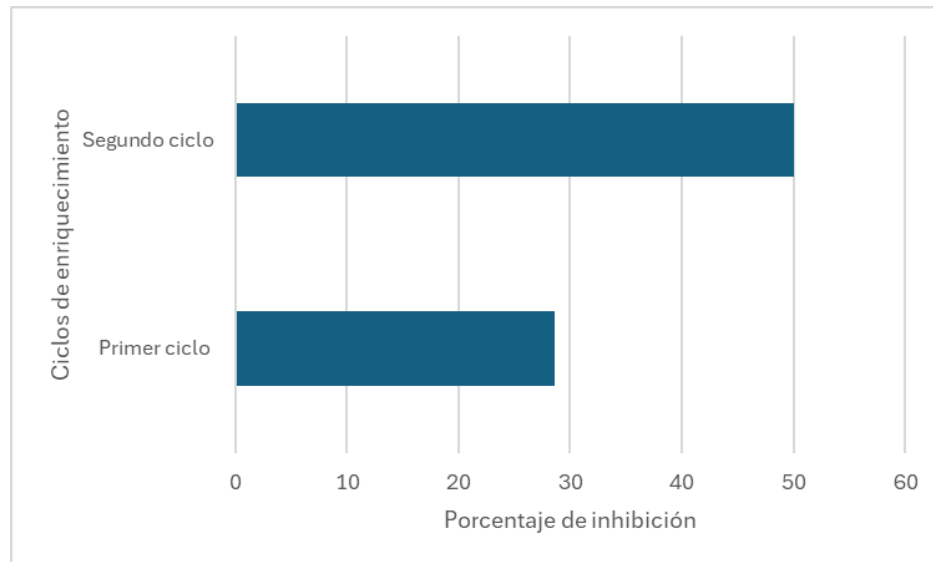


Figura 46. Porcentaje de colonias con actividad antagonista en los ensayos de enriquecimiento

4.8.- Corroboración de la actividad antagónica contra *E. coli*-GFP por parte de los microorganismos del Chile seleccionados en este trabajo

Mediante el procedimiento descrito en el *Capítulo 3.10.- Ensayos de actividad antimicrobiana con microorganismos aislados de Chile* se buscó evaluar la inhibición del crecimiento de *E.coli*-GFP en medio líquido LB utilizando el sobrenadante de los cultivos líquidos de las cepas aisladas que presentaron inhibición en los experimentos previamente descritos. Se realizó el ensayo utilizando distintos volúmenes de sobrenadante.

Debido a que las cepas se preservaron en stocks de glicerol a -80°C , primero se evaluó que cada cepa siguiera inhibiendo a *E.coli*-GFP. Para ello se realizaron ensayos de inhibición en placas de agar-LB, sembrados con un césped de *E.coli*-GFP dilución 1/10 e inoculando una colonia de los stocks para observar si había o no halos de inhibición. De 10 cepas escogidas 8 mostraron halos de inhibición.

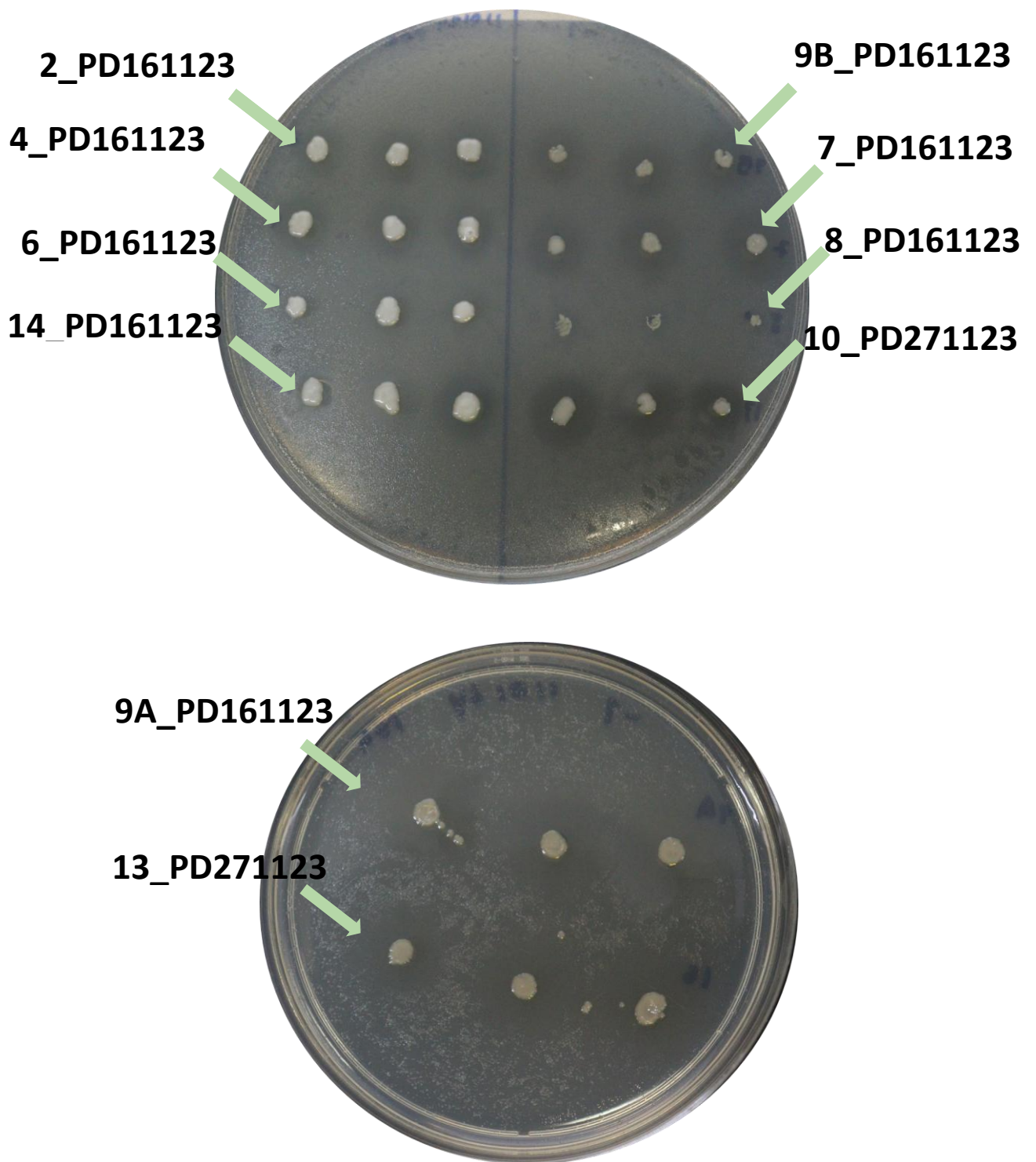


Figura 47. Platos con césped de *E.coli* -GFP dilución 1/10 para observar halos de inhibición a las 24 horas a 27°C por parte de las colonias del chile seleccionadas después de haber sido preservadas a -80°C.

