



DESCUBRIENDO NUEVOS ANTIBIÓTICOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS DEL SUELO

Trabajo de Fin de Grado

2018-2019

Diego Arnal Sáez



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Supervisado por:

-Elena González Biosca

-Sergi Maicas Prieto

-Àngela Figàs Segura

Índice

Introducción	7
1. El Aprendizaje-Servicio	9
1.1. ¿Qué es el Aprendizaje-Servicio?	9
1.2. Proyectos Natura	11
1.3. <i>Small World Initiative</i>	12
2. Resistencias bacterianas	14
2.1. Introducción	14
2.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos	16
2.3. Posibles soluciones	18
3. Objetivos	19
Material y métodos	21
1. Ejecución del proyecto <i>Aula Natura</i> en IES	23
2. Ejecución del proyecto <i>Aula Natura</i> en CEIP	33
3. Jornada de Clausura del proyecto <i>SWI</i>	41
4. Experiencia <i>Aula Natura</i>	42
5. Caracterización de cepas bacterianas	45
Resultados y discusión	51
1. Actividades en bachillerato y primaria	53
2. Experiencia	56
3. Valoración del proyecto a nivel didáctico	57
4. Caracterización inicial de aislados bacterianos	62
Bibliografía y webgrafía	67

Resumen

El abuso y/o uso inadecuado de antibióticos es actualmente un grave problema en nuestra sociedad que hace que los microorganismos adquieran resistencias frente a estos compuestos antimicrobianos. Estas resistencias son debidas a la presión de selección que ejercemos sobre los microorganismos, lo que dificulta el tratamiento de las enfermedades que causan algunos de ellos. Por lo tanto, se hace necesario la búsqueda de nuevos antibióticos mediante distintas estrategias, siendo una de ellas la relacionada con la participación ciudadana. El objetivo principal del presente proyecto, basado en una estrategia de Aprendizaje-Servicio (ApS), se ha centrado en la realización de una propuesta educativa con el fin de ofrecer un servicio a la comunidad como es el de encontrar bacterias del suelo potencialmente productoras de antibióticos. Al mismo tiempo, durante su desarrollo, los alumnos participantes tienen la oportunidad de aprender a desenvolverse en un ambiente científico, así como contribuir a la divulgación de una serie de conocimientos básicos acerca de los antibióticos, al tiempo que complementar su formación curricular. Otro propósito del proyecto ha sido identificar una selección de las bacterias del suelo potencialmente productoras de antibióticos para abrir paso a nuevas líneas de investigación.

A lo largo de la realización del proyecto se ha llevado a cabo la formación de alumnos de diferentes niveles educativos (bachillerato y primaria) mediante sesiones teórico-prácticas para concienciarlos sobre el problema de las resistencias a antibióticos, además de que aprendieran a desenvolverse y a desarrollar el pensamiento científico y fomentar su vocación investigadora. También se pretendía que los alumnos participantes en dichas actividades aprendieran y divulgasen la relación que hay entre ciencia y sociedad. Los resultados de las sesiones teórico-prácticas con los alumnos han demostrado que su interés por la ciencia se incrementó notablemente a la par que aprendieron y asimilaron los nuevos conceptos que se les pretendía transmitir y que se adaptaron y transmitieron a otros compañeros y a familiares. Estos resultados también han evidenciado la eficiente aplicación de la práctica experimental en el aprendizaje científico. Por otra parte, a lo largo de la ejecución del proyecto se consiguió aislar una diversidad de bacterias del suelo y ensayar su actividad antimicrobiana frente a otras bacterias testigo. Los resultados demostraron el aislamiento de diversas bacterias potencialmente productoras de antibióticos, algunas de las cuales se caracterizaron posteriormente con objeto de identificarlas. Su identificación ha relevado una diversidad de especies de bacterias del suelo, algunas de las cuales se han descrito como productoras de antibióticos.

Palabras clave: Aprendizaje-Servicio, ciencia ciudadana, antibióticos, selección, microorganismos, bacterias, medio ambiente, resistencias microbianas.

INTRODUCCIÓN

1. El Aprendizaje-Servicio

1.1 ¿Qué es el Aprendizaje-Servicio?

Las asignaturas de ciencias suelen estudiarse usando técnicas de enseñanza magistrales, basadas principalmente en la impartición de clases teóricas en aula. La necesidad de aplicar nuevas técnicas basadas en prácticas concretas o un acercamiento al método y trabajo científico lleva al desarrollo de otras más innovadoras como el Aprendizaje-Servicio (ApS).

Uno de los grandes problemas actuales en la educación científica es la reducción del interés por la materia por parte de los alumnos. Un enfoque más dinámico es una solución eficiente frente a este problema en la sociedad actual (Cervelló *et al.*, 2009). El presente proyecto basado en un modelo ApS busca, entre otros objetivos, la recuperación del interés por la ciencia utilizando una estrategia de alfabetización científica: apropiación de conocimientos, habilidades y aptitudes básicos respecto de la ciencia, la tecnología y sus relaciones con la sociedad, que permita a los estudiantes conectar la ciencia con los aspectos más cotidianos de sus vidas (Sabariego y Manzanares, 2006).

El ApS es una propuesta educativa que desarrolla en un único proyecto procedimientos de aprendizaje y de servicio a la comunidad, puesto que la formación de los estudiantes se hace significativa cuando se conectan sus motivaciones y experiencias vitales, en el cual los participantes se forman al implicarse en necesidades reales del entorno con la finalidad de mejorarlo. Por tanto, se combina el currículum académico con un compromiso con la comunidad y también se favorece la divulgación de un proyecto (Ferran-Zubiaga y Guniot-Viciano, 2012), por lo que resulta una experiencia innovadora, pero al mismo tiempo repleta de componentes familiares: el servicio voluntario a la comunidad y el aprendizaje de conocimientos y habilidades.

Teniendo en cuentas estas características, en los proyectos basados en estrategias de ApS se da gran importancia tanto a la participación de las personas como a la implicación de estas en el proyecto, realizando actividades supeditadas al interés común de la sociedad. Sin embargo, un proyecto de ApS no se debe confundir con un voluntariado. La principal diferencia entre ellos es la importancia que se da al aprendizaje. Así pues, un voluntariado está principalmente enfocado a un determinado servicio a la comunidad, restándole relevancia a la parte del aprendizaje. Sin embargo, un proyecto de ApS intenta darle la misma importancia tanto al aprendizaje de las personas que realizan el proyecto como al servicio que se presta a la sociedad (Casado, 2015).

Los proyectos que utilizan estrategias de ApS hoy en día son muchos, y se aplican en un gran número de países. Además, la utilización de estas estrategias de ApS puede ser útil en cualquier nivel educativo, tanto en universidad como en institutos, colegios y otros centros (Zunzunegui, 2017). En la **Tabla 1** se muestran diversos ejemplos de proyectos de temática medioambiental en los que se utilizan estrategias ApS.

Tabla 1. Ejemplos de proyectos ApS medioambientales de diferentes países.

País	Categoría	Tema del proyecto	Recurso bibliográfico
EE.UU	Ecoarquitectura	Diseño de un “tejado verde”	Field y Hall (2014)
	Contaminación	Limpieza del Arroyo Reedy	Parece y Aspaas (2007)
Canadá	Agroecología	Teoría y práctica en la seguridad alimentaria	Baker (2015)
	Rehabilitación y restauración de ecosistemas	Ecología de la restauración	University of Toronto-Mississauga
México	Educación ambiental	Del aprendizaje en el servicio al medio ambiente	Beltrán (2013)
	Energía y transporte	Troyanos en bici	Peñúñuri (2013)
Colombia	Agroecología	Garittea del campo al campus	Arboleda <i>et al.</i> (2016)
	Educación ambiental	Proyecto Sendero de Vida	Arboleda <i>et al.</i> (2016)
Ecuador	Agroecología	Capacitación para la creación de huertos caseros por el método de la hidroponía	Pontificia Universidad Católica del Ecuador (2014)
India	Educación ambiental	Ecoiniciativas para la conservación del medio ambiente y la gestión de la salud	Jeyaraj (2011)
	Educación ambiental	Sistematización de los métodos de reciclaje y nueva utilidad de los recicladores	Jeyaraj (2011)

Adaptada de: Zunzunegui, 2017.

El ApS como estrategia de aprendizaje aporta una gran cantidad de beneficios a los estudiantes que realizan las actividades (**Tabla 2**).

Tabla 2. Resultados de estrategias ApS de calidad en los estudiantes.

Beneficios sociales y pedagógicos de proyectos de Aprendizaje-Servicio en los estudiantes	
Fortalece el compromiso académico	Ayuda a los estudiantes a responder a la pregunta “¿Por qué estoy aprendiendo esto?” y promueve en ellos la exhibición de comportamientos académicos positivos.
Incrementa la asistencia escolar	Los estudiantes se entusiasman con el aprendizaje, por lo que continúan con su educación y adquieren las habilidades necesarias para contribuir a la sociedad.
Conecta a los estudiantes con su comunidad	Les permite creer que pueden cambiar la sociedad.
Reduce comportamientos de riesgo	Previene la violencia y el fracaso escolar.

Adaptada de: Ryan, 2012.

1.2 Proyectos Natura

El presente proyecto ApS forma parte del programa “Proyectos Natura” de la Universitat de València. Este programa trata de unir el trabajo realizado por diferentes proyectos de ApS y fomentar la interacción entre diferentes etapas educativas, durante la creación y desarrollo de proyectos fundamentalmente de ciencias naturales.

El Proyecto Natura se centra en la conexión entre tres niveles educativos: universidad, bachillerato/secundaria y primaria. Se fundamenta en un programa de innovación educativa que pretende formar científicamente a los estudiantes de diferentes niveles educativos mediante sesiones adaptadas. Así pues, los participantes de los diferentes proyectos denominados bajo el nombre de “Aula Natura” son tanto estudiantes como profesores de la Universitat de València, institutos y colegios de la Comunidad valenciana.

La estructura común de estos proyectos permite dividirlos en tres bloques:

1. Realización del proyecto en los institutos, guiado por estudiantes de la universidad que actúan como monitores y supervisado por profesores de la universidad.
2. Realización del proyecto en los colegios guiado por estudiantes de los institutos que actúan como monitores, supervisados por los estudiantes de la universidad y profesorado del instituto.
3. El producto final del proyecto viaja a Expociencia, un evento celebrado en el Parque Científico de la Universitat de València (UV) que recoge anualmente la visita de miles de ciudadanos, entre ellos muchos estudiantes de diferentes edades. Este evento les permite conocer de cerca la ciencia realizada en la UV como en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Los proyectos Natura tienen un elevado grado de multidisciplinaridad, abarcando múltiples temas que tienen como nexo común su relación con las ciencias naturales y del medio ambiente. El interés del proyecto reside en el hecho de que la enseñanza se imparte por estudiantes de universidad a estudiantes de bachillerato y posteriormente por estos últimos a estudiantes de primaria. Constituye una buena estrategia educativa, ya que los estudiantes de bachillerato son capaces de reforzar sus conocimientos por el hecho de ser responsables de transmitirlos a otros estudiantes más jóvenes, a la par que los estudiantes de primaria aprenden nuevos conceptos. Además, interactuar con otros estudiantes es una experiencia que refuerza positivamente las competencias sociales de los mismos (Abrahamsen, 2014).

El proyecto que se presenta en este trabajo surge de otro proyecto denominado ***Small World Initiative***, centrado en el descubrimiento de nuevos antibióticos para afrontar la emergencia de las resistencias microbianas a los antibióticos.

1.3 *Small World Initiative (SWI)*

La iniciativa internacional *Small World Initiative (SWI)* es un proyecto de ciencia ciudadana que nace con el objetivo de descubrir nuevos antibióticos y fomentar la cultura científica. Se originó en 2012 en la universidad estadounidense de Yale. Mediante una estrategia de *crowdsourcing* (micromecenazgo), dirigida al descubrimiento de nuevos antibióticos, pretende acercar la cultura científica y la investigación biomédica a niveles educativos preuniversitarios para fomentar la vocación investigadora. Emulando el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, de una manera organizada y participativa, persigue involucrar a un grupo numeroso de personas voluntarias, a través de una convocatoria abierta, con el objetivo de implicar a la ciudadanía en la expansión del conocimiento científico. La temática del proyecto está enfocada a la búsqueda de nuevos antibióticos producidos por bacterias del suelo. En paralelo, se concientiza sobre los peligros relacionados con las resistencias microbianas y se fomenta el conocimiento científico entre los estudiantes. La iniciativa llegó a España en 2017, con la creación de la red SWI@Spain, en la que la UV (SWI@Valencia), participa como miembro fundador.

El proyecto SWI@Valencia adapta la iniciativa internacional mediante la realización de sesiones prácticas en centros educativos preuniversitarios apoyándose inicialmente en alumnos de grado. Una vez formados, estos transmiten la temática a alumnos de Enseñanza Secundaria Obligatoria (ESO) o de Bachillerato de diferentes colegios e institutos de educación secundaria (IES). Aunque el proyecto tradicionalmente se ha enfocado a ese nivel, este curso 2018-2019 el proyecto SWI viaja también a colegios de primaria. Esta innovación surge gracias al programa “Proyectos Natura”.

Los objetivos que se buscan cumplir son los siguientes:

- Divulgar la ciencia.
- Crear sensibilidad respecto a las resistencias a antibióticos.
- Despertar espíritu científico.
- Mejorar la formación científica.
- Incentivar la cooperación entre los estudiantes.
- Abrir paso al descubrimiento de bacterias productoras de nuevos antibióticos.

La realización de este proyecto en los diferentes niveles educativos, implica la ampliación y complementación del contenido curricular dentro de las asignaturas de Biología y Geología, para el nivel de bachillerato, y de Ciencias Naturales en el caso de Educación Primaria.

En la **Tabla 3** se pueden apreciar los bloques temáticos relacionados con el proyecto y las competencias clave que los estudiantes adquieren y ponen en práctica en cada bloque.

Las **competencias clave** son uno de los elementos que integran el currículo y que se definen como las capacidades para aplicar de forma integrada los contenidos propios de cada enseñanza y etapa educativa, con el fin de lograr la realización adecuada de actividades y la resolución eficaz de problemas complejos. Por tanto, según la Ley Orgánica Ley Orgánica

8/2013, de 9 de diciembre, para la mejora de la calidad educativa, las competencias clave que se establecen para la educación primaria y secundaria son las siguientes:

- CCLI: Competencia comunicación lingüística.
- CMCT: Competencia matemática y competencias básicas en ciencia y tecnología.
- CD: Competencia digital.
- CAA: Competencia aprender a aprender.
- CSC: Competencias sociales y cívicas.
- SIEE: Sentido de iniciativa y espíritu emprendedor.
- CEC: Consciencia y expresiones culturales.

Tabla 3. Bloques temáticos, principales contenidos y competencias clave de las asignaturas relacionadas con el proyecto de cada nivel educativo.