Inicialmente se midió el diámetro de cada halo de inhibición de las tres repeticiones y de las colonias de las bacterias en el plato de agar y se realizó el cociente de la resta de los dos

diámetros entre el área de la colonia (Ecuación 3) obtenido los valores de la Tabla 8. De manera que un mayor valor, significa una mayor inhibición.

$$Capacidad\ inhibitoria = \frac{(Área\ halo - Área\ colonia)}{Área\ colonia} \quad \text{Ecuación 3}$$

Tabla 8. Capacidad inhibitoria de cada muestra

Muestra	Capacidad inhibitoria
2_PD161123	3.30
4_PD161123	3.22
6_PD161123	1.15
14_PD301123	3.33
13_PD271123	9.71
9B_PD161123	8.07
7_PD161123	9.83
8_PD161123	1.04
9A_PD161123	8.99
10_PD271123	9.51

Una vez comprobada su inhibición en placas, se cultivó cada cepa por separado en un medio líquido. Después de 24 h, se quitaron las células y a cada uno de los sobrenadantes (extractos crudos) se le midió su capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli*-GFP también en medio líquido. El % de inhibición se determinó utilizando el promedio de la densidad óptica bacteriana de tres ensayos y aplicando la Ecuación 4.

$$\% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{Abs_{extracto}}{Abs_{E.coli-GFP}}\right) 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde $Abs_{extracto}$ es el valor promedio de la absorbancia del cultivo de *E. coli* + extracto, mientras que $Abs_{E.coli-GFP}$ es el valor promedio de los cultivos control con solo *E.coli-GFP*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 48. En ella, se observa que la cepa 2_PD161123 presenta una fuerte inhibición al agregar un 75% de volumen del extracto crudo, y sólo disminuye un poco al agregar el 25% de volumen. Por su contrario, la cepa 10_PD271123 se muestra como una cepa poco inhibidora frente a *E.coli-GFP* al agregar ambos volúmenes diferentes.

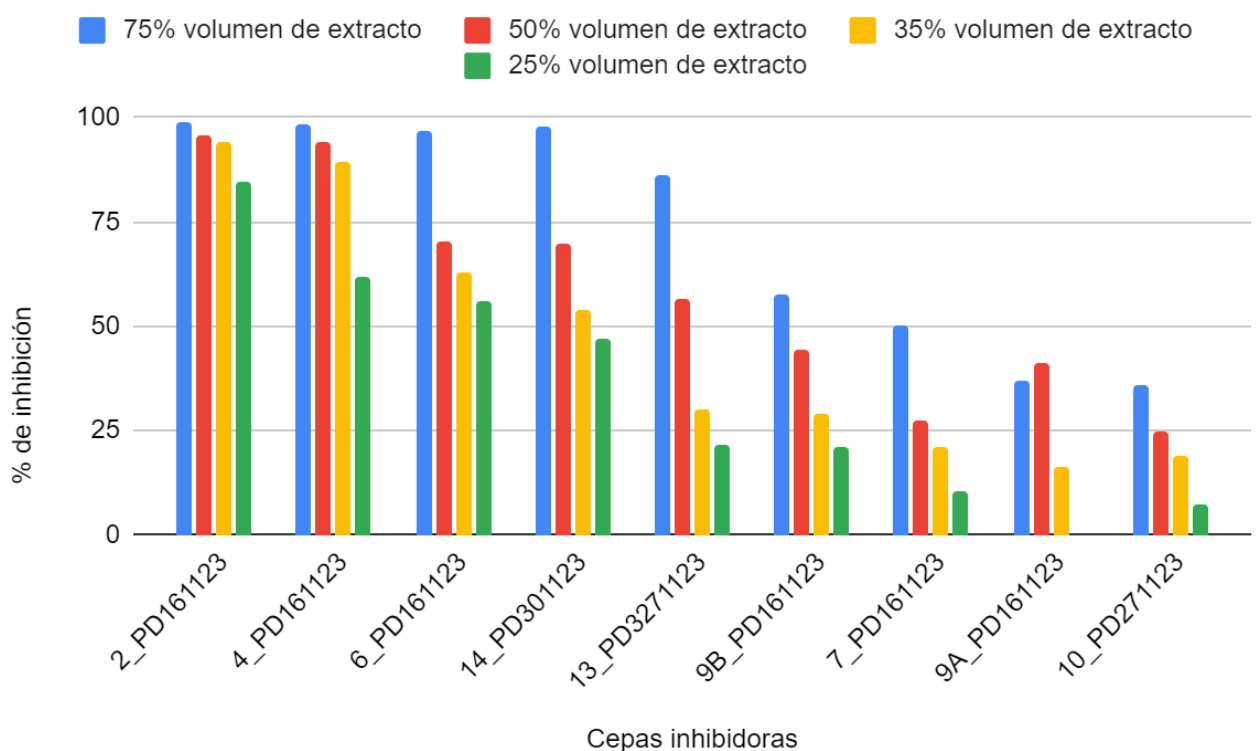


Figura 48. Gráfico de los porcentajes de inhibición del crecimiento de *E. coli-GFP* de cada extracto crudo de los cultivos de las cepas seleccionadas en este trabajo. Cada color representa un volumen diferente de extracto crudo empleado.

De igual forma, para cada cepa se determinó el EC50 (Por sus siglas Concentración Efectiva máxima media), la cual describe la concentración de una sustancia que produce la mitad de la respuesta máxima de una vía biológica [35]. Para este fin se graficó el porcentaje de inhibición contra el logaritmo de la concentración de extracto en % V/V (Figura 49) y se realizó un ajuste no lineal con el software Origin. Los valores de EC50 se presentan en la Tabla 9.

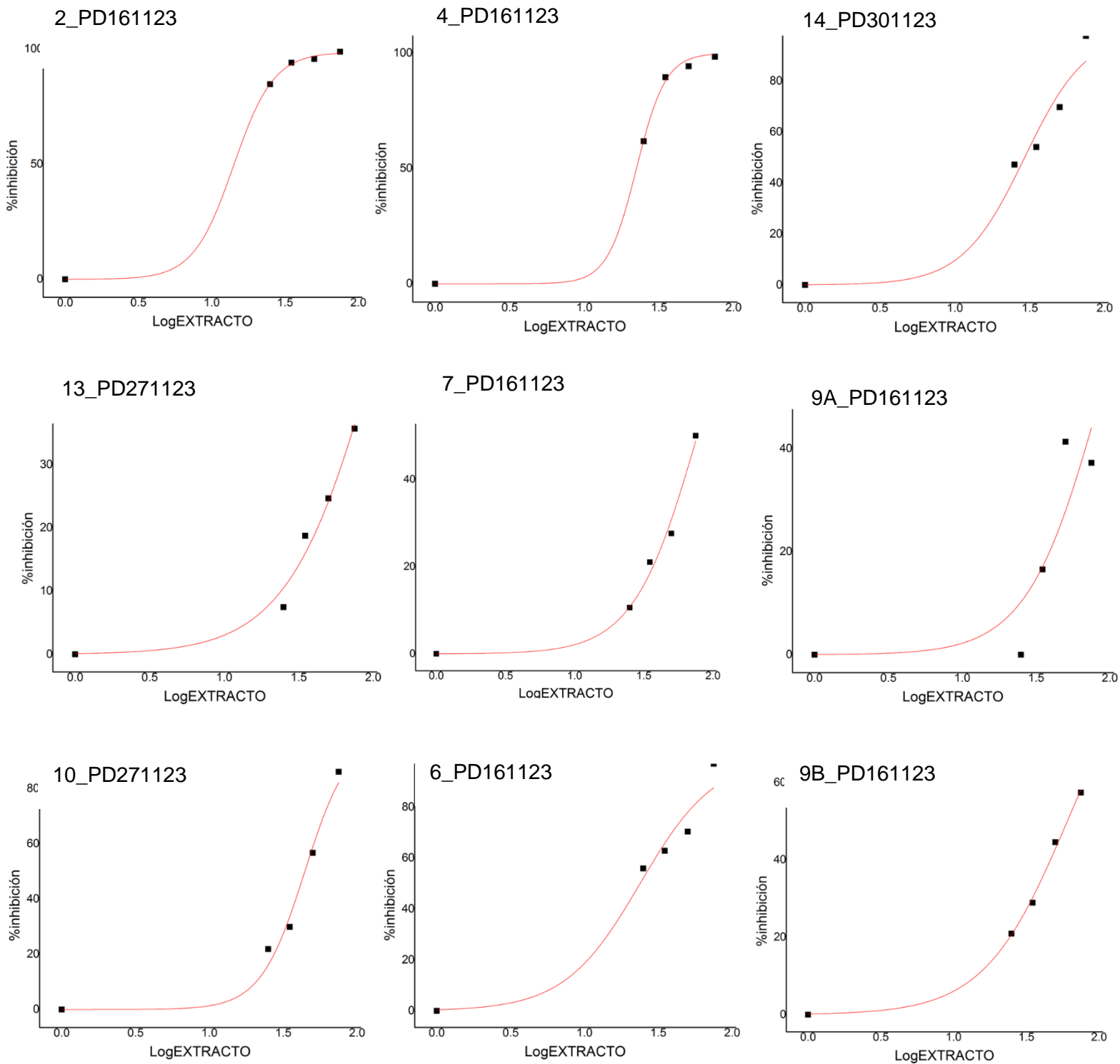


Figura 49. Gráficos de cada muestra para obtener el valor de EC50 utilizando una función de dosis respuesta.

Entre menor sea el valor de EC50 mayor será su capacidad de inhibir a *E.coli*-GFP. Con base en los datos obtenidos, la cepa 2_PD161123 es la cepa con mayor capacidad inhibidora
 Tabla 9. EC50 de cada muestra

Muestra	EC50
2_PD161123	14.07±2.30
4_PD161123	22.34 ± 0.63
6_PD161123	23.79 ± 3.99
14_PD301123	29.18 ±3.14
10_PD271123	44.25± 1.89
9B_PD161123	60.48 ± 1.50
7_PD161123	76.95 ± 3.82
9A_PD161123	85.90 ± 23.54
13_PD271123	110.43 ± 12.15

4.9.- Secuenciación

Utilizando los resultados de los ensayos de los halos de inhibición, se decidió enviar a secuenciar las cepas con mayor inhibición al Laboratorio de Servicios Genómicos (LabSerGen) de la Unidad de Genómica Avanzada del Cinvestav y del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (UGA-Langebio). Cada una de las cepas se estrió en medio sólido LB y se identificó mediante la secuenciación de su gen ARNr16S. Este gen tiene en sus extremos regiones altamente conservadas en todos los organismos procariontes, lo que permite amplificarlo fácilmente por PCR y secuenciarlo después. Además, el gen tiene otras regiones internas que son variables y específicas de cada especie de bacteria, lo que permite su identificación al comparar su secuencia con las bases de datos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10. ^[36]

Tabla 10. Resultados obtenidos de secuenciación

Ensayo	Cepa aislada	Nombre de secuencia
Primer co-encapsulación	A_PD191023	<i>Klebsiella pasteurii</i>
Segunda co-encapsulación	7_PD161123	<i>Pseudomonas qingdaonensis</i>

y los dos ciclos de co-encapsulación	9A_PD161123 9B_PD161123 10_PD271123 13_PD271123	
--------------------------------------	--	--

4.10.- Últimos ensayos de inhibición contra *E. coli*

Posterior a la secuenciación, se realizaron una vez más ensayos de inhibición para las mismas cepas seleccionadas. Como se observa en la Figura 50, las flechas rojas señalan aquellas cepas que no generaron halos de inhibición, mientras que las amarillas señalan aquellas que aún poseían actividad antagonista frente a *E. coli*-GFP. Entonces, algunas cepas que anteriormente tenían inhibición dejaron de presentarla. Esto puede explicarse desde bases evolutivas. La selección natural puede eliminar genes de un genoma bacteriano que podrían no ser esenciales en un entorno determinado, de manera que, retener genes que no contribuyan a la aptitud de una célula bacteriana no es del todo beneficioso y le genera un costo a la célula generando así la pérdida de funciones biosintéticas en la bacteria. De tal forma que, es posible que dicho cambio o mutación puede mejorar la aptitud física de la bacteria al evitar expresar proteínas que la célula considere como innecesarias debido a que reducen la cantidad de recursos disponibles para otros procesos celulares [37]. También es posible que simplemente por cambios en su entorno, se “reprima” o se deje de inducir la producción de los metabolitos responsables de la inhibición bacteriana.

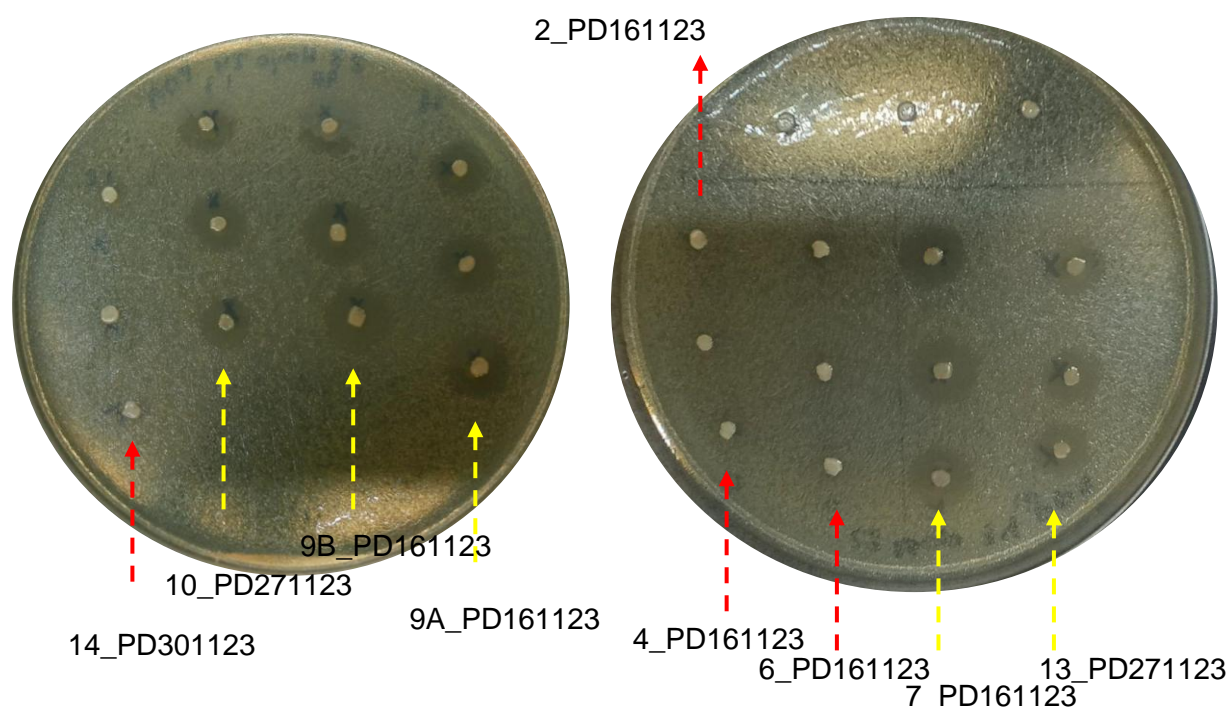


Figura 50. Fotografías respectivas a los halos de inhibición de las cepas escogidas seleccionadas.