Nivel educativo	Asignatura	Bloque temático	Contenido principal	Competencias clave
Bachillerato	Biología y Geología	La organización celular	Modelos de organización celular: Célula procariota y eucariota.	CMCT, CD
		La biodiversidad	De cinco reinos a tres dominios. Concepto de biodiversidad.	CMCT, CSC
		Metodología científica	Características básicas de la metodología científica. La experimentación en Biología y Geología.	CMCT, CSC, CCLI, CAA, CD
Primaria	Ciencias naturales	El ser humano y la salud	Enfermedades que afectan a aparatos y sistemas.	CMCT, SIEE
		Los seres vivos	La célula. Tipos de células.	CMCT, CSC

Adaptada de DOGV, Decreto Currículum 87/2015.

2. Resistencias bacterianas

2.1 Introducción

El descubrimiento y comercialización de antibióticos para tratar infecciones bacterianas revolucionó la medicina moderna. Entre 1930 y 1970 se vivió la era dorada de los antibióticos, en la que estos supusieron un tratamiento eficaz frente a las infecciones bacterianas. El uso de antibióticos es imprescindible en un gran número de intervenciones médicas, tales como tratamientos preventivos, trasplante de órganos, cesáreas y otras intervenciones, para evitar posibles infecciones bacterianas que supongan un riesgo para el paciente (Kathrin, 2016).

La emergencia de resistencias bacterianas frente a antibióticos que anteriormente tenían un alto espectro de acción frente a muchas especies de bacterias es un claro ejemplo de adaptación evolutiva. Las bacterias generan mecanismos de defensa altamente específicos frente a estos antibióticos mediante estrategias tales como adaptaciones mutacionales, adquisición de material genético o alteración de la expresión génica (Munita y Arias, 2016).

Según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (del inglés *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC), en 2013 al menos dos millones de personas enfermaron debido a infecciones producidas por bacterias resistentes a antibióticos, de las cuales 23.000 murieron. *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Salmonella* son algunos ejemplos (*Antibiotic resistance threats in the United States*, 2013).

No obstante, el problema puede llegar a ser más grave. En 2016 se estimaba que en 2050 se podrían producir 10 millones de muertes anuales prematuras como consecuencia de las resistencias a antibióticos (O' Neil, 2016). El foco del problema, sin embargo, no se debe a las resistencias que las bacterias generan frente a un antibiótico en particular, sino a las resistencias que generan frente a un alto número de antibióticos diferentes (multirresistencia, extrarresistencia y panresistencia) (Magiorakos et al., 2012). Una infección producida por una bacteria que resiste diferentes tratamientos termina provocando inevitablemente la muerte de la persona infectada en muchas ocasiones.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en febrero de 2017 una lista de bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos, basándose en la opinión de expertos internacionales (**Tabla 4**). Los criterios para su realización fueron varios, como por ejemplo la letalidad de las infecciones que producen estas bacterias, si estas se pueden prevenir con facilidad, si el tratamiento requiere una hospitalización larga, etc.

La liberación constante de antibióticos al medio ambiente y su consumo irresponsable son el foco del problema, debido a que cuanto más tiempo permanezcan los microorganismos en contacto con estos compuestos, mayor será la presión de selección y la probabilidad de que se adapten generando resistencias. Según la OMS la automedicación y la finalización prematura de tratamientos con antibióticos forman parte de las causas del problema.

Tabla 4. Lista de la OMS de patógenos bacterianos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos.

Prioridad	Bacteria	Resistencia
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenémicos
Elevada	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina, con sensibilidad intermedia, y vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter</i> spp.	Fluoroquinolonas
	<i>Salmonellae</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporina y fluoroquinolonas
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolonas

Datos obtenidos de: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (Fecha de consulta: 08/05/2019)

Por otra parte, el uso indiscriminado e inconsciente de los antibióticos en granjas también supone una amenaza. Además de incidir sobre los microorganismos que se quiere eliminar, inciden sobre los de la microbiota intestinal, que generan resistencias para sobrevivir y se acumulan en el tracto intestinal. Cuando se liberan al medio junto con heces u orina, pasan a formar parte de los ciclos ambientales junto con los antibióticos (**Figura 1**).

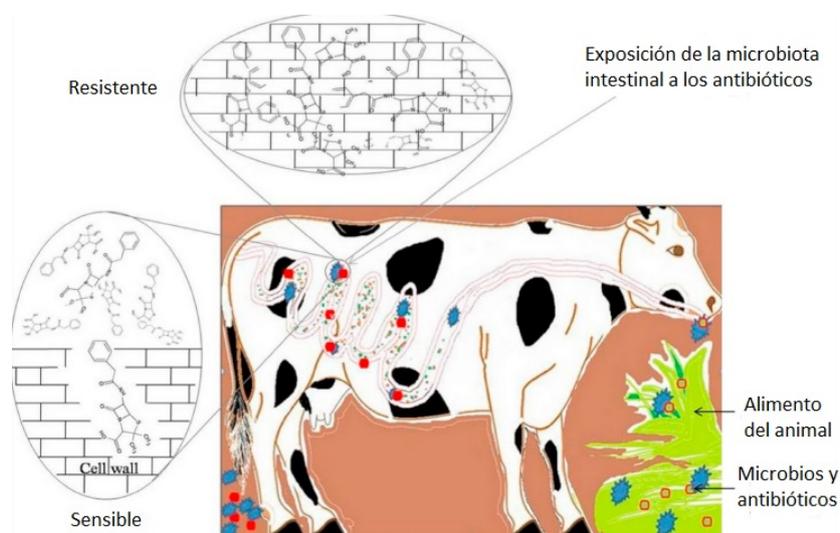


Figura 1. Diversidad de bacterias “no-diana” afectadas por los antibióticos a través de la alimentación en granjas. Figura adaptada de: Kumar *et al.*, 2019.

En las piscifactorías tenemos otro ejemplo. Las bacterias marinas enteropatógenas del género *Vibrio*, asociadas con enfermedades como la gastroenteritis, se han vuelto resistentes a una gran variedad de antibióticos debido a su uso indiscriminado (Matamp y Bhat, 2019).

2.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos

Los antibióticos pueden inhibir o interferir en la replicación, la transcripción y/o la traducción afectando a la síntesis de material genético y de proteínas (**Figura 2**). También pueden actuar inhibiendo la síntesis de ácido fólico y/o la de purinas, sin las cuales no se pueden sintetizar los ácidos nucleicos o afectar a la pared celular y a la membrana citoplasmática (Madigan *et al.*, 2015).

La acción de los antibióticos puede ser bactericida, bacteriostática o bacteriolítica (Madigan *et al.*, 2015). Los bactericidas matan a la célula bacteriana y los bacteriolíticos la lisan (ambos de manera irreversible). Los bacteriostáticos no provocan la muerte celular pero inhiben la síntesis de componentes esenciales para las bacterias de forma competitiva, evitando que puedan reproducirse. Sin embargo, estos últimos tienen un efecto reversible, debido a que si se retira el antibiótico del medio las bacterias pueden retomar su reproducción. A veces, el efecto bacteriostático o bactericida del antibiótico depende de la concentración del mismo.

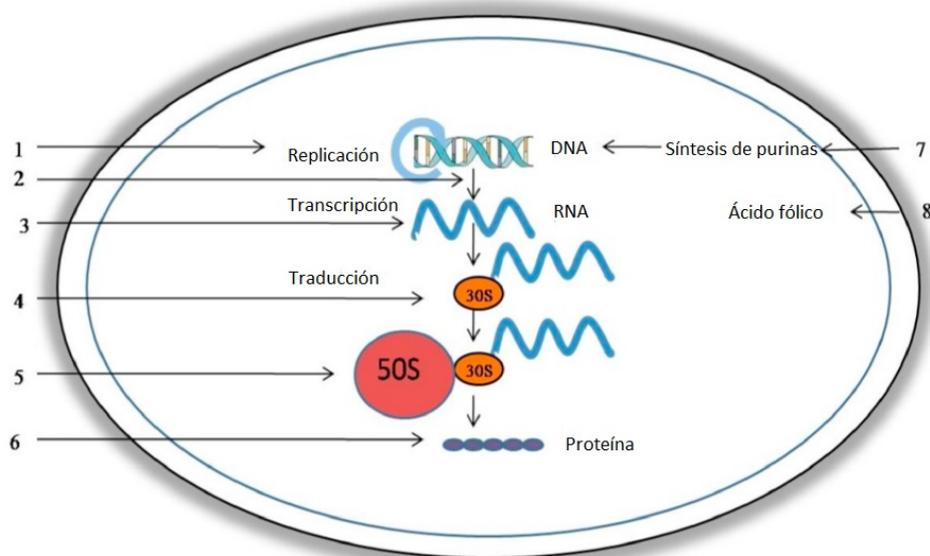


Figura 2. Representación de las diferentes dianas citoplasmáticas de los antibióticos de una célula bacteriana. Adaptada de: Kumar *et al.*, 2019.

Como ya hemos apuntado, el citoplasma bacteriano no es la única diana de los antibióticos, debido a que muchos de ellos son capaces de actuar en la pared y membrana celular. Las bacterias se adaptan cuando hay una fuerte presión de selección. En este caso, los antibióticos son los que ejercen esa presión. Las bacterias se reproducen y generan poblaciones resistentes a los tratamientos a los que antes eran sensibles.

Los mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos se clasifican de la siguiente manera:

2.2.1 Modificaciones moleculares.

Alteraciones químicas

Las bacterias pueden desarrollar la capacidad de sintetizar enzimas que modifiquen químicamente el antibiótico. Estas modificaciones pueden ser acetilaciones (aminoglicósidos, cloranficol y estreptograminas), forforilaciones (aminoglicósidos y cloranficol) o adenilaciones (aminoglicósidos y lincosamidas). Uno de los mejores ejemplos son las enzimas modificantes de aminoglicósidos (en inglés, AMEs), descritas en una gran variedad de bacterias (Ramírez y Tomalsky, 2010).

Destrucción del antibiótico

Es el mecanismo de resistencia más común frente a antibióticos betalactámicos. En este caso actúan las betalactamasas, enzimas que rompen el anillo betalactámico. El auge de bacterias productoras de betalactamasas se ha convertido en un gran problema de salud pública en el siglo XXI (Medina y Pieper, 2016).

2.2.2 Disminución de la penetración del antibiótico y bombas de eflujo.

Algunos antibióticos actúan en el citoplasma de las bacterias y otros en la membrana celular o en la pared celular. También en la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. En cualquier caso, deben llegar a su diana. Por su parte, las bacterias son capaces de generar mecanismos que les permiten modificar sus paredes celulares para reducir la permeabilidad frente a los antibióticos. Los mecanismos más comunes tienen relación con las porinas, ya sea modificando su nivel de expresión como el del tipo de porina que se expresa (Pagès *et al.*, 2008).

Otro mecanismo de resistencia son las **bombas de eflujo**, maquinarias moleculares que expulsan fuera de la célula componentes tóxicos. Necesitan un aporte de energía aportado por la hidrólisis de ATP y el bombeo de protones (H^+) para funcionar. Hay cinco familias principales de bombas de eflujo que difieren en términos de conformación estructural, fuente de energía, rango de sustancias que expulsan y organismos en las que se encuentran (**Figura 3**).

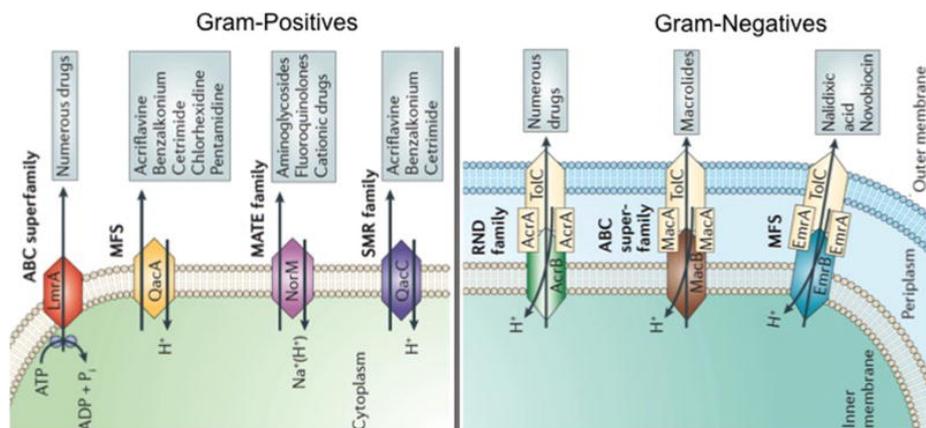


Figura 3. Resumen de los principales mecanismos de las bombas de eflujo en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Fuente: Munita y Arias, 2016.

2.2.3 Cambios en las dianas de actuación de los antibióticos.

Estos cambios pueden ocurrir debido a mutaciones en las dianas de actuación. Un ejemplo es el de la rifamicina, un antibiótico con cinco subunidades proteicas capaz de bloquear la RNA-polimerasa DNA dependiente, que es la enzima que se encarga de transcribir el DNA a RNA. La rifamicina actúa sobre la subunidad β , bloqueándola e impidiendo la transcripción. Sin embargo, mutaciones en el gen *rpoB* (que codifica esta subunidad) han permitido reducir la afinidad por el antibiótico y en consecuencia la resistencia al mismo (Floss y Yu, 2005).

2.3 Posibles soluciones

Ante esta situación potencialmente tan peligrosa existen dos caminos a seguir. Uno de ellos consiste en buscar alternativas al uso de antibióticos, como por ejemplo el uso de bacteriófagos (Lin *et al.*, 2017) o bien técnicas de ingeniería genética para tratar infecciones (Krishnamurthy *et al.*, 2016). Diferentes herramientas moleculares/genéticas que se han mostrado eficaces frente a determinadas bacterias resistentes a antibióticos (Tabla 5).

Tabla 5. Herramientas de ingeniería genética disponibles para utilizar en diferentes bacterias resistentes a antibióticos.

Herramienta	Metodología	Especies patógenas
Recombinación	Recombinación homóloga de DNA lineal utilizando enzimas λ -Red. Gam, Exo y Bet.	<i>Salmonella enterica</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptomyces coelicolor</i> <i>Shigella dysenteriae</i>
pORTMAGE	<i>Portable Multiplex Automated Genome Engineering</i> (MAGE)	<i>S. enterica</i>
Targetrones	Utilización de intrones de grupo II mediante <i>splicing</i> reverso e inserción en el genoma	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Ingeniería de fagos y CRISPR/Cas9	Utilización de la técnica CRISPR/Cas9.	Enterobacterias resistentes a carbapenem <i>E. coli</i> enterohemorrágica
RNA antisentido	Silenciamiento post-transcripcional de genes	<i>S. aureus</i> <i>S. coelicolor</i>

Adaptada de: Krishnamurthy *et al.*, 2016.

El otro camino consiste en la búsqueda de nuevos antibióticos producidos naturalmente por bacterias en diferentes nichos, preferentemente en ambientes poco explorados. Tradicionalmente, tanto el suelo como los ambientes marinos han sido un reservorio de bacterias productoras de antibióticos al que se ha recurrido para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. La búsqueda de nuevos antibióticos eficaces en

estos ambientes sigue siendo una alternativa, aunque también se han descubierto metabolitos secundarios con potenciales terapéuticos en la microbiota humana (Milshteyn *et al.*, 2018).