4.11.-Algunas características de las cepas secuenciadas

Klebsiella pasteurii

El género *Klebsiella* es una clase de bacterias Gram negativas, con forma de bastón. Dicho género tiene dos especies muy importantes a nivel clínico y epidemiológico, (*Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca*), este género está presente en la naturaleza y se puede aislar de los alimentos, aguas residuales, suelo y plantas. La temperatura en la cual crece de manera óptima esta bacteria es de 37°C y pueden sobrevivir muchos meses en un ambiente desecado. Esta bacteria se puede esparcir tras el consumo de un alimento contaminado, contacto con agua contaminada y por contacto en un ambiente hospitalario. [38]

Pseudomonas qingdaonensis

Las bacterias del género *Pseudomonas* se encuentran en una gran variedad de ambientes desde suelo, plantas y animales. La *Pseudomonas qingdaonensis* es una bacteria aeróbica con forma de bastón, Gram negativa. Se ha aislado en China, de la provincia de Shandong, de suelos rizosféricos. [39]

Sin embargo, para ambas especies de bacterias encontradas hay poca información.

5.- RESUMEN DE RESULTADOS

Utilizando dispositivos de microfluídica con una geometría de enfoque de flujo y microcanales de 21 μm de alto y 128-182 μm de ancho, se produjeron microgeles de diámetro de 25 ± 2.5 μm . En dichos microgeles, elaborados con agarosa de bajo punto de fusión al 2.8 % m/v, se realizaron procedimientos de encapsulación de microorganismos aislados del chile poblano en descomposición o de células de un cultivo de *E.coli*-GFP utilizando diferentes densidades de cultivos. Los microgeles se observaron por microscopía de campo claro y fluorescencia y se realizó el conteo de células dentro de cada uno. Con los resultados experimentales se realizaron histogramas del número de organismos por gota y los datos se ajustaron a la ecuación de distribución de Poisson, permitiendo el cálculo del valor de λ (número promedio de células dentro de los microgeles) para cada densidad de cultivo. Finalmente se realizaron curvas de calibración de λ vs. densidad óptica del cultivo para saber con precisión cuántos microorganismos y con qué distribución se pueden encapsular en los microgeles. Después, se realizaron experimentos para la búsqueda de microorganismos inhibidores a *E.coli*-GFP. Primero, se realizaron las encapsulaciones independientes de los microorganismos aislados de chile ($\lambda = 0.3$, $\text{DO}_{630 \text{ nm}} = 0.029$) obteniendo 74.08% vacíos, 22.22% con una célula por microgel y el 3.69% con dos o más células. Mientras que para la muestra de *E.coli*-GFP ($\lambda = 5.0$, $\text{DO}_{630 \text{ nm}} = 0.130$) el 97.9% de los microgeles estén ocupados por al menos una célula de *E.coli*-GFP mientras que el 0.67% son geles vacíos. A su vez se realizaron las co-encapsulaciones de las dos muestras con los valores de λ previamente descritos. Una vez formados los microgeles, se incubaron durante 48 horas a 27 °C para fomentar el crecimiento de microcolonias dentro de los microgeles. Después, se realizó un procedimiento para cambiar los microgeles de la fase oleosa a una acuosa y poder analizar y separar los microgeles utilizando la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Esto permitió el análisis de cada microgel. Para el primer experimento se evaluaron las zonas de GFP (+) correspondiente a la *E.coli*-GFP y la zona de GFP (-) la cual se esperaba que tuviera únicamente microorganismos que permitieran la inhibición a la cepa fluorescente. Posteriormente, se recuperaron los microgeles separados y se crecieron a macroescala. Una vez observado el crecimiento de las colonias se aislaron con base en un criterio de morfología y se realizaron ensayos de inhibición. Para el primer ensayo se obtuvo una cepa inhibidora de ocho que se evaluaron. Para el segundo experimento se estudiaron más regiones en las gráficas de FAC obteniendo 9 cepas con inhibición a partir de 16 que se aislaron. Finalmente, se realizó un tercer ensayo en el cual se buscó enriquecer el porcentaje de microorganismos inhibidores realizando dos ciclos de encapsulación y selección. Para ello, se recuperaron los

geles de la región de GFP (-) de una primera co-encapsulación , se incubaron y se volvieron a co-encapsular con *E.coli*-GFP. Los geles de este segundo ciclo fueron nuevamente seleccionados por FACS. En estos experimentos se observó que el porcentaje de cepas inhibidoras de *E.coli*-GFP en el primer ciclo fue de 29%. Mientras que, en el segundo ciclo se concluyó que el 50% de las cepas aisladas presentan inhibición frente a *E.coli*-GFP, por lo que, permitió una recuperación un poco más específica de microorganismos aislados del chile poblano en descomposición.

Por otra parte, se analizaron los sobrenadantes de un cultivo de cada una de las cepas seleccionadas por medio de ensayos de inhibición en placas de 96 pozos para determinar sus porcentajes de inhibición al crecimiento de *E.coli*-GFP. Estas cepas aisladas se preservaron para su posterior secuenciación donde primero se re-evaluó su inhibición, sin embargo, algunas de estas ya no poseían la capacidad de inhibir a *E.coli*-GF, por lo cual, sólo se secuenciaron las que aún tenían la capacidad de interes. Se obtuvieron como resultados las cepas: *Klebsiella pasteurii* y *Pseudomonas qingdaonensis*.

6.- CONCLUSIÓN

Se logró la selección de microorganismos provenientes del Chile poblano en descomposición con actividad antagonista frente a una cepa de *E.coli*-GFP mediante su co-encapsulación en microgeles formados en un dispositivo de microfluídica con enfoque de flujo. La observación corroboró que había co-encapsulación. El análisis y separación de las señales en FACS con el uso de la propiedad de fluorescencia y de los parámetros de complejidad y tamaño de cientos de miles de microgeles, permitió la recuperación de poblaciones de microgeles enriquecidas con microorganismos antagonistas de *E.coli*-GFP. Posteriores ensayos de inhibición permitieron aislar con gran facilidad las cepas con capacidad antagonista. Además, mediante un proceso de secuenciación realizado por el Laboratorio de Servicios Genómicos (LabSerGen) (UGA-Langebio) se logró la secuenciación del gen 16S ARNr de dos de las cepas aisladas, identificándolas como *Klebsiella pasteurii* y *Pseudomonas qingdaonensis*.

La metodología empleada en este proyecto podría ser una alternativa para reducir el tiempo y aumentar el éxito en la búsqueda de microorganismos con capacidad de inhibición frente a *E.coli* y otros patógenos multirresistentes a partir de una muestra ambiental en comparación con el uso de técnicas de microbiología a macroescala.

ANEXO I

Viabilidad en congelamiento

Las bacterias recuperadas en los experimentos se preservan en congelamiento, esto puede afectar su posterior crecimiento. Las bacterias necesitan nutrientes de su entorno. Sin embargo, cuando las células bacterianas carecen de estos nutrientes pueden reducir su tamaño, ser más resistentes a condiciones adversas del medio ambiente o también pueden morir^[40]. Por lo cual, se evaluó la cantidad de días que estas siguen creciendo en las placas de agar LB. En la Figura 51 se observa el crecimiento de 24 horas en placas de agar de las bacterias preservadas en diferentes lapsos de tiempo. A los 3 meses éstas bacterias ya no crecen aunque después de dejar crecer 48 horas sólo se observa un crecimiento de hongos.

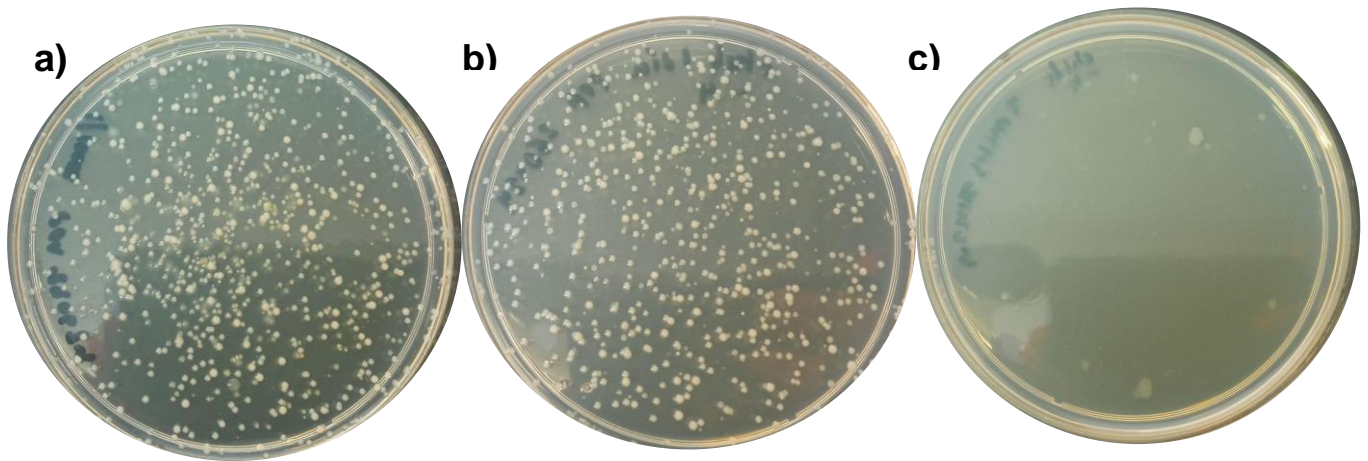


Figura 51. 24 horas de crecimiento en placas de agar-LB de microorganismos aislados de chile poblano a una dilución 1/10000. a) Sin congelar 0 días. b) 1 día de congelación. c) 3 meses de congelación

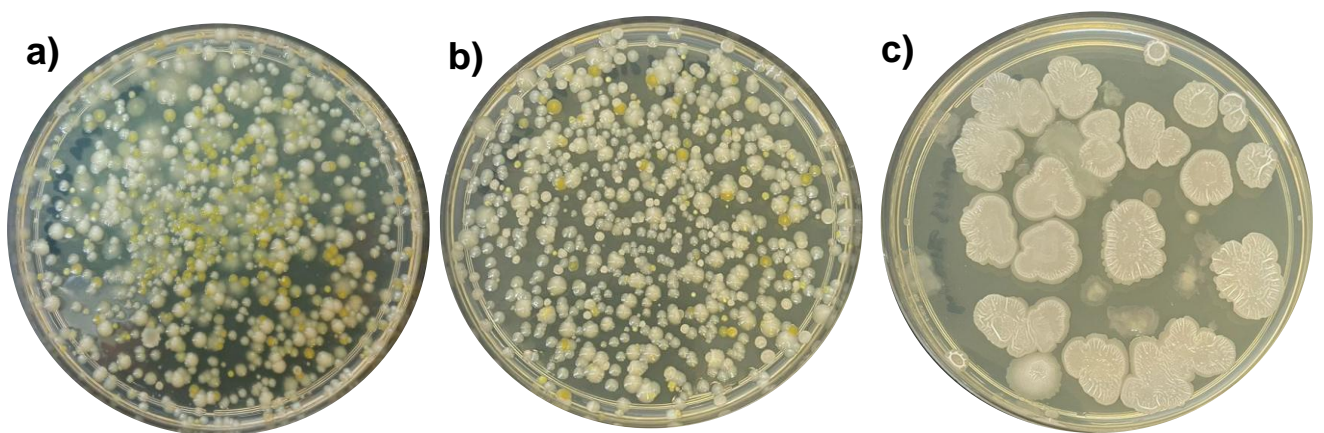


Figura 52. 48 horas de crecimiento en placas de agar-LB de microorganismos aislados de chile poblano a una dilución 1/10000. a) Sin congelar 0 días. b) 1 día de congelación. c) 3 meses de congelación.

ANEXO II

Debris

Durante la síntesis de los microgeles en el dispositivo de microfluídica es común que cuando están todavía en estado líquido, se formen gotas muy pequeñas (aprox. 0.5-1.0 μm de diámetro) como un subproducto cuando se desprende una gota del enfoque de flujo. Estas partículas pequeñas las llamamos detritos (o debris en inglés) y pueden ser identificadas en el equipo de FACS. Debido a que pueden ser muchas, es conveniente no tomarlas en cuenta para la selección de los microgeles. Los siguientes gráficos provienen del análisis de microgeles cargados con microorganismos aislados de Chile poblano en descomposición y sirven para ejemplificar cómo se pueden eliminar los detritos. En la Figura 53a se evalúan los ejes de complejidad (SSC-A) vs tamaño (FSC-A). Después, se graficó la fluorescencia de cada señal en la Figura 53b, en la cual se puede observar que tiene dos señales distintas, una entre 10^1 y 10^2 y otra señal intensa cercana a 10^3 . De manera que se analizará el gráfico para separar dichas señales y observar en qué región de la Figura 53a pertenecen.