En relación a los ambientes naturales, el suelo es una fuente de nuevos antibióticos debido a la gran cantidad y diversidad de bacterias que lo habitan. Alberga una diversidad extraordinaria de organismos que participan en funciones clave para la biosfera, tales como el reciclado de nutrientes, el equilibrio entre el secuestro y la emisión de gases a la atmósfera y la transformación de sustancias tóxicas. Los microorganismos desempeñan un papel destacado en los ciclos biogeoquímicos y en la fertilidad del suelo al reciclar los nutrientes y devolverlos al medio natural (Uroz *et al.*, 2015). Transforman una cantidad enorme de materia orgánica y solamente ellos pueden realizar ciertas transformaciones esenciales (Madigan *et al.*, 2015). Por tanto, el suelo no es un material inerte, sino que está formado por una gran cantidad y diversidad de microorganismos (bacterias, hongos, protozoos y en menor medida algas) que interactúan para sobrevivir. Una de las interacciones que permite sobrevivir a una determinada especie frente a otras es la producción de compuestos antimicrobianos. (Madigan *et al.*, 2015; Uroz *et al.*, 2015).

3. Objetivos

Los objetivos del presente proyecto ApS se centran en la divulgación de una serie de conocimientos básicos relacionados con el problema que ha desencadenado el abuso y mal uso de los antibióticos. De manera pormenorizada establecemos tres bloques:

- Objetivos de divulgación:
 - Despertar la sensibilidad respecto a las resistencias bacterianas a antibióticos.
 - Transmitir conocimientos básicos relacionados con las resistencias bacterianas al alumnado de bachillerato y primaria para tratar de reducir el problema.
- Objetivos de aprendizaje:
 - Despertar el interés científico de los estudiantes de bachillerato y primaria.
 - Transmitir a los estudiantes de bachillerato y primaria conocimientos adaptados, tanto teóricos como prácticos, acerca de temas de interés científico.
 - Mejorar la cultura y la formación científica de los estudiantes de bachillerato y primaria.

Objetivos experimentales:

- Determinar el grado de diversidad bacteriana presente en el suelo.
- Encontrar bacterias productoras de nuevos antibióticos que puedan servir para combatir enfermedades producidas por bacterias multirresistentes.
- Identificar las bacterias potencialmente productoras de nuevos antibióticos frente a microorganismos testigo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ejecución del proyecto *Aula Natura* en el IES

En una primera fase se realizaron sesiones de formación para los estudiantes de la universidad, *SWI Training Assistant* (SWITA), impartidas por profesores del departamento de Microbiología de la Universitat de València, *SWI Personal Instructor* (SWIPI). Una vez realizadas estas sesiones, los estudiantes están preparados para reproducirlas en institutos y colegios. Elegimos al **IES Vicent Andrés Estellés** para participar en el presente proyecto. Un total de 16 alumnos de bachillerato supervisados por su profesorado han participado en el proyecto, realizando 6 sesiones de formación (**Tabla 6**):

Tabla 6. Sesiones prácticas realizadas en el IES Vicent Andrés Estellés.

Sesión	Fecha
Día 1) Presentación y moderación de un debate en el IES sobre el problema de la resistencia bacteriana a antibióticos y su impacto socioeconómico. Explicación de la metodología para tomar muestras de suelo.	01/02/2019
Día 2) Desarrollo de la práctica en el laboratorio del IES: siembra de muestras de suelo en placas de medio de cultivo para bacterias.	05/02/2019
Día 3) Desarrollo de la práctica en el laboratorio del IES: aislamiento de microorganismos potencialmente productores de antibióticos.	08/02/2019
Día 4) Desarrollo de la práctica en el laboratorio del IES: ensayo frente a bacterias testigo para evaluar la posible producción de antibióticos.	15/02/2019
Día 5) Observación e interpretación de resultados. Preguntas propuestas para los estudiantes. Realización de encuestas. Propuesta de pósters y videos para la Jornada de Clausura.	22/02/2019

Sesión 1. Toma de muestra de suelo

El primer objetivo de esta sesión fue que los estudiantes entendieran una serie de conceptos básicos, así como el problema asociado al abuso y/o mal uso de antibióticos, tanto en ambientes domésticos como laborales. Además, se les animó a participar en un debate interactivo en el que pudieran resolver sus dudas acerca de las resistencias que generan las bacterias frente a los antibióticos y el peligro que hay detrás de esto.

El segundo objetivo consistió en que dominaran los procedimientos experimentales asociados al proyecto. Los 16 alumnos se agruparon por parejas y se le asignó un código. Posteriormente, se explicó el primer experimento a realizar, consistente en la recogida aseptica de muestras de suelo para posteriormente aislar microorganismos.

Material

- Hoja de datos y bolígrafo.
- Teléfono móvil para registrar las coordenadas geográficas del lugar de procedencia de la muestra de suelo.
- *Kit* de recogida de muestras (en bolsa sellada):
 - Tubo estéril de plástico de 15 mL.
 - Bote estéril de 100 mL.
 - Espátula estéril.
 - Dos guantes de látex o vinilo.

Procedimiento

1. Seleccionar el lugar donde se va a tomar la muestra.
2. Anotar todos los datos en la hoja de toma de muestras.
3. Ponerse los guantes y excavar con la ayuda de la espátula que hay en el kit para recoger la tierra.
4. Abrir el tubo de 15 mL y tomar una muestra de aproximadamente 1 gramo de suelo.
5. Abrir el bote de 100 mL y llenarlo con una muestra de suelo sin raíces ni piedras.
6. Rotular el tubo con el código correspondiente al grupo y la fecha.
7. Guardar la muestra protegida de la luz solar a temperatura ambiente.

En la **Figura 4** se muestra el procedimiento de muestreo.



Figura 4. Estudiante de 1º de bachillerato del IES Vicent Andrés Estellés recogiendo una muestra de suelo.

Sesión 2. Cultivando la biodiversidad

El objetivo principal de esta sesión fue el aislamiento y cultivo de bacterias a partir de las muestras de suelo obtenidas en la sesión 1. Se realizaron diluciones decimales seriadas a partir de las cuales se sembraron alícuotas (aproximadamente 0,1 mL) en placas con medio de cultivo sólido. Se utilizó el medio de cultivo general para bacterias Agar Triptona Soja (TSA, del inglés *Tryptic Soy Agar*) (Laboratorios CONDA) diluido 1/10 (TSA 1/10) para disminuir su contenido en nutrientes y así favorecer el crecimiento de bacterias que están adaptadas a ambientes oligotróficos (el suelo). Una vez sembradas las placas, se incubaron a temperatura ambiente en condiciones aerobias durante varios días para observar los resultados en la siguiente sesión.

Material

- Tubo con la muestra de suelo.
- Tres placas Petri con medio de cultivo TSA 1/10.
- Cinco tubos de 15 mL estériles con 9 mL de agua destilada estéril.
- Cinco pipetas Pasteur estériles desechables.
- Un asa Digiralsky estéril desechable.
- Una bata de plástico por estudiante.
- Un par de guantes por estudiante.
- Un contenedor para recoger el material utilizado.

Antes de la realización de la sesión en el instituto, se prepararon las placas con el medio de cultivo y los tubos de agua destilada estéril en el laboratorio de la universidad.

Procedimiento

1. Rotular una batería de cuatro tubos estériles de manera ordenada con las diluciones decimales seriadas que se van a realizar (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) y tres placas Petri con TSA 1/10 (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}).
2. Añadir 9 mL de agua destilada estéril al tubo que contiene 1 g de la muestra de suelo.
3. Transferir con una pipeta Pasteur estéril desechable 1 mL de la muestra bien homogeneizada al primer tubo (marcado 10^{-1}) que contiene 9 mL de agua destilada y mezclar bien.
4. Repetir el proceso con cuidado hasta realizar las cuatro diluciones decimales seriadas respecto a la muestra original. En la **Figura 5** se representa la forma correcta de realizarlo.
5. Empezar por la dilución más diluida, tomando 2 gotas de cada muestra con la pipeta Pasteur estéril desechable y extender sobre la superficie del medio de cultivo de las placas correspondientes con la ayuda de un asa Digiralsky estéril desechable.
6. Incubar las placas inoculadas a temperatura ambiente durante varios días hasta la observación de colonias visibles en la superficie del agar.

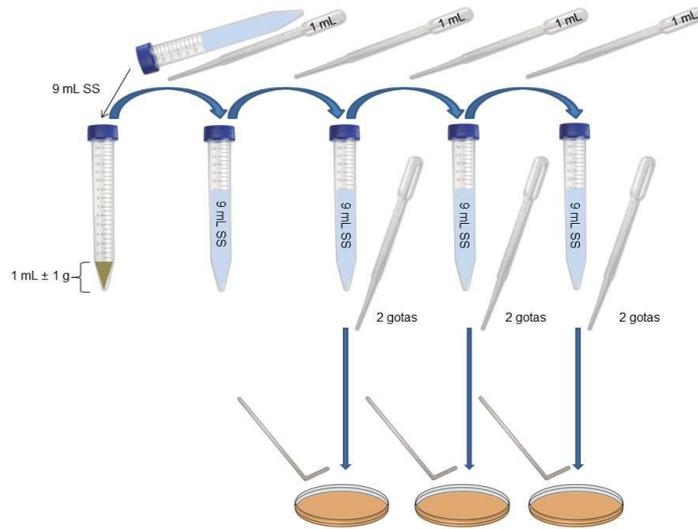


Figura 5. Esquema del procedimiento de diluciones decimales seriadas a realizar durante la sesión.
 Fuente: Manuales SWI 2018-2019. (Roderic: <http://hdl.handle.net/10550/63494>)

En la **Figura 6** se pueden observar tanto los tubos como las placas Petri que utilizaron los estudiantes para realizar la actividad.

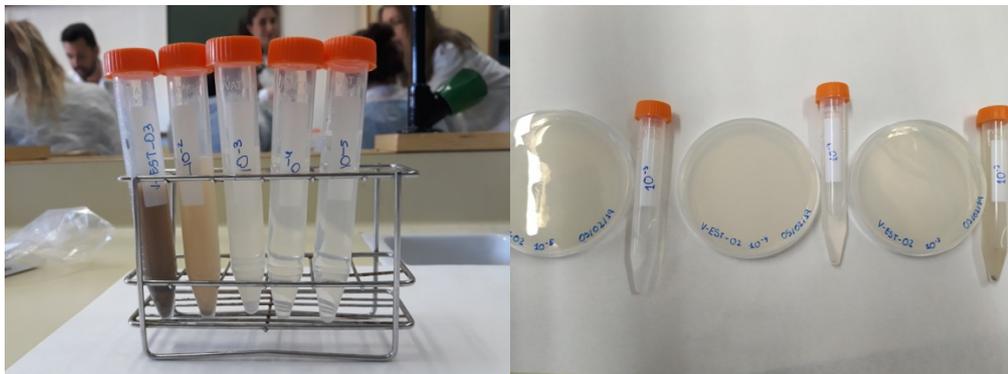


Figura 6. Diluciones realizadas por los estudiantes en los respectivos tubos y placas Petri con TSA 1/10 en las cuales se aislaron y cultivaron microorganismos de las diferentes muestras de suelo.

Sesión 3. Aislamiento de bacterias

Los objetivos de esta sesión fueron que los estudiantes visualizaran la gran diversidad de bacterias del suelo, que las cuantificaran y que seleccionaran algunas de ellas para realizar posteriormente un ensayo de antibiosis. En la **Figura 7** se muestra una placa representativa en la que se observan diferentes colonias de bacterias crecidas en TSA 1/10. Cada pareja de estudiantes debía aislar 20 colonias de aspecto diferente a partir de una placa madre. Las colonias se eligieron en base a varios criterios: diferente forma, color, tamaño, elevación, etc.

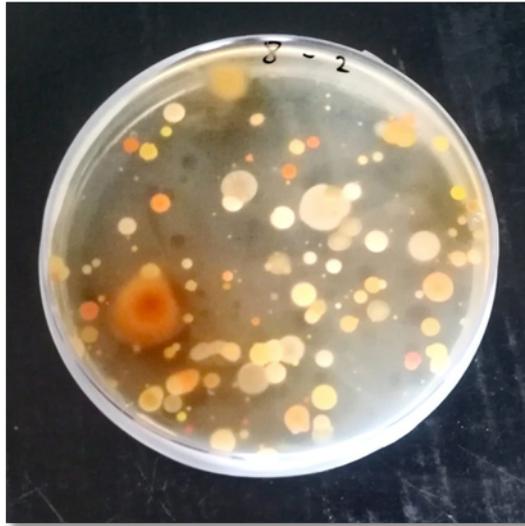


Figura 7. Placa Petri con TSA 1/10 con diferentes colonias bacterianas de consistencia, morfología, pigmentación y tamaño variable.

Con el objetivo de que los estudiantes apreciaran la gran cantidad de bacterias que hay en una muestra de suelo, se procedió a calcular las unidades formadoras de colonia en un gramo de suelo (UFC/g) en una de las placas analizadas (las que tuvieran entre 30 y 300 colonias). Los resultados de todos los grupos se anotaron en la pizarra. Acto seguido se procedió a aislar las 20 colonias de bacterias utilizando medio de cultivo TSA.

Material

- Placa Petri con medio de cultivo TSA.
- Cuadrícula de referencia.
- Palillos de dientes estériles.
- Rotuladores permanentes de punta fina.
- Una bata de plástico por estudiante
- Un par de guantes por estudiante
- Un contenedor para recoger el material utilizado.

Los materiales estériles (medios de cultivo y palillos) se prepararon previamente en el laboratorio de la universidad y se llevaron al centro el día en que se debían usar.

Procedimiento

1. Calcular el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{g \text{ de suelo}} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias en placa} \times \frac{1}{\text{dilución}} \times 10 \text{ (siembra de la placa)}}{1 g \text{ de suelo}}$$

2. Marcar por la parte de fuera de la placa cada colonia que se pretende aislar con un número del 1 al 20.
3. Rotular la base de la placa dibujando una cuadrícula utilizando la de referencia y marcar cada cuadradito con un número del 1 al 20.
4. Sacar un palillo y tocar una de las colonias. Sin que el palillo toque nada más que la colonia, inocular en su cuadradito correspondiente en la placa.
5. Incubar las placas a 28 °C durante 24 horas. Después conservar a 4 °C.

A continuación, en la **Figura 8** se muestra un esquema de la realización de la actividad.

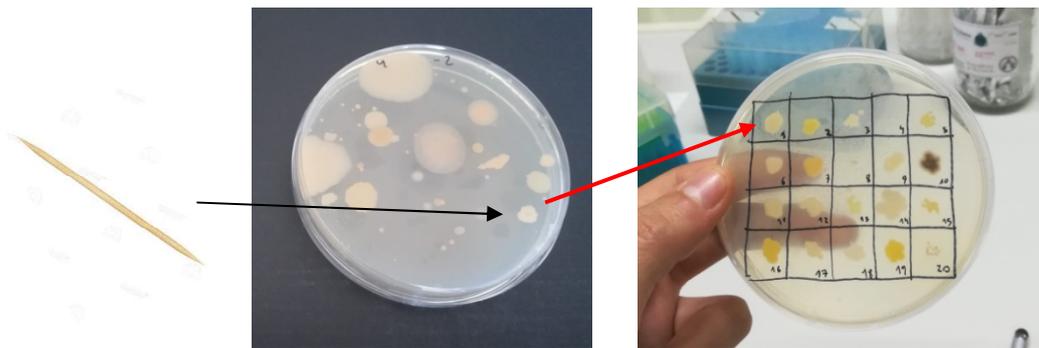


Figura 8. Procedimiento de aislamiento de colonias bacterianas crecidas en TSA.

Sesión 4. Ensayo de antibiosis sobre bacterias testigo

El objetivo fue que los estudiantes aprendieran a realizar un ensayo de antibiosis. Tras sembrar un césped usando una bacteria testigo, se inoculan las colonias aisladas en la sesión anterior. En la sesión posterior se observa si alguna de ellas era capaz de producir una inhibición del crecimiento de las cepas testigo (halos de inhibición).

Material

- Placas Petri con medio de cultivo TSA con el microorganismo testigo ya inoculado, pero no crecido.
- Palillos de dientes estériles.
- Una bata de plástico por estudiante
- Un par de guantes por estudiante
- Un contenedor para recoger el material utilizado

En el laboratorio de la universidad, se sembraron previamente los cultivos bacterianos en placas de TSA. Se usaron dos cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), una Gram-positiva, *Bacillus cereus* CECT 101, y otra Gram-negativa, *Escherichia coli* CECT 495. Se prepararon dos placas por cada pareja de estudiantes y se guardaron a 4°C hasta la realización de la sesión.

Procedimiento

1. Sembrar de uno en uno cada uno de los microorganismos aislados en la placa que contiene *B. cereus* con la ayuda de los palillos estériles.
2. Repetir el proceso con las mismas colonias en la placa que contiene *E. coli*.
3. Incubar las placas a 28°C durante 48 horas.

En la **Figura 9** se muestra un esquema de la realización de la actividad.

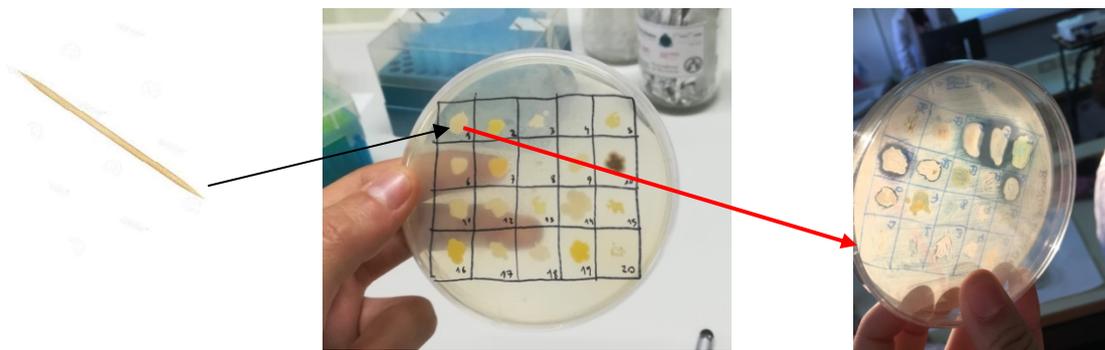


Figura 9. Esquema del procedimiento de realización de los ensayos de antibiosis.

Sesión 5. Resultados y conclusiones

En esta última sesión se realizó la lectura de los resultados de antibiosis. Se comentaron los objetivos del proyecto con los estudiantes del instituto y se valoró su grado de cumplimiento. Posteriormente se abrió un debate acerca de los nuevos conceptos y conocimientos adquiridos durante el proyecto. Por último, se les pasó una encuesta de satisfacción (**Figura 10**). Finalmente se realizó una foto de grupo (**Figura 11**).

Interés científico	1	2	3	4	5
1) La participación en este proyecto ha despertado tu interés o curiosidad por la ciencia.					
2) Esta experiencia te ha acercado a un problema de interés.					
3) Tus resultados pueden contribuir al avance científico.					
4) Este proyecto ha tenido repercusión en tu conocimiento de la diversidad microbiana en el medio ambiente.					
Resistencias a antibióticos	1	2	3	4	5
5) Tu participación en el proyecto ha contribuido a conocer mejor el problema de la resistencia a los antibióticos.					
6) Esta experiencia ha modificado tu percepción sobre el uso de antibióticos.					
Otros	1	2	3	4	5
7) Este proyecto ha mejorado tu formación científica.					
8) Recomendarías a otros compañeros o centros la participación en este proyecto.					
9) Refleja tu opinión global sobre la participación en este proyecto.					

Figura 10. Formulario utilizado para realizar las encuestas de satisfacción de los estudiantes del IES Vicent Andrés Estellés con respecto el presente proyecto.



Figura 11. Conjunto de SWITAs y estudiantes participantes en el IES Vicent Andrés Estellés.

Sesión de análisis edafológico en la UV

La Dra. Ester Carbó (Área de Edafología) propuso una sesión práctica con el objeto de analizar la capacidad que tiene el suelo para sustentar la vida microbiana. Se realizaron experimentos que permitieron conocer las propiedades de algunas muestras de suelo, y de esa manera pudimos obtener resultados adicionales.

Material

- Tablas Munsell
- pHmetro
- Agitador

Reactivos

- Cloruro potásico 0,1 N
- Ácido clorhídrico 1:1
- Cloruro de calcio 0,1 N
- Bicarbonato sódico comercial

Procedimiento

A continuación se describe el procedimiento que se siguió a la hora de caracterizar cada una de las propiedades de las diferentes muestras de suelo (<http://edafologia.ugr.es/introeda/tema00/progr.htm>, fecha de consulta: 16/04/2019):

Color del suelo

El color es una de las propiedades más significativas del suelo, ya que este viene dado por la existencia y proporción de compuestos orgánicos y minerales. La materia orgánica produce colores oscuros, generalmente negruzcos o pardos. La mayoría de suelos del mundo están dominados por dos grandes linajes de bacterias, las Proteobacterias y las Actinobacterias (Madigan *et al.*, 2015). Son competidores muy eficientes por el carbono orgánico, el cual es un recurso limitante en el suelo. Por lo tanto, la abundancia de estas incrementa las concentraciones de carbono orgánico. Esto quiere decir que cuanto más oscuro es el suelo, mayor posibilidad de encontrar gran cantidad de microorganismos. Para evaluar el color de cada muestra de tierra se utilizaron las tablas Munsell (Casanova *et al.*, 2004).

pH

El pH nos indica el tipo de microorganismo que se puede encontrar en cada muestra de suelo. Así pues, las bacterias prefieren pH neutros o cercanos a la neutralidad, en ocasiones alcalinos, mientras que los hongos son los mayoritarios a pH ácido (Madigan *et al.*, 2015). El pH depende de los constituyentes del suelo.

Carbonatos

Este ensayo consistió en añadir unas gotas de HCl 1:1 a las muestras de suelo. Si existen carbonatos en el suelo se produce una reacción que da lugar a efervescencia. Cuanta más intensa es la efervescencia mayor es el contenido de carbonato cálcico en el suelo.

Textura al tacto

La textura del suelo es la propiedad que lo clasifica en función del tamaño de las distintas partículas que lo componen. Según la clasificación de Departamento de Agricultura de EEUU (USDA) los suelos se pueden clasificar en arcillosos, limosos y arenosos. Los nutrientes de las plantas se encuentran principalmente en los suelos más arcillosos. Para evaluar la textura se siguió el siguiente procedimiento (Casanova, 2003):

-Suelo arcilloso: El suelo si está húmedo es adherente y plástico al tacto. Se pueden hacer cilindros y anillos con los dedos manteniendo la forma.

-Suelo limoso: El suelo mancha al tocarlo. El cilindro cuesta más hacerlo no pudiendo realizarse los anillos puesto que al humedecerlo no es plástico y cuando se seca no se endurece tanto como la arcilla.

-Suelo arenoso: Se mantiene suelto. El cilindro no mantiene la forma, el suelo no es ni adherente ni plástico.

En la **Figura 12** se pueden apreciar fotografías de la realización de la actividad.

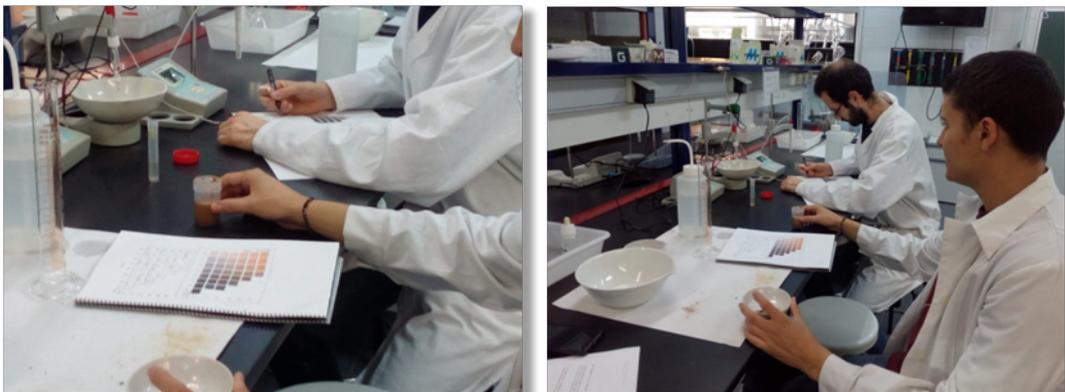


Figura 12. Fotografías tomadas durante la realización de la sesión de edafología.

2. Ejecución del proyecto *Aula Natura* en el CEIP

El proyecto consistió en trasladar la iniciativa realizada en el IES Vicent Andrés Estellés a dos clases de 6º de primaria del Colegio San Juan de Ribera de Burjassot. Para ello, se formó a los estudiantes del instituto que habían participado en el SWI para que fueran los monitores durante las sesiones en el colegio.

Este segundo bloque del proyecto se dividió en cuatro sesiones, dos de ellas dirigidas a la formación de los estudiantes de bachillerato, y las otras dos centradas en las sesiones prácticas en el colegio. Estas prácticas tenían un contenido similar al de las sesiones realizadas en el instituto, pero simplificado y adaptado a niños de 10/11 años. A parte, hubo un trabajo previo tanto didáctico como en el laboratorio para preparar las sesiones de forma amena y científica, y un trabajo posterior en el laboratorio para la obtención de datos de interés científico. Además, se evaluaron los resultados de aprendizaje de los estudiantes. Tras reuniones con los profesores participantes en el proyecto, se pactaron las fechas de las sesiones (**Tabla 7**).

Tabla 7. Sesiones previas realizadas a los estudiantes del IES Vicent Andrés Estellés y sesiones prácticas realizadas en el CEIP San Juan de Ribera.

Tipo de sesión	Sesión	Fecha
Sesiones previas de formación	Día 1) Explicación del proyecto y de las sesiones a realizar a los estudiantes de bachillerato.	25/03/2019
	Día 2) Exposición y evaluación de las presentaciones explicativas realizadas por los estudiantes de bachillerato.	05/04/2019
Sesiones prácticas	Día 1) Introducción al proyecto. Cultivo de bacterias del suelo.	08/04/2019
	Día 2) Observación de la diversidad microbiana y de fenómenos de antibiosis. Preguntas, encuestas y conclusiones.	15/04/2019

Sesión previa 1. Explicación del proyecto

El primer paso consistió en la formación de los estudiantes de bachillerato. La preparación se enfocó a la adaptación de las sesiones para que el alumnado de primaria fuera capaz de asimilarlas. En la primera sesión se introdujo el Proyecto Natura, explicando las bases y los objetivos del mismo y los aspectos más generales con la ayuda de una presentación en formato Power Point como recurso didáctico (**Anexo 1**). Posteriormente se acordó el reparto de sesiones y las tareas de cada miembro del equipo. Se simplificó el cuadernillo de prácticas utilizado en el IES como recurso didáctico para que sirviera como guía a los alumnos del colegio. Se hizo mucho hincapié en que su tarea debía centrarse en la transmisión de la

información de forma que mediante las posteriores sesiones prácticas los alumnos de primaria pudieran entender de forma visual conceptos como “Diversidad”, “Bacteria” y “Antibiótico”. De esa manera serían capaces de comprender y solidarizarse con el problema de las resistencias bacterianas a los antibióticos. Se consideró prioritario que entendieran la importancia de no consumir antibióticos sin recomendación expresa de los médicos, y de seguir las instrucciones pautadas por estos para asegurar que el consumo de antibióticos no va a favorecer todavía más el problema de las resistencias microbianas a ellos.

Se dividió a los estudiantes de bachillerato en dos grupos, y se acordó que cada uno de ellos prepararía una de las dos sesiones prácticas en el colegio. Como en el colegio los alumnos de 6º de primaria se dividen en dos clases, se acordó que cada grupo realizaría la correspondiente explicación en una clase. Por lo tanto, aunque cada uno de los dos grupos del IES preparó una sesión, tuvieron que preparar también la exposición de la otra, debido a que cada grupo explicó las dos sesiones en su correspondiente clase. En la **Figura 13** se puede ver el grupo de participantes en el proyecto, tanto estudiantes como monitores y profesores.



Figura 13. Conjunto de estudiantes y de profesores participantes en la Implantación de la Iniciativa SWI en el Proyecto Natura.

Sesión previa 2. Exposición y evaluación de las presentaciones realizadas por los estudiantes

La sesión se enfocó hacia la formación de los estudiantes de bachillerato para que elaboraran una presentación en formato Power Point adaptada a los estudiantes del colegio. Los días anteriores a esta sesión se revisaron y corrigieron las presentaciones realizadas por ellos, y se les comunicó por correo electrónico los cambios que se consideraron oportunos para que revisaran el texto y las hicieran más visuales e intuitivas. También tuvieron que elaborar preguntas adaptadas a los estudiantes de primaria para valorar después su grado de comprensión de los nuevos conceptos y conocimientos. Durante esta sesión los estudiantes expusieron sus presentaciones de forma que les sirvió como un entrenamiento de cara a las sesiones definitivas frente a los estudiantes de primaria. Se les corrigieron los fallos que tuvieron en cuanto a la comunicación y a la adaptación de los conceptos y contenidos, y se les dieron algunas pautas para perfeccionar más sus presentaciones.

Sesión práctica 1. Introducción al proyecto. Cultivo de bacterias del suelo

La sesión se dividió en dos partes. En la primera se realizó una explicación de los conceptos principales que los alumnos de sexto de primaria deben conocer para participar en el proyecto. Para ello, los estudiantes de bachillerato expusieron las presentaciones con la intención de introducir el problema de las resistencias bacterianas a los antibióticos, las causas y formas de prevenir y/o tratar de reducir el problema, así como indicarles cómo pueden contribuir ellos. Posteriormente, se dividieron en equipos de 4 o de 5 personas y se asignó un estudiante de bachillerato a cada equipo como monitor durante las sesiones.