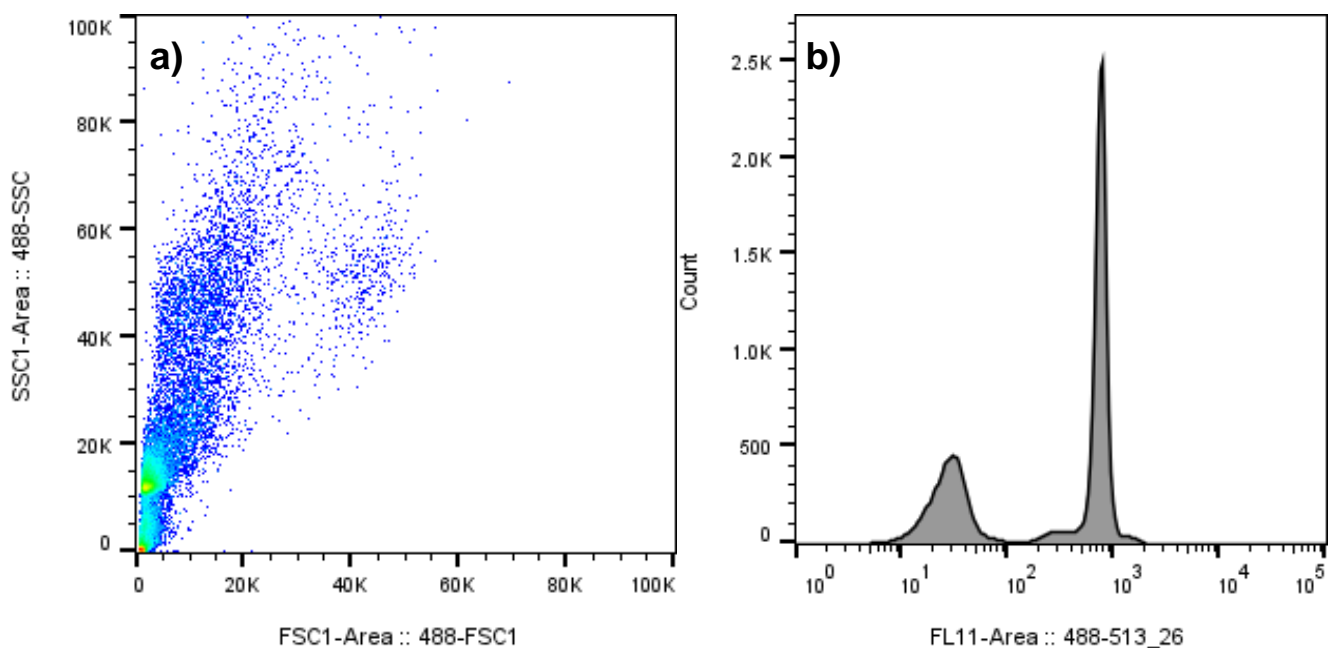


Figura 53. Gráfico de microorganismos aislados de Chile a) SSC-A vs FSC-A. b) histograma de fluorescencia.

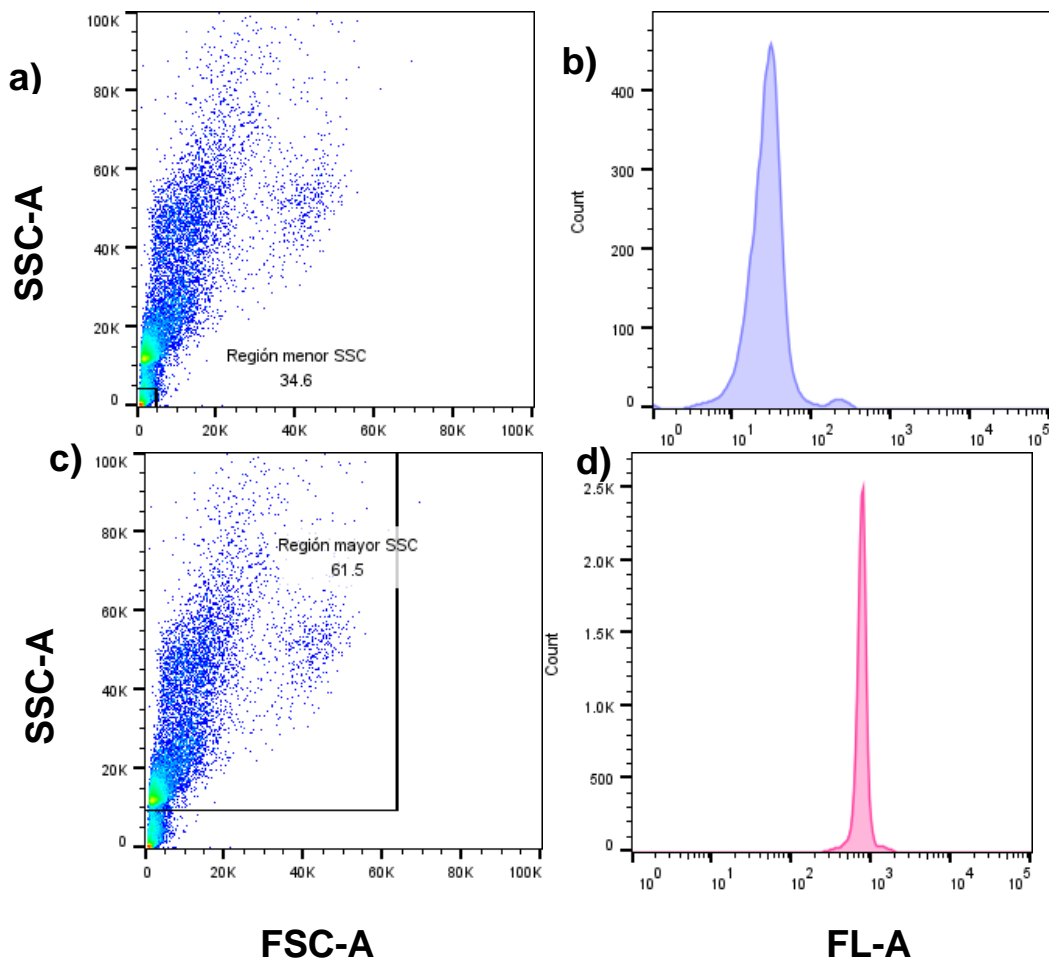


Figura 54. Gráfico de microorganismos aislados de Chile a) SSC-A vs FSC-A con selección en región *menor* de SSC b) Fluorescencia de la selección de Región *menor* SSC. c) Gráfico de microorganismos aislados de Chile SSC-A vs FSC-A con selección de Región *mayor* SSC. d) Fluorescencia de la selección de Región *mayor* SSC

Como se observa en la Figura 54, la zona de desechos que se encuentra en una región menor del eje Y, SSC-A, posee una intensidad baja de fluorescencia entre los 10^1 y 10^2 . En comparación, los microgeles ocupados por microorganismos aislados de Chile poblados en descomposición poseen una fluorescencia cercana a 10^3 , (ver el histograma en la Figura 54). De esta manera, se hará el análisis de los microgeles excluyendo la región de desechos que son partículas libres o partículas de agar por ruptura de microgeles.

Anexo III

Al analizar los microgeles en FACS se obtuvieron diferentes gráficos para cada una de las muestras. Para ejemplificar, en la Figura 55-a se analizaron los microorganismos aislados de Chile poblano del primer ensayo, con el gráfico de ejes de SSC-A vs FSC-A. Estos gráficos se utilizaron para eliminar los desechos que se mencionan en el Anexo II. De manera que una vez eliminados los desechos, se selecciona el gráfico que corresponde a la fluorescencia y se realiza la separación de los microgeles. De manera que, estos gráficos sirven para seleccionar posteriormente las ventanas para separar los microgeles.