En esta primera sesión, se explicó a los alumnos del colegio las normas de seguridad que debían seguir en las sesiones, ya que era la primera vez que iban a ver de cerca y manipular una placa Petri con colonias de bacterias. Las normas fueron las siguientes:

1. Lavarse las manos antes y después de trabajar.
2. Llevar puestos siempre los guantes y las batas de plástico.
3. Seguir las instrucciones de los monitores y profesores.

Una vez realizada la explicación, los alumnos realizaron la segunda parte de la sesión, correspondiente a la parte práctica.

Material

- Cuadernillo de prácticas (**Anexo 2**)
- Placas Petri con medio de cultivo para bacterias TSA.
- Rotuladores.
- Torundas estériles.
- 6 tubos con diluciones seriadas de suelo.
- Una bata desechable por estudiante.
- Un par de guantes por estudiante.
- Contenedor para desechar material contaminado

Antes de la sesión se preparó todo el material necesario: 80 placas con medio TSA para un total de diez equipos a los que les correspondían 60 placas (seis por equipo) y 20 placas más por seguridad. Se prepararon seis tubos con agua destilada autoclavada para cada grupo de alumnos, y con diferentes muestras de suelo se realizaron las diluciones decimales seriadas, 10^{-1} - 10^{-6} . Para ello, se recogieron un total de 8 muestras de tierra diferentes con el fin de valorar cualitativamente la diversidad de microorganismos que se podía encontrar en cada una de ellas, y así llevar a las sesiones prácticas en el colegio las muestras de suelo más interesantes en cuanto a diversidad para que los alumnos visualizaran los conceptos (**Tabla 8**).

Tabla 8. Geolocalización de las muestras de tierra.

Número de muestra	Población	Coordenadas	Características del lugar
1	Burjassot	39.507181, -0.419210	Dentro del campus de ciencias de la Universitat de València, cerca de la biblioteca de ciencias
2	Burjassot	39.505582, -0.417042	Parking cercano a la parada de Sant Joan del tranvía
3	Burjassot	39.504491, -0.412818	Parque de La Granja, zona con malas hierbas
4	Benimàmet	39.504669, -0.416515	Jardín cercano a la autovía de Ademuz
5	Burjassot	39.506606, -0.419686	Dentro del campus de ciencias de la Universitat de València, cerca de los laboratorios de la Facultad de Física
6	Burjassot	39.508159, -0.422181	Jardín del edificio de investigación de la Universitat de València
7	Burjassot	39.509096, -0.424179	Entrada al cementerio municipal de Burjassot
8	Paterna	39.507963, -0.425035	Cerca de la Feria de Muestras, zona con una gran cantidad de malas hierbas e insectos.

A continuación, se sembraron dos placas de TSA por cada muestra de suelo, tras diluirlo diez veces (10^{-1}) y 100 veces (10^{-2}). Después, se evaluó cualitativamente la diversidad bacteriana en cada muestra, siendo las muestras 3 y 8 las más interesantes, y las muestras 1 y 6 las que mostraron menor diversidad. En la **Figura 14** se puede apreciar la diferencia de diversidad que hay entre una muestra de tierra. Esto se puede apreciar debido a que en las placas correspondientes a la muestra 8 se puede ver una mayor cantidad de morfologías coloniales y colores que en las placas correspondientes a la muestra 1.

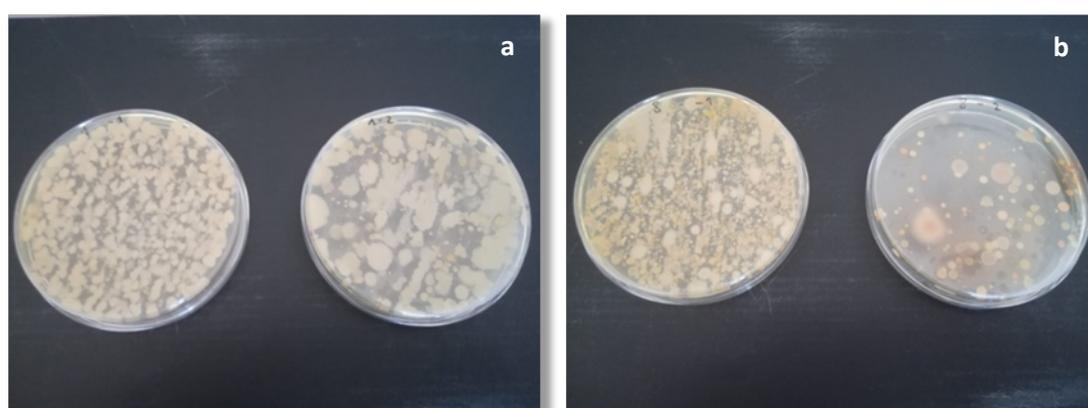


Figura 14. Resultados de la siembra de las dos diluciones de las muestras 1 (panel a) y 8 (panel b).

Por lo tanto, para la realización del experimento en el colegio se llevó la muestra 8 diluida. Una vez explicada la preparación del material utilizado durante la primera sesión práctica en el colegio se detalla a continuación el procedimiento experimental de la práctica.

Procedimiento

1. Rotular las placas con el nombre del equipo y con el número de la dilución de la muestra.
2. Sacar la torunda del plástico sin que la punta de algodón toque nada.
3. Abrir el primer tubo con tierra diluida y mojar la punta de la torunda.
4. Abrir la placa y extender la punta de la torunda por la superficie de la placa.
5. Repetir dos veces más los pasos 2 y 3, utilizando la misma torunda.
6. Cerrar la placa y entregar a un monitor.
7. Repetir el mismo procedimiento con los demás tubos.

Al estar los alumnos repartidos en 10 grupos de cuatro o cinco personas, cada uno sembró una placa, y alguno de ellos tuvo que sembrar una placa más, debido a que se realizaron 6 siembras por grupo. En la **Figura 15** se puede apreciar el procedimiento realizado por los estudiantes y en la **Figura 16** se puede ver a los estudiantes realizando las partes de la sesión correspondientes a la explicación y a la realización de la actividad.

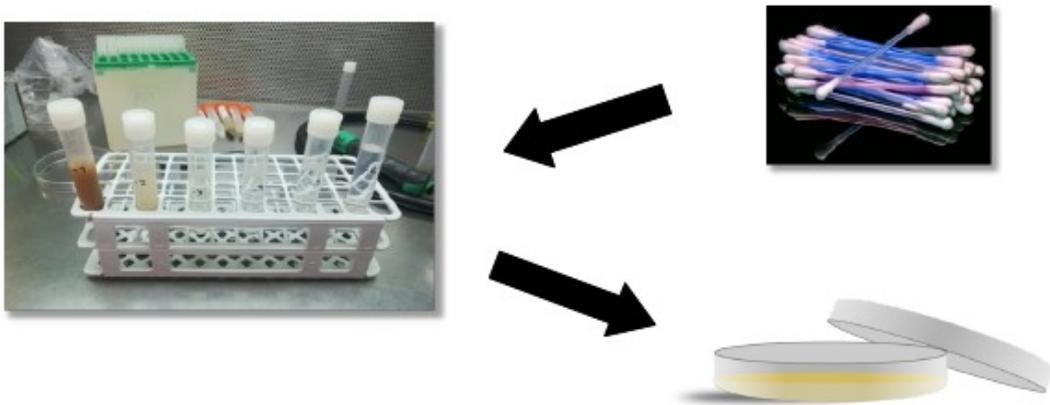


Figura 15. Esquema del procedimiento de realización de la siembra.



Figura 16. a) Estudiantes de bachillerato exponiendo la sesión; b) alumnos de primaria realizando el experimento.

Sesión práctica 2. Observación de la diversidad bacteriana y de fenómenos de antibiosis.

Los alumnos de primaria apreciaron la diversidad bacteriana de las muestras de suelo que sembraron en la sesión anterior, mediante la observación de colonias bacterianas sobre la superficie de las placas de TSA. También pudieron ver cómo algunas bacterias pueden ejercer una actividad de antibiosis frente a otras. En la **Figura 17** se observa el crecimiento de bacterias en placas sembradas por estudiantes de primaria.

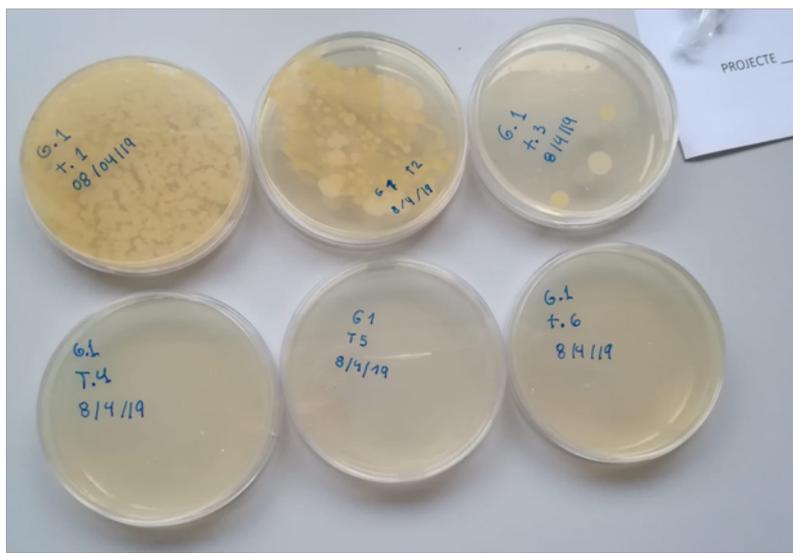


Figura 17. Placas del medio de cultivo TSA sembradas por los alumnos de primaria.

Los monitores de bachillerato realizaron la explicación utilizando la presentación que habían preparado. A continuación, repartieron a los alumnos de primaria las placas Petri que habían sembrado en la sesión anterior en las que las colonias bacterianas eran visibles. También repartieron las placas correspondientes a los ensayos de antibiosis realizados previamente en el laboratorio de la universidad, con varias de las colonias que crecieron en las placas de los estudiantes de primaria.

Los ensayos de antibiosis (**Figura 18**) se realizaron la semana anterior en el laboratorio de la universidad, una vez habían crecido las colonias bacterianas en las placas de aislamiento que sembraron los estudiantes de primaria en la primera sesión. Se cultivó en medio TSB la cepa testigo (*B. cereus*) y después se sembró con él un césped bacteriano en 20 placas Petri conteniendo TSA. Se rotularon las placas divididas en cuadraditos numerados del 1 al 16 y de cada grupo de alumnos se escogieron 32 colonias diferentes de bacterias, que se sembraron después con palillos estériles, 16 en una placa y 16 en la otra. Este procedimiento se repitió para los 10 grupos de alumnos. Estas placas se incubaron durante 24 horas a 28°C, y después se guardaron a 4°C hasta el día de la segunda sesión en el colegio.

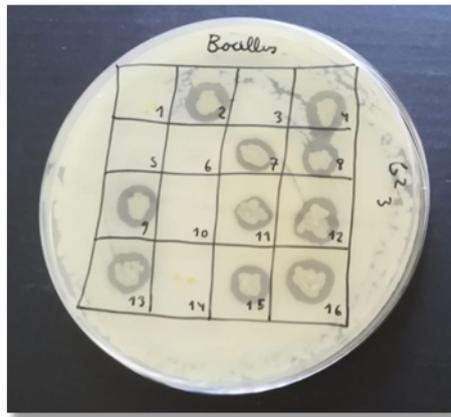


Figura 18. Ensayo de antibiosis realizado.

Este ensayo sólo se realizó con la cepa testigo de *B. cereus* debido a que es más fácil obtener resultados positivos por tratarse de una bacteria Gram-positiva y también ambiental. Así, los alumnos pudieron apreciar halos de inhibición del crecimiento bacteriano de la cepa testigo, puesto que era más probable que estos aparecieran frente a una cepa de *B. cereus*.

Después de que los alumnos de primaria vieran los resultados de las siembras que realizaron y de los ensayos de antibiosis, se procedió a realizar una serie de preguntas adaptadas para ellos para favorecer la asimilación de los conocimientos que se les trató de transmitir, junto con unas encuestas de satisfacción adaptadas para ellos y cuyos resultados se comentarán posteriormente como se puede ver en la **Figura 19**.

Aprendizaje	1	2	3	4	5
1) He entendido por qué tomar antibióticos cuando no tengo que tomarlos puede ser peligroso.					
2) He aprendido cosas nuevas sobre las bacterias y los antibióticos.					
3) Ahora pienso que sé más cosas de las que sabía antes de participar en el proyecto.					
Interés	1	2	3	4	5
4) Las actividades han sido entretenidas e interesantes.					
5) Este proyecto ha ayudado a que me interese más por la ciencia.					
Monitores	1	2	3	4	5
6) Los monitores han hecho bien su trabajo.					

Figura 19. Modelo de encuestas realizadas para los estudiantes del CEIP San Juan de Ribera para evaluar su grado de satisfacción con el proyecto.

Finalmente, como se puede apreciar en la **Figura 20**, se repartieron los diplomas (**Anexo 3**) de participación en el proyecto tanto a los alumnos de primaria como a los monitores de bachillerato.



Figura 20. Reparto de diplomas a los alumnos de primaria y a los estudiantes de bachillerato.

Este reparto de diplomas tuvo como finalidad reforzar el valor de la actividad, así como agradecer personalmente a cada uno de los participantes su participación y recordarles que es inmensamente importante comprender el problema de las resistencias microbianas a los antibióticos y difundirlo para concienciar al mundo entero.

Crioconservación de la selección de cepas bacterianas

Los aislados bacterianos positivos en los ensayos de antibiosis frente a las cepas testigo ensayadas (*E. coli* CECT 495 y *B. cereus* CECT 101) se purificaron en el laboratorio mediante tres pases de purificación por triple estría en placas de TSA. Posteriormente, los cultivos puros se congelaron a -20°C en tubos con glicerol al 25%.

4. Expociencia Aula Natura

El tercer bloque del proyecto consistió en la participación en Expociencia (**Figura 22**), la jornada de puertas abiertas del Parque Científico de la Universitat de València. La actividad es una gran celebración de la ciencia y la innovación para todos los públicos. Constituye un evento que permite a personas de diferentes edades acercarse a la investigación y a la ciencia de forma entretenida y educativa.

Nuestro objetivo principal se centró en que los visitantes se interesaran por el mundo microbiano. Se enfocó la actividad para resaltar tres aspectos, la diversidad microbiana, la concienciación sobre el mal uso de los antibióticos y la potencialidad de otras bacterias como productoras de nuevos antibióticos. En la se muestra el equipo que que preparamos la actividad.



Figura 22. Equipo de preparación de la actividad SWI-Aula Natura en Expociencia-2019.

Preparación de la actividad

Se escogieron las muestras de suelo 3, 7 y 8 (**Tabla 5.1**) y se renombraron como A, B y C. Se realizaron diluciones seriadas de cada muestra (10^{-1} - 10^{-3}) y se sembraron en placas Petri con medio TSA 1/10. Posteriormente, se evaluó cualitativamente la biodiversidad de cada muestra tras 48 horas a 28 °C. En base a los resultados obtenidos (**Figura 23**) se optó por utilizar la muestra A para la demostración en Expociencia.

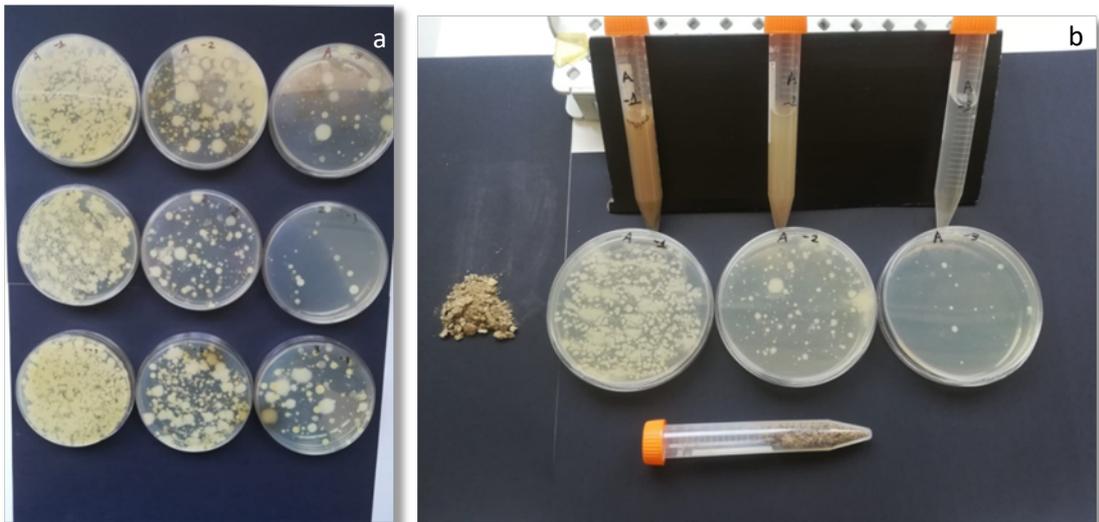


Figura 23. a) Placas Petri con medio de cultivo TSA 1/10 sembradas con las tres diluciones de las tres muestras de tierra tras 48 horas de crecimiento a 28 °C. b) Muestra A. Tubos de tierra diluida utilizados para la siembra de las placas y sus respectivas placas tras 24 horas de crecimiento.

Se prepararon placas Petri con medio de cultivo TSA 1/10 y torundas para realizar la actividad (alrededor de 400 unidades).

Material

- 400 placas Petri con medio de cultivo TSA 1/10.
- 400 torundas esterilizadas previamente.
- Placas Petri de ensayos de antibiosis realizados anteriormente con resultados positivos.
- Placas Petri con cultivos anteriores en las que se puede apreciar diversidad bacteriana.
- Muestra de tierra A.
- Tubos con dilución 10^{-3} de la muestra de tierra A.

Procedimiento

1. Sacar una torunda del bote con cuidado de que no toque nada para evitar contaminar posteriormente la placa Petri con medio de cultivo (**Figura 24**).
2. Mojar la torunda en el bote de tierra diluida.
3. Extender la torunda por la superficie de la placa con medio de cultivo TSA 1/10 con cuidado de no romper la superficie.
4. Incubar las placas a 28 °C durante 2-5 días. Después se incuban a 4°C (este paso se realizó posteriormente en el laboratorio).

Una vez realizado el procedimiento, se repartió a cada uno de los visitantes una tarjeta en la que figuraba una dirección web (<http://swi.blogs.uv.es>) a la que podían acceder una semana después, para ver los resultados del crecimiento de los microorganismos.



Figura 24. Esquema del procedimiento a realizar por los visitantes de Expociencia.

Además de la realización de esta actividad, los visitantes pudieron ver en directo resultados positivos de ensayos de antibiosis y varias placas Petri con TSA en las que se apreciaban diferentes tipos de colonias de microorganismos. Durante la realización de esta actividad, el jurado de los proyectos participantes en el Proyecto Natura evaluó cada una de las actividades preparadas por los participantes de los diferentes proyectos. Su labor consistió en evaluar cada proyecto en líneas generales gracias a la información aportada a través de unas fichas comunes para todos los proyectos (**Anexo 4**) y de los pósters (**Anexo 5**) que se realizaron para Expociencia, además de la realización de la actividad que pudieron presenciar *in situ* y sobre la que preguntaron distintas cuestiones (**Figura 25**).



Figura 25. Fotografías de la realización del proyecto en Expociencia.

5. Caracterización de cepas bacterianas

Uno de los objetivos del presente proyecto era el descubrimiento de cepas con potencial antimicrobiano. Durante el proyecto SWI se han aislado más de 6000 bacterias, incluyendo las obtenidas en el IES Vicent Andrés Estellés y el CEIP San Juan de Ribera. Algunas de ellas presentaban actividad antimicrobiana frente a cepas testigo de *B. cereus* y *E. coli*, y por tanto era interesante realizar una caracterización inicial.

La caracterización/identificación de bacterias se puede realizar mediante métodos fenotípicos y/o moleculares (**Figura 26**). Entre los métodos basados en el fenotipo destacan la tinción de Gram, cultivos en medios selectivos y diferenciales o métodos de detección de actividades enzimáticas (Lagier *et al.*, 2015). Por otra parte, entre los métodos basados en herramientas moleculares destaca principalmente la amplificación del gen ribosómico 16S mediante PCR, seguida de secuenciación del amplificado y posterior análisis filogenético (Madigan *et al.*, 2015; Franco-Duarte *et al.*, 2019). También existen métodos bioquímicos y técnicas ómicas que permiten la correcta identificación de cepas, como el MALDI-TOF, del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time of Flight*.

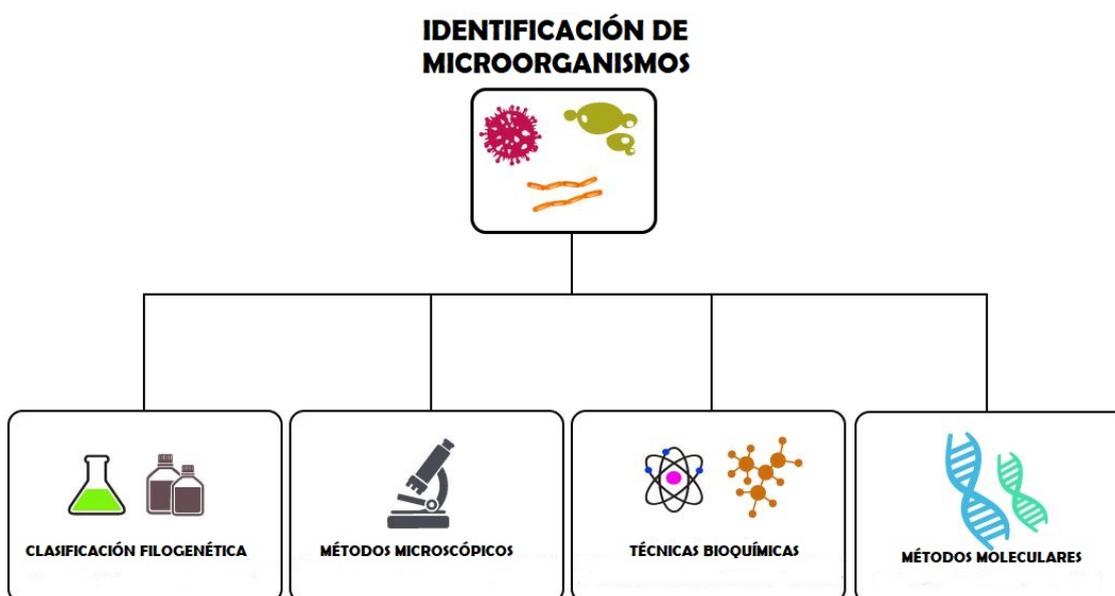


Figura 26. Clasificación de los principales métodos de identificación de microorganismos.
Adaptado de Franco-Duarte *et al.*, 2019.

Tinción de Gram

Inicialmente se realizó una tinción de Gram para determinar si los aislados bacterianos seleccionados eran Gram-positivos o Gram-negativos (Madigan *et al.*, 2015) y posteriormente se visualizaron al microscopio para observar también sus diferentes morfologías celulares.

Material

- Portaobjetos
- Asa de siembra
- Microscopio óptico
- Cubeta de tinciones

Reactivos

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol etílico 95%
- Fucsina básica

Procedimiento

Las tinciones de Gram se realizaron según el protocolo descrito por Madigan *et al.*, 2015.

Secuenciación parcial del rDNA 16S

La amplificación del fragmento del gen ribosómico 16S y su posterior secuenciación es una técnica utilizada para identificar aislados bacterianos. Se utilizan cebadores que amplifican la zona de interés, para después secuenciarla y analizarla para dar lugar a la identificación de la cepa. Este fue el procedimiento realizado junto con la identificación por MALDI-TOF en este proyecto para identificar algunas de las cepas que presentaron actividad frente a las cepas testigo de *E. coli* y *B. cereus* utilizadas en los diferentes centros participantes en el proyecto.

Para realizar la amplificación primero es necesario liberar el DNA del interior de las células bacterianas, mediante la obtención de un lisado por tratamiento térmico (10 min a 95°C). Posteriormente, se realiza la reacción de amplificación en un termociclador con cebadores. Después se comprueba dicha amplificación realizando una electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos de DNA amplificados. Si la amplificación se ha realizado con éxito el material ya se puede secuenciar, tras su purificación.

Extracción de DNA

Material

- Termobloque
- Agua MiliQ esterilizada
- Mechero Bunsen

- Asa de siembra
- Cultivos de las cepas purificados previamente en placas de medio de cultivo TSA
- Tubos Eppendorf
- Vórtex
- Pipetas automáticas y puntas de pipeta estériles

Procedimiento

1. Introducir la colonia bacteriana en un tubo Eppendorf con 300 μ l de agua MiliQ.
2. Homogeneizar las suspensiones bacterianas con la ayuda de un vórtex.
3. Tratar a 95°C durante 10 minutos en un termobloque para lisar las suspensiones bacterianas.
4. Centrifugar 10 minutos a 13.000 r.p.m. los lisados bacterianos
5. Recoger sobrenadante (que contiene el DNA) en un nuevo tubo Eppendorf y conservar a 4 °C hasta su utilización. Desechar sedimento con restos celulares.

Reacción de PCR

Material

- Termociclador para reacción PCR
- Pipetas automáticas y puntas de pipeta estériles
- Muestras de DNA (sobrenadantes)
- Cabina de flujo laminar
- Tubos Eppendorf estériles
- Tubos de reacción de PCR estériles

Reactivos

- Agua destilada estéril
- Tampón TAE (Tris Base 0,45 M, ácido acético 0,45 M, EDTA 10 mM) 10x
- dNTPs 2 mM
- Cebador directo 5 mM: 616V (5´ - AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG -3´) (Arahal *et al.*, 2008)
- Cebador reverso 5 mM: 699R (5´ - GGG TYK CGC TCG TTR -3´) (Arahal *et al.*, 2008)
- Polimerasa DreamTaq (ThermoScientific)

Procedimiento

- Preparar un cóctel de reacción, sin DNA, por cada muestra de DNA para un volumen final de 50 μ L (cebadores 5 μ M, la DreamTaq polimerasa 0,025 U/ μ l y dNTPs 0,2 mM (Arahal *et al.*, 2008).
- Repartir el cóctel en alícuotas de 45 μ L y añadir de 5 μ L de muestras de DNA.
- Usar una alícuota del cóctel de reacción sin DNA como control negativo.
- Amplificar muestras de DNA en un termociclador con las condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, alineamiento a 55°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 min, y una extensión final a 72°C durante 10 min.

Electroforesis en gel de agarosa

Material

- Guantes
- Pipetas automáticas y puntas de pipeta estériles
- Microondas
- Cubeta de electroforesis
- Fuente de alimentación de la cubeta
- Muestras de DNA amplificado
- Captador de imágenes
- Parafilm

Reactivos

- Tampón TAE 1x
- Agarosa D-2
- Tampón de carga 6x (sacarosa 40%, azul de bromofenol 0,25%, EDTA 0,1 M)
- Bromuro de etidio 0,5 g/l
- Marcador de pesos moleculares 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

Procedimiento

1. Pesar 1 gramo de agarosa.
2. Mezclar con 100 mL de tampón TAE 1x.
3. Calentar la mezcla en un microondas hasta que la solución tenga aspecto homogéneo.
4. Dejar enfriar 3 minutos y verter la solución en el soporte para geles de la cubeta de electroforesis colocando el peine en su sitio.
5. Dejar gelificar. Mientras tanto, colocar una gota de 1 μ L de tampón de carga encima del parafilm tantas veces como muestras haya (incluyendo la del control negativo y colocando una más para el marcador de pesos moleculares).
6. Colocar en cada gota de tampón de carga 10 μ L de cada una de las muestras incluyendo control negativo. En el caso del marcador de pesos moleculares colocar 5 μ L en vez de 10.
7. Una vez la disolución de agarosa ha gelificado, colocar el gel en la cubeta de electroforesis y cargar el gel con 11 μ L de cada muestra y con 6 μ L del marcador de peso molecular.
8. Aplicar un campo eléctrico de 90 voltios durante 45 minutos aproximadamente.
9. Recoger gel y teñirlo con bromuro de etidio durante 15 minutos.
10. Por último, colocar gel dentro del captador de imágenes y visualizar resultados.

Secuenciación del DNA ribosómico 16S y análisis de secuencias

La purificación de los fragmentos amplificados del gen ribosómico 16S de las cepas bacterianas y su posterior secuenciación mediante el método de Sanger se realizó en el servicio de secuenciación del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE).

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de las secuencias obtenidas con el programa BioEdit y la aplicación BLASTN del NCBI para la identificación de las cepas bacterianas.

MALDI-TOF

La identificación de cepas bacterianas por MALDI-TOF se realizó en la CECT siguiendo el protocolo de BrukerDaltonics (<http://www.bdal.de>) mediante el método de transferencia directa extendida. La técnica MALDI-TOF se realizó mediante un espectrómetro de masas Microflex L20 (BrukerDaltonics) equipado con un láser N2. Todos los espectros fueron adquiridos en modo ion lineal positivo. El voltaje de aceleración fue de 20kV. Los espectros se adquirieron como la suma de 240 disparos por diana. El rango de masa utilizado para el análisis fue de 2.000-20.000Da.

Se obtuvieron tres espectros por cepa por el método MALDI Biotyper Realtime Classification (RTC). La identificación resultante se enfrentó a la base de datos MBT 7854 y MBT 7311_RUO (BrukerDaltonics), y se corresponde con el perfil de mayor *log score* (Maier *et al.*, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Actividades en bachillerato y primaria

Los estudiantes del IES Vicent Andrés Estellés recogieron las muestras de suelo según el procedimiento detallado en materiales y métodos. Las muestras se recogieron en diferentes localidades de la Comunidad Valenciana en el mes de febrero de 2019 (**Tabla 9**).

Tabla 9. Geolocalización e identificación de muestras de suelo.