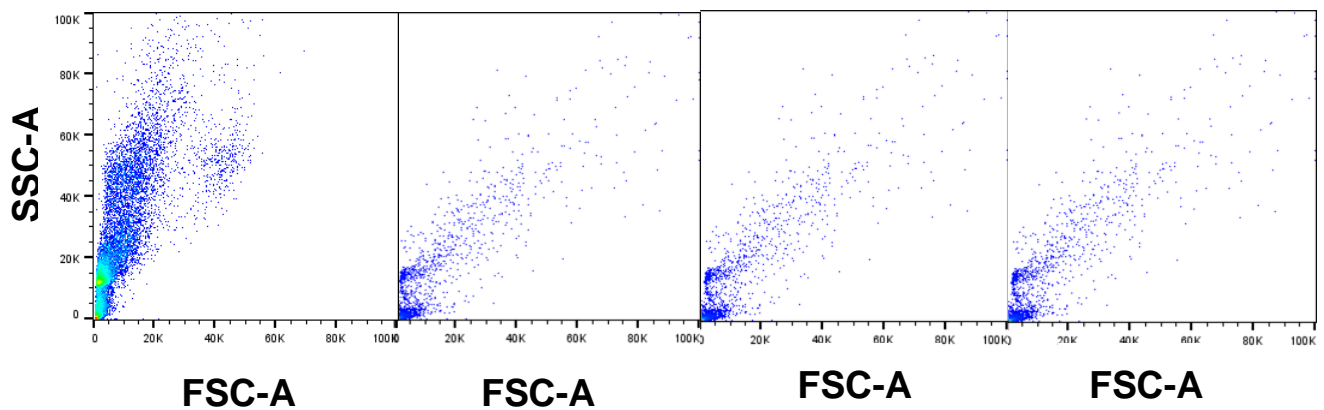


Figura 55. Gráficos de encapsulación de microorganismos aislados de Chile poblano a)Primera co-encapsulación. b)Segunda co-encapsulación. c)Ensayo de enriquecimiento del primer ciclo. d)Ensayo de enriquecimiento del segundo ciclo.

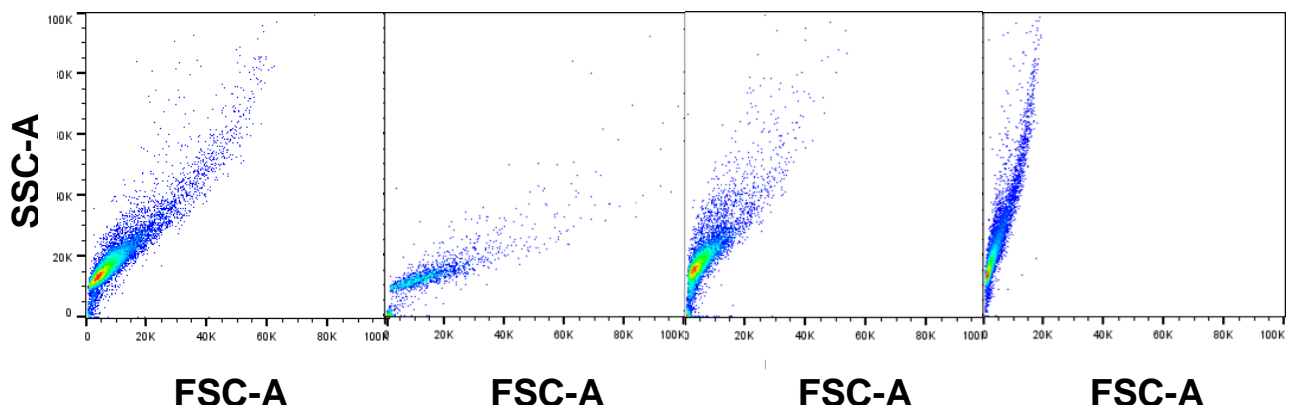


Figura 56. Gráficos de encapsulación de E.coli-GFP a)Primera co-encapsulación. b)Segunda co-encapsulación. c)Ensayo de enriquecimiento del primer ciclo. d)Ensayo de enriquecimiento del segundo ciclo

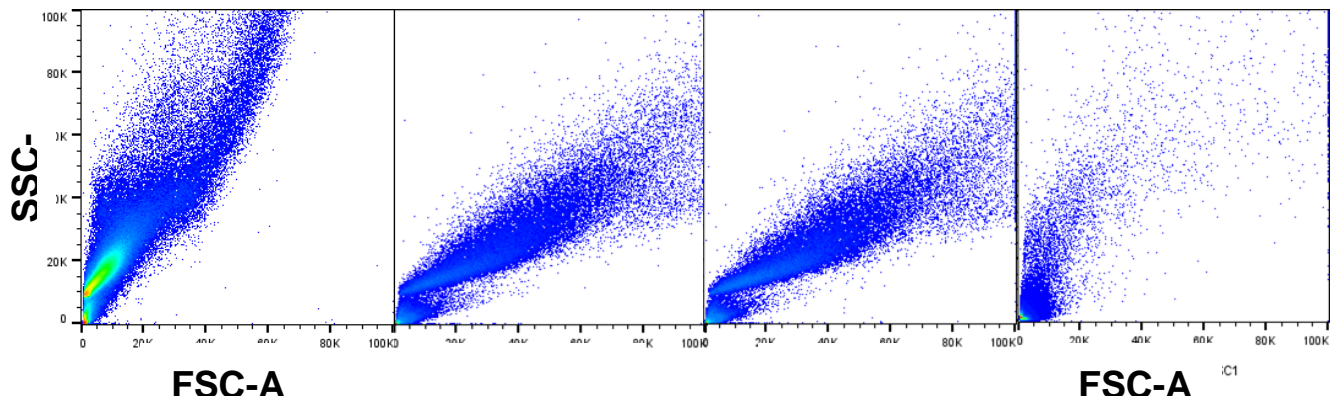


Figura 57. Gráficos de co-encapsulación a)Primera co-encapsulación. b)Segunda co-encapsulación. c)Ensayo de enriquecimiento del primer ciclo. d)Ensayo de enriquecimiento del segundo ciclo

Referencias

- [1] Tang KWK, Millar BC and Moore JE. (2023) Antimicrobial Resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science*, 80, 11387 .doi: 10.3389/bjbs.2023.11387
- [2] Morrison, L., & Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 30(4), 619–635. doi:10.1016/j.giec.2020.06.004
- [3] Samuel Ariyo Okaiyeto a , Parag Prakash Sutar b , Chang Chen et al. Antibiotic resistant bacteria in food systems: Current status, resistance mechanisms, and mitigation strategies. *Agriculture Communications*, 2(1). Doi: . 10.1016/j.agrcom.2024.100027
- [4] Christiana E. Aruwa, Theolyn Chellan, Nosipho W. S'thebe, Yamkela Dweba, Saheed Sabiu.(2024). ESKAPE pathogens and associated quorum sensing systems: New targets for novel antimicrobials development, *Health Sciences Review*, 11. Doi: [10.1016/j.hsr.2024.100155](https://doi.org/10.1016/j.hsr.2024.100155)
- [5] Dadgostar, P. (2019).Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*, Volume 12, 3903–3910. doi:10.2147/idr.s234610
- [6] Dzobo K(2022). The Role of Natural Products as Sources of Therapeutic Agents for Innovative Drug Discovery. *Comprehensive Pharmacology*, 408–422. doi: 10.1016/B978-0-12-820472-6.00041-4.
- [7] Lin-Sen Qing, Tian-Tian Wang, Han-Yue Luo, Jia-Lan Du, Run-Yue Wang, Pei Luo. (2023). Microfluidic strategies for natural products in drug discovery: Current status and future perspectives, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 158. Doi: [10.1016/j.trac.2022.116832](https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116832)
- [8] Atanasov, A.G., Zotchev, S.B., Dirsch, V.M. *et al.* (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 20, 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- [9] Huang, B., & Zhang, Y. (2022). Teaching an old dog new tricks: Drug discovery by repositioning natural products and their derivatives. *Drug discovery today*, 27(7), 1936–1944. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.02.007>
- [10] Gibbons, S. M., & Gilbert, J. A. (2015). Microbial diversity--exploration of natural ecosystems and microbiomes. *Current opinion in genetics & development*, 35, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.10.003>
- [11] Kim, A.-L., Park, S., Hong, Y.-K., Shin, J.-H., & Joo, S.-H. (2021). Isolation and Characterization of Beneficial Bacteria from Food Process Wastes. *Microorganisms*, 9(6), 1156. doi:10.3390/microorganisms9061156
- [12] Abbasi, H., Hamedi, M. M., Lotfabad, T. B., Zahiri, H. S., Sharafi, H., Masoomi, F., Noghabi, K. A. (2012). *Biosurfactant-producing bacterium, Pseudomonas aeruginosa MA01 isolated*

- from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(2), 211–219. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.10.002
- [13] Sofia Sampaolesi , Laura E. Briand, Graciela De Antoni , Angela León Peláez. (2022). *The synthesis of soluble and volatile bioactive compounds by selected brewer's yeasts: Antagonistic effect against enteropathogenic bacteria and food spoiler – toxigenic Aspergillus sp.* *Food Chemistry: X*. 13. Doi: 10.1016/j.fochx.2021.100193
- [14] Abul Kalam and S Rehan Ahmad. (2021). Antifungal Activity of Bacteria Isolated from Rotten Fruits and Vegetables: their Partial Morphological and Biochemical Characterization. *Bioscience Biotechnology Research Communications*. 14(1). DOI: <http://dx.doi.org/10.21786/bbrc/14.1/44>
- [15] Linshan Wu , Zhiguang Guo & Weimin Liu. (2022). Surface behaviors of droplet manipulation in microfluidics devices . *Advances in Colloid and Interface Science*, 308. Doi: 10.1016/j.cis.2022.102770
- [16] Kaminski, T. S., Scheler, O., & Garstecki, P. (2016). Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges. *Lab on a Chip*, 16(12), 2168–2187. doi:10.1039/c6lc00367b
- [17] Zeng, S., Liu, X., Xie, H., & Lin, B. (2011). Basic Technologies for Droplet Microfluidics. *Topics in Current Chemistry*, 304, 69–90. doi:10.1007/128_2011_149
- [18] McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R., Chiu, D. T., Wu, H., Schueller, O. J., & Whitesides, G. M. (2000). Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 21(1), 27–40. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000101\)21:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-C)
- [19] Saito, K., Ota, Y., Turlousse, D. M., Matsukura, S., Fujitani, H., Morita, M., ... Noda, N. (2021). *Microdroplet-based system for culturing of environmental microorganisms using FNAP-sort*. *Scientific Reports*, 11(1). doi:10.1038/s41598-021-88974-2
- [20] Xiao, Z., Niu, M., & Zhang, B. (2012). Droplet microfluidics based microseparation systems. *Journal of Separation Science*, 35(10-11), 1284–1293. doi:10.1002/jssc.201200115
- [21] Eun, Y.-J., Utada, A. S., Copeland, M. F., Takeuchi, S., & Weibel, D. B. (2011). Encapsulating Bacteria in Agarose Microparticles Using Microfluidics for High-Throughput Cell Analysis and Isolation. *ACS Chemical Biology*, 6(3), 260–266. doi:10.1021/cb100336p
- [22] Beneyton, T., Wijaya, I. P. M., Postros, P., Najah, M., Leblond, P., Couvent, A., ... Drevelle, A. (2016). *High-throughput screening of filamentous fungi using nanoliter-range droplet-based microfluidics*. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep27223

- [23] Hu, B., Xu, P., Ma, L., Chen, D., Wang, J., Dai, X., ... Du, W. (2021). One cell at a time: droplet-based microbial cultivation, screening and sequencing. *Marine Life Science & Technology*, 3(2), 169–188. doi:10.1007/s42995-020-00082-8
- [24] Bonner, W. A., Hulett, H. R., Sweet, R. G., & Herzenberg, L. A. (1972). Fluorescence Activated Cell Sorting. *Review of Scientific Instruments*, 43(3), 404–409. doi:10.1063/1.1685647
- [25] K.W. Johnson, M. Dooner & P.J. Quesenberry. (2007). Fluorescence Activated Cell Sorting: A Window on the Stem Cell. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 8(3), 133-139. doi: [10.2174/138920107780906487](https://doi.org/10.2174/138920107780906487)
- [26] Collins, D. J., Neild, A., deMello, A., Liu, A.-Q., & Ai, Y. (2015). *The Poisson distribution and beyond: methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation. Lab on a Chip*, 15(17), 3439–3459. doi:10.1039/c5lc00614g
- [27] A. Ochoa, F. Trejo and L. F. Olguin. (2020). Droplet-Based Microfluidics Methods for Detecting Enzyme Inhibitors. En N. E. Labrou (Ed.), *Targeting Enzymes for Pharmaceutical Development* (pp. 209–233). Doi: 10.1007/978-1-0716-0163-1
- [28] Martin, N. C., Pirie, A. A., Ford, L. V., Callaghan, C. L., McTurk, K., Lucy, D., & Scrimger, D. G. (2006). The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs. *Science & Justice*, 46(3), 179–184. doi:10.1016/S1355-0306(06)71591-X
- [29] Molecular PROBES. (2004). BacLight™ Bacterial Stains. ThermoFisher. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp35000.pdf>
- [30] Abraham Ochoa, Gabriela Gastélm, Jorge Rocha & Luis F. Olguin High-throughput bacterial co-encapsulation in microfluidic gel beads for discovery of antibiotic-producing strains. *Analyst*, 148 (22), 5762-5774. Doi: 10.1039/D3AN01101A
- [31] Tenailon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207–217. doi:10.1038/nrmicro2298
- [32] Aishwarya Agarwal, Deepak Khushalani, Ankita Harkare & Rakshal Agrawal. (2020). A Review of FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting System. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 13(14), 436-439. Doi: 10.21786/bbrc/13.14/98
- [33] Ning Dong, a Xuemei Yang, Edward Wai-Chi Chan, Rong Zhang, c and Sheng Chen. (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *eBioMedicine*, 79. Doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103998

- [34]Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., & Desjardins, R. (1999). *LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. Journal of Microbiological Methods, 37(1), 77–86.* doi:10.1016/s0167-7012(99)00048-2
- [35]Thorsten Wolff, Michael Veit. (2021). Influenza B, C and D Viruses (*Orthomyxoviridae*). *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)*. 2. 561-574. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21505-7
- [36] Del Rosario Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M. (2004). *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 22(4), 238–245.* doi:10.1016/s0213-005x(04)73073-6
- [37]Souza, G., Shitut, S., Preussger, D., Yousif, G., Waschina, S., & Kost, C. (2018). *Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. Natural Product Reports, 35(5), 455–488.* doi:10.1039/c8np00009c
- [38]Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., & Fanning, S. (2014). *Bacteria: Other Pathogenic Enterobacteriaceae – Enterobacter and Other Genera. Encyclopedia of Food Safety, 1, 433–441.* doi:10.1016/b978-0-12-378612-8.00104-9
- [39]Wang, M.-Q., Wang, Z., Yu, L.-N., Zhang, C.-S., Bi, J., & Sun, J. (2019). *Pseudomonas qingdaonensis sp. nov., an aflatoxin-degrading bacterium, isolated from peanut rhizospheric soil, 201, 673-578. Archives of Microbiology.* doi:10.1007/s00203-019-01636-w
- [40]Trevors, J. T. (2011). *Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. Journal of Microbiological Methods, 86(2), 266–273.* doi:10.1016/j.mimet.2011.04.018