Muestra	Geolocalización	Fecha de recogida:	Municipio:
V-EST-01	39.515154, -0.410826	03/02/2019	Yátova
V-EST-02	39.514311, -0.415121	03/02/2019	Burjassot
V-EST-03	39.513860, -0.408867	04/02/2019	Burjassot
V-EST-04	39.510927, -0.406273	01/02/2019	Burjassot
V-EST-05	38.697078, -0.912964	02/02/2019	Villena
V-EST-06	39.637231, -0.634111	02/02/2019	Llíria

La mayoría de muestras se recogieron a una profundidad de entre 0 y 2 cm en terrenos de seco con pendiente (**Tabla 10**). El rango de temperaturas de recogida osciló entre 6 y 18°C.

Tabla 10. Características físico-químicas de las diferentes muestras de suelo.

Muestra	Profundidad (cm)	Humedad	Uso del terreno	Terreno	Temperatura (°C)
V-EST-01	0--2	Seco	Secano	Pendiente	6
V-EST-02	0--2	Mojado	Secano	Pendiente	18
V-EST-03	0--2	Seco	Regadío	Pendiente	15
V-EST-04	2--5	Mojado	Regadío	Llano	13
V-EST-05	0--2	Seco	Secano	Pendiente	9
V-EST-06	2--5	Seco	Secano	Pendiente	10

Se realizaron recuentos microbianos para determinar la abundancia de bacterias cultivables heterótrofas aerobias mesófilas en cada muestra (**Tabla 11**). Estos oscilaron entre 10^5 y 10^7 ufc/g.

Se estudiaron algunas de las características de los diferentes suelos recogidos por los alumnos del instituto que participaron en el proyecto (textura, color, contenido de carbonatos y acidez activa). Para ello, se utilizaron los procedimientos previamente descritos y los resultados (**Tabla 12**).

Tabla 11. Características microbiológicas de las diferentes muestras de suelo.

Muestra	Recuento bacteriano (ufc/g)	Halos de inhibición	
		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
V-EST-01	3,4×10 ⁵	1	0
V-EST-02	9,8×10 ⁶	1	5
V-EST-03	6,6×10 ⁵	0	1
V-EST-04	6,0×10 ⁷	0	0
V-EST-05	No determinado	0	0
V-EST-06	3,0×10 ⁶	0	6

Tabla 12. Caracterización edafológica de las muestras de suelo.

Muestra	Color	Clase textural	pH	Carbonatos
V-EST-01	Marrón	Arenosa	8,20	Sí
V-EST-02	Marrón oscuro	Franco limosa	7,89	Sí
V-EST-03	Marrón	Arenosa	8,75	Sí
V-EST-04	Marrón	Areno francosa	8,37	Sí
V-EST-05	Apagado	Arenosa	8,05	Sí
V-EST-06	Marrón	Arenosa	8,19	Sí

La mayoría de los suelos muestreados tenían una coloración marrón, una textura arenosa y valores de pH ligeramente alcalinos (con presencia de carbonatos). Los suelos más oscuros suelen presentar un mayor contenido de materia orgánica y un mayor contenido también de microorganismos (Madigan *et al.*, 2015). Adicionalmente, cuanto más húmedo es el suelo, mayor es la carga microbiana, pero hasta cierto punto porque en exceso la concentración de oxígeno se vuelve limitante (Madigan *et al.*, 2015). Las muestras con texturas menos arenosas también se correspondieron con las que más UFC/gramo presentaron, que son las que mayor capacidad tienen para acumular nutrientes (Casanova *et al.*, 2004).

Para evaluar la actividad antimicrobiana de colonias aisladas de muestras de suelo se utilizaron dos cepas bacterianas de referencia de la CECT utilizadas como testigo, *E. coli* y *B. cereus*. *E. coli* es una enterobacteria Gram-negativa anaerobia facultativa que se encuentra principalmente en el tracto intestinal de los animales homeotermos formando parte de su microbiota intestinal. Se puede encontrar en aguas fecales, siendo un indicador muy fiable de contaminación fecal (Yang *et al.*, 2017). *B. cereus* es una bacteria ambiental Gram-positiva aerobia que se encuentra en el medio ambiente, principalmente en suelos. El género *Bacillus* es muy diverso, pudiendo encontrarse en una gran variedad de nichos, a diferentes rangos de temperaturas y de pH (Drobniewski, 1993).

Un total de 12 aislados produjeron halos de inhibición frente a la cepa de *B. cereus* y dos frente a la cepa de *E. coli* de un total de 120 colonias evaluadas (**Tabla 13**). Por tanto, un 10% de las cepas ensayadas presentaron actividad antimicrobiana frente a *B. cereus* mientras que solo un 1,66% frente a *E. coli*. Estos resultados sugieren que es más factible encontrar bacterias que inhiban a *B. cereus*, que a *E. coli*, dado que su ambiente natural no es el suelo.

Por lo tanto, resulta esperable que las bacterias del suelo ensayadas hayan presentado por selección natural actividades de antibiosis frente a otras cepas de su ambiente como *B. cereus* en forma de producción de antibióticos, puesto que les pueden conferir ventajas competitivas por el espacio y/o los escasos nutrientes dado que el suelo en general es un ambiente oligotrófico (Madigan *et al.*, 2015). Resulta más complicado que hayan generado sustancias antimicrobianas frente a una bacteria entérica como *E. coli*.

Tabla 13. Resultados positivos del total de cepas evaluadas frente a *E. coli* y *B. cereus*.

	Halos de inhibición frente a <i>B. cereus</i>	Halos de inhibición frente a <i>E. coli</i>
Resultados positivos IES	12	2
Porcentaje de positivos frente al total de colonias evaluadas (120 colonias)	10 %	1,66 %

En el colegio se intentó reproducir el mismo tipo de ensayos, de manera adaptada y reducida para los alumnos de primaria. A partir de los aislados obtenidos 320, se realizaron ensayos de antibiosis, obteniéndose 17 aislados positivos frente a *B. cereus*.

En la **Figura 27** se puede apreciar la diferencia entre dos ensayos de antibiosis. Uno realizado frente a una cepa de *E. coli* con ningún resultado positivo (a) y otro frente a una cepa de *B. cereus* con un total de 10 cepas que mostraron halo de inhibición, por lo que ejercieron antibiosis frente a esta cepa (b).

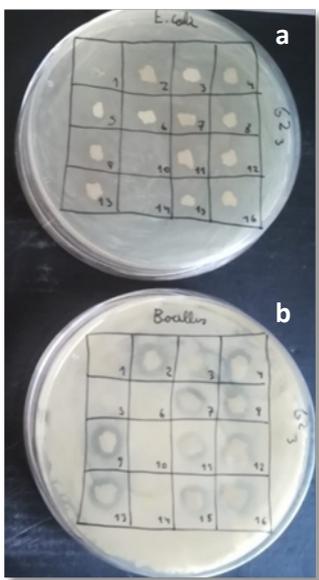


Figura 27. Fotos representativas de los ensayos de antibiosis realizados frente a *E. coli* (a) y frente a *B. cereus* (b) con cepas obtenidas de la tierra recogida para la realización de las actividades en el CEIP San Juan de Ribera.

2. Expociencia

Durante la jornada del 25 de mayo de 2019 llevamos una demostración del SWI-Aula Natura al Parque Científico de la Universitat de València. Cerca de 400 niños y niñas se acercaron a conocer la actividad. Básicamente realizaron una siembra a partir de muestras diluidas de tierra en placas de medio de cultivo TSA. De manera paralela se les concienció sobre el problema de las resistencias bacterianas a antibióticos. Las placas sembradas se incubaron en el laboratorio de la universidad y una semana después del evento los visitantes que participaron pudieron ver los resultados del crecimiento de microorganismos. Los resultados se pudieron consultar en la dirección <http://swi.blogs.uv.es/> (Figura 28).

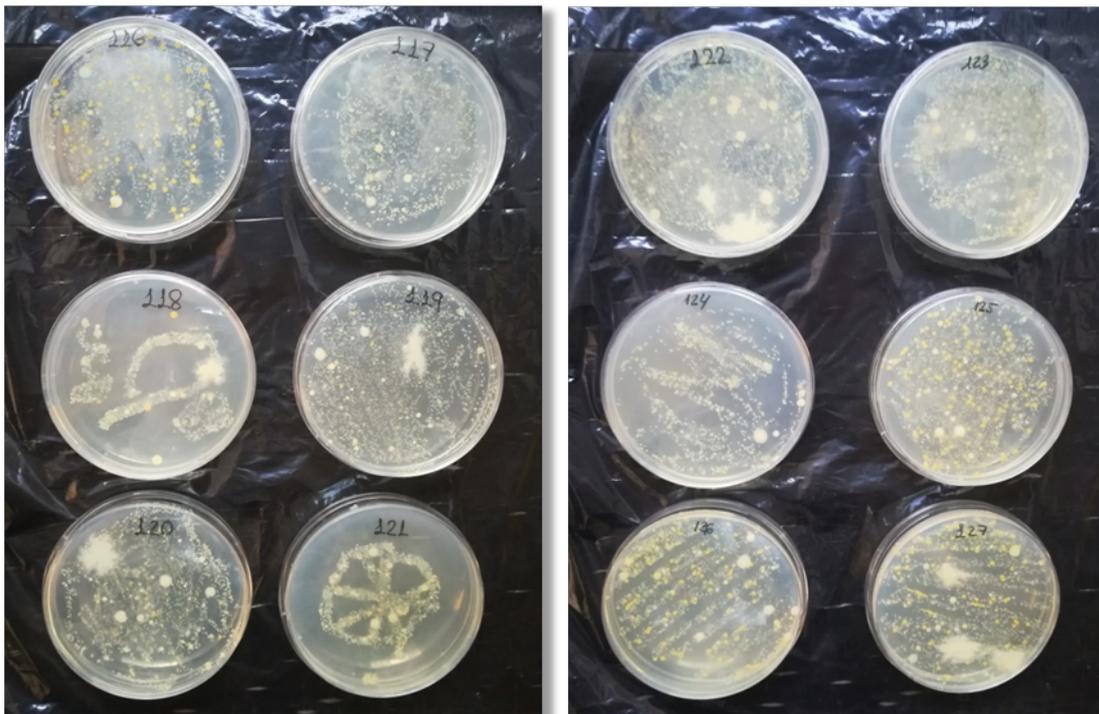


Figura 28. Resultados de algunas de las placas Petri sembradas por los visitantes de Expociencia.

3. Valoración del proyecto a nivel didáctico

Valoración de estudiantes del IES Vicent Andrés Estellés

Una vez finalizadas las prácticas, se realizó una encuesta de evaluación anónima a los estudiantes con el fin de determinar su grado de satisfacción frente al proyecto y la adquisición de conceptos y aprendizajes relacionados con el mismo. Cada estudiante rellenó una encuesta tipo escala de Likert (1 a 5) para evaluar diferentes aspectos de la actividad. Tras calcular las correspondientes medias, los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Resultados de las encuestas de satisfacción

Interés científico	
1) La participación en este proyecto ha despertado tu interés o curiosidad por la ciencia	4,38
2) Esta experiencia te ha acercado a un problema de interés	4,46
3) Tus resultados pueden contribuir al avance científico	2,69
4) Este proyecto ha tenido repercusión en tu conocimiento de la diversidad microbiana en el medio ambiente	4,67
Resistencias antibióticos	
5) Tu participación en el proyecto ha contribuido a conocer mejor el problema de la resistencia a los antibióticos	4,15
6) Esta experiencia ha modificado tu percepción sobre el uso de antibióticos	4,23
Otros	
7) Este proyecto ha mejorado tu formación científica	4,62
8) Recomendarías a otros compañeros o centros la participación en este proyecto	4,77
9) Refleja tu opinión global sobre la participación en este proyecto	4,62
Media	4,29
Desviación típica	0,63

Las encuestas incluían un apartado de respuesta libre. Ocho alumnos de los 13 encuestados comentaron que el aspecto peor (mejorable) era el reparto de batas de plástico desechables usadas. Además, cinco alumnos comentaron que las sesiones deberían haberse realizado en más tiempo, y tres de ellos afirmaron que lo peor fue que sus resultados no fueron *los idóneos*. Pese a ello, los resultados de la encuesta reflejan el valor didáctico de las prácticas, puesto que los alumnos reconocieron positivamente la adquisición de los conceptos relacionados con las mismas, así como la participación en un proceso de investigación científica.

La realización de este proyecto de ApS tiene una gran implicación de carácter social, pero otro de los objetivos que perseguía era el aprendizaje y complementación curricular en los diferentes niveles educativos dentro de la asignatura de Biología y Geología, en el caso de los alumnos de primero de bachillerato. Para este curso no hay un bloque temático específico de microbiología, pero encajaría dentro de diferentes bloques, por lo que se considera una práctica de carácter transversal en la cual se ponen en práctica y se adquieren varias competencias clave. Por un lado, se desarrolla la competencia matemática y digital, ya que parte de los resultados obtenidos en el aislamiento de las bacterias del suelo debe expresarse mediante cálculos matemáticos. En cuanto a la competencia digital, los alumnos de bachillerato participantes en la parte del Proyecto Natura han hecho uso de tecnologías, como aplicaciones informáticas, para transmitir el contenido a los alumnos de primaria. La competencia de comunicación lingüística se pone en práctica en el ámbito científico mediante la transmisión de los resultados, usando el lenguaje específico y mediante varias vías de transmisión de información. Por otro lado, en el caso de estos alumnos, han llevado a cabo la competencia de iniciativa y espíritu emprendedor, siendo ellos los que han elegido la manera de elaborar y transmitir la información a compañeros de niveles educativos inferiores. Finalmente, durante la aplicación de ambos proyectos SWI y Proyecto Natura, las competencias social y cívica, y de conciencia y expresiones culturales están en todo momento presentes, puesto que la base de ambos proyectos, es la concienciación ciudadana sobre un problema de salud que afecta a toda la sociedad.

Valoración de estudiantes del CEIP San Juan de Ribera

Del mismo modo, se preparó una encuesta similar para los alumnos del CEIP San Juan de Ribera. Cada estudiante rellenó una encuesta Likert (escala del 1 al 5) para responder a preguntas realizadas sobre diferentes aspectos de la actividad. Los resultados de las medias obtenidas se muestran en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Resultados de las encuestas de satisfacción respondidas por los estudiantes.

Aprendizaje	
1) He entendido por qué tomar antibióticos cuando no tengo que tomarlos puede ser peligroso	4,95
2) He aprendido cosas nuevas sobre las bacterias y los antibióticos	4,70
3) Ahora pienso que sé más cosas de las que sabía antes de participar en el proyecto	4,66
Interés	
4) Las actividades han sido entretenidas e interesantes	4,76
5) Este proyecto ha ayudado a que me interese más por la ciencia	4,15
Monitores	
6) Los monitores han hecho bien su trabajo	4,83
Media	4,68
Desviación típica	0,28

En el apartado de repuesta abierta, el 85 % de los alumnos respondieron que no cambiarían nada respecto a la actividad, y que les gustó tanto la explicación teórica como la parte práctica. Siete alumnos comentaron que el aspecto que menos les gustó fue el olor de las colonias bacterianas, mientras que otros cuatro comentaron que no les había gustado ponerse ni batas ni guantes. Algunos también comentaron que las sesiones fueron muy cortas. Asimismo, los alumnos de primaria participantes en el proyecto han dado una valoración muy positiva al carácter científico de la actividad, así como a la adquisición de nuevos conceptos relacionados con la asignatura de Ciencias Naturales, que complementarían los bloques de “El ser humano y la salud” y el de “Los seres vivos”.

En las prácticas del Proyecto Natura con los alumnos de primaria, estos han podido desarrollar diferentes competencias clave relacionadas. Por un lado, la competencia científica, ya que, aunque siendo las sesiones más reducidas, los alumnos han podido ser partícipes y han colaborado en el desarrollo de la práctica. Del mismo modo, al igual que en el caso de los alumnos de bachillerato, otras de las competencias puestas en práctica han sido la competencia social y cívica, y la conciencia y expresiones culturales, puesto que la concienciación social con respecto al tema de la resistencia hace a los alumnos ciudadanos informados y críticos respecto a las decisiones científicas y también de carácter social.

Valoraciones realizadas por los participantes y por el jurado de Expociencia

La profesora de secundaria (Dra. Margarita Ortigosa) recibió la actividad de manera muy positiva, siendo su implicación máxima. Agradeció en varias ocasiones su participación en el proyecto, mostrando gran interés a lo largo de todas las sesiones. Asimismo, cabe resaltar un compromiso muy sólido con la actividad y con el aprendizaje de sus alumnos. Las mismas conclusiones se han obtenido respecto a los profesores de primaria (Dori Palencia y Juan José Pérez).

Como se ha comentado anteriormente, los alumnos tanto de bachillerato como de primaria a lo largo de las sesiones respondieron a una serie de preguntas que sirvieron para evaluar si realmente estaban aprendiendo nuevos conceptos gracias al proyecto. Para el equipo docente universitario fue reconfortante comprobar que los alumnos respondieron positivamente a las preguntas que se les formularon, y que por lo tanto realmente habían captado la información que se les pretendía transmitir.

Los resultados obtenidos analizando las encuestas, unido a las apreciaciones realizadas durante el desarrollo de las actividades, nos permiten concluir que los objetivos mencionados al principio de este documento se han cumplido satisfactoriamente. Los estudiantes han aprovechado las actividades, que les han resultado útiles a la vez que entretenidas.

Además de nuestra valoración, añadimos la realizada por el jurado de Expociencia, que también aportó sus opiniones y valoraciones acerca del proyecto. Como punto fuerte destacaron que la temática del presente proyecto es muy interesante a la hora de concienciar a la sociedad y que convierte el área de la microbiología en muy atractiva, ya que tanto los estudiantes del colegio y del instituto como los visitantes de Expociencia son capaces de ver en vivo la biodiversidad microbológica y la capacidad que tienen los microorganismos de inhibir el crecimiento de otros en beneficio de su propia supervivencia. Sin embargo, como punto débil destacaron que el proyecto estaba demasiado centrado en el ámbito científico y que era necesario prestar más atención a los aspectos didácticos.

En todo caso, hicieron hincapié en que todos los proyectos fueron muy interesantes y que se hizo notar el trabajo que hay detrás de todos ellos.

Valoración personal

Por último, mi conclusión como coordinador del proyecto es que el programa se ha cumplido con éxito y de manera muy satisfactoria. Los objetivos principales del proyecto se han cumplido. Por una parte, hemos concienciado tanto a los alumnos como a sus familias sobre el problema que causa el mal uso/abuso de antibióticos sobre la generación de resistencias bacterianas a antibióticos. Asimismo, la realización de un proyecto ApS no solo ha favorecido un aprendizaje activo de los estudiantes y un servicio a su comunidad, sino que además ha permitido despertar el interés por la ciencia y su divulgación a través de la cooperación entre distintos niveles educativos. Otro de los objetivos de los proyectos de ApS es la complementación del contenido curricular en diferentes niveles educativos. Dicho objetivo también se ha llevado a cabo satisfactoriamente, puesto que los estudiantes han adquirido diferentes conceptos y conocimientos de relación directa con los bloques de contenidos, tanto de bachillerato como de primaria. También ha abierto la posibilidad de que los estudiantes puedan llevar a cabo cambios en su comunidad, lo que refuerza su interés por el aprendizaje de nuevos conceptos y habilidades. En último término este proyecto ApS ha contribuido a que los estudiantes y la comunidad más próxima a ellos sean más responsable con el uso y consumo de antibióticos, así como más respetuosos con el medio ambiente. Finalmente, este proyecto ha dado lugar a nuevas investigaciones para descubrir bacterias productoras de nuevos antibióticos.

No obstante, también ha habido distintos contratiempos, uno de los mayores fue la organización del tiempo y la coordinación entre distintos centros. No sin dificultades, finalmente hubo tiempo suficiente para cumplir con el horario establecido. Por otra parte, los alumnos del IES Vicent Andrés Estellés realizaron una importante labor, ya que su trabajo fue determinante para el desarrollo de las actividades, implicándose a fondo tanto en las actividades de la primera fase del proyecto en las que participaron como estudiantes como en las actividades en las que participaron como monitores de los estudiantes del CEIP San Juan de Ribera. No puedo menos que agradecer a todos los integrantes del equipo su elevado grado de compromiso, trabajo e ilusión, que han permitido efectuar esta actividad de una manera satisfactoria.

4. Caracterización inicial de aislados bacterianos

En primer lugar, realizamos una selección de 12 aislados bacterianos (**Tabla 16**) que habían producido halos de antibiosis en las pruebas preliminares realizadas en diferentes institutos y formaban colonias con morfologías y colores variados.

Tabla 16. Aislados bacterianos seleccionados para su posterior identificación molecular.

Nombre del aislado	Nombre del centro en el que se aisló
UIX-6-9	IES Benigasló
AUX-3-6	Colegio Maria Auxiliadora
LAP-11-18	IES Benicalap
XIM-11-8	IES Ximén d'Urrea
XIM-20-4	IES Ximén d'Urrea
AUX-3-14	Colegio Maria Auxiliadora
UIX-6-6	IES Benigasló
XIM-16-4	IES Ximén d'Urrea
XIM-3-10	IES Ximén d'Urrea
XIM-3-14	IES Ximén d'Urrea
XIM-1-2	IES Ximén d'Urrea
XIM-17-9	IES Ximén d'Urrea

Tras la purificación de la selección de cepas bacterianas que habían mostrado halos de inhibición más notables frente a alguna de las dos cepas testigo utilizadas (**Figura 29**), se procedió a realizar una tinción Gram, determinándose así mismo la morfología celular. Los resultados se muestran en la **Figura 30** y en la **Tabla 17**.

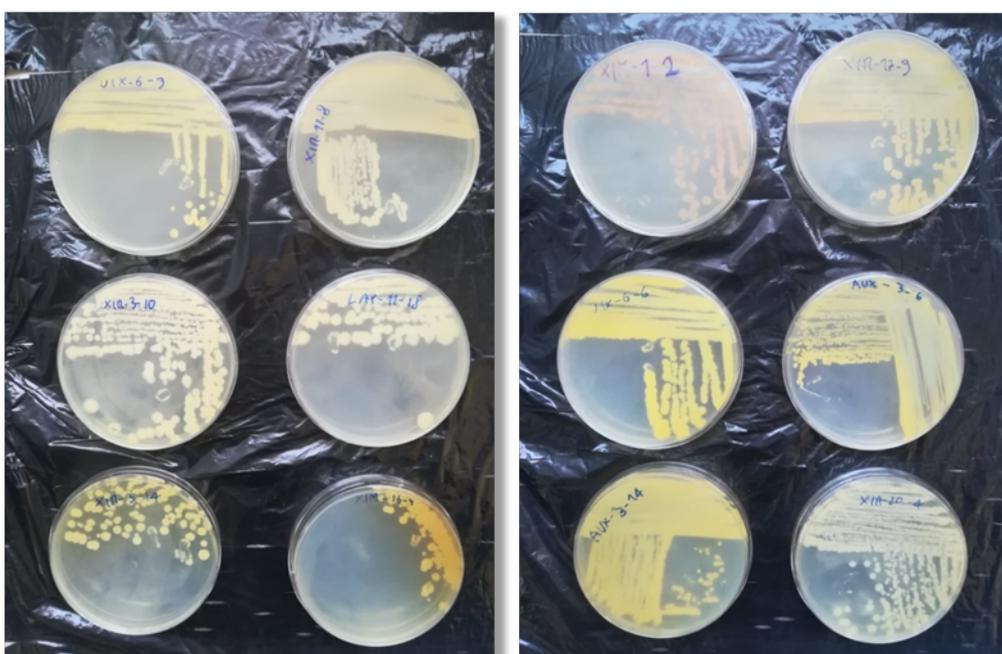


Figura 29. Cultivos puros de las cepas seleccionadas para su identificación.

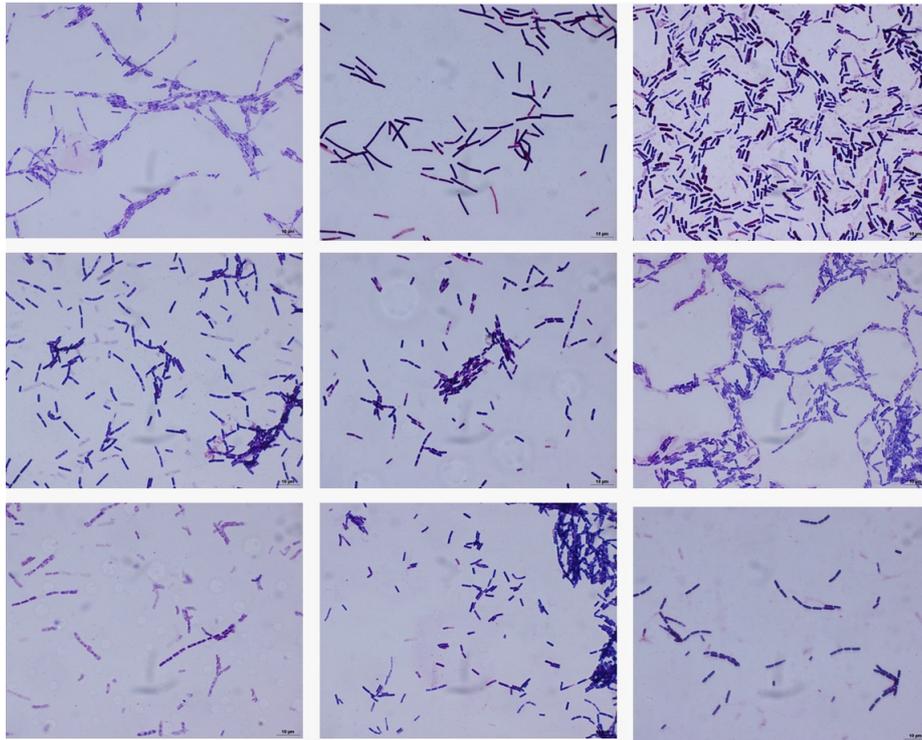


Figura 30. Imágenes tomadas del microscopio óptico (100x) de algunas de las cepas bacterianas identificadas y caracterizadas.

A continuación, se realizó la identificación molecular mediante dos técnicas complementarias, análisis de la secuencia parcial del rDNA 16S y MALDI-TOF. En la **Figura 31** se puede observar una foto representativa de los amplificados obtenidos por PCR con los cebadores 616V.F – 699R dirigidos al gen ribosómico *16S*, tras su separación electroforética en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Se obtuvo el fragmento del tamaño esperado, de 1000 pb, excepto en el caso del control negativo.

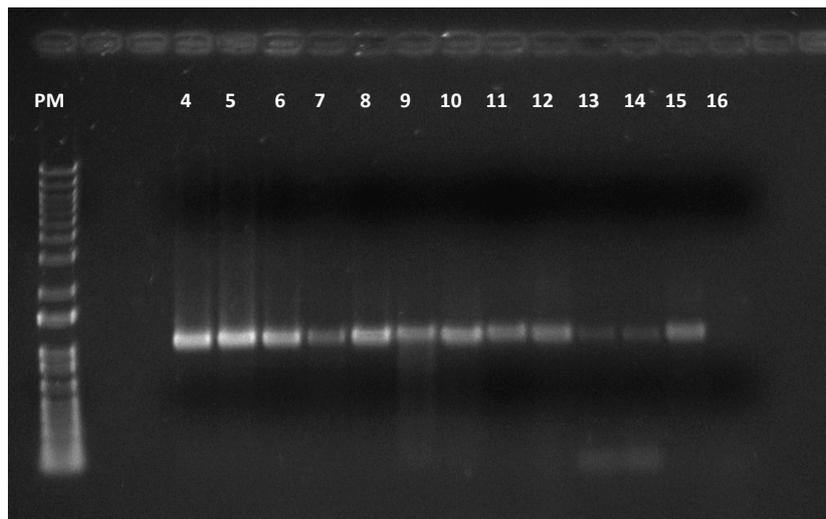


Figura 31. Resultados representativos de la PCR con los cebadores 616V y 699R tras la separación de los amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa. Pocillo 1: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Pocillos 4-15: Muestras de DNA siguiendo el orden de la Tabla 16. Pocillo 16: Control negativo.

Tabla 17. Caracterización parcial e identificación de los aislados bacterianos seleccionados.

Código	Gram	Morfología	16s rDNA	rDNA puntuación ¹	MALDI-TOF	M-TOF puntuación ²	M-TOF índice ³
UIX-6-9	+	Coco	<i>Arthrobacter rhombi</i>	98,19	No identificada	1,46	C
AUX-3-6	+	Coco	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	99,87	<i>Paenarthrobacter aurescens</i>	2,48	A
LAP-11-18	+	Bacilo	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus mycoides</i>	1,98	B
XIM-11-8	+	Coco-bacilo	<i>Arthrobacter psychrophenicus</i>	97,56	<i>Paeniglutamicibacter psychrophenicus</i>	1,72	B
XIM-20-4	+	Coco	<i>Bacillus megaterium</i>	100	<i>Bacillus megaterium</i>	2,07	A
AUX-3-14	+	Coco	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	99,86	<i>Paenarthrobacter aurescens</i>	2,43	A
UIX-6-6	+	Coco	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	99,87	<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>	2,58	A
XIM-16-4	+	Coco	<i>Bacillus simplex</i>	99,85	<i>Bacillus simplex</i>	2,09	A
XIM-3-10	+	Coco	<i>Bacillus cereus</i>	99,55	<i>Bacillus cereus</i>	2,28	A
XIM-3-14	+	Bacilo	<i>Bacillus simplex</i>	99,83	<i>Bacillus simplex</i>	2,10	A
XIM-1-2	+	Bacilo	<i>Bacillus infantis</i>	99,78	<i>Bacillus infantis</i>	2,29	A
XIM-17-9	+	Coco	<i>Sphingobacterium faecium</i>	99,32	<i>Sphingobacterium faecium</i>	1,74	B

¹Nivel de confianza de la secuenciación

²Puntuación: <1,69, no identificación; 1,70-1,99, baja confianza; 2,00-3,00, alta confianza

³Índice de consistencia: A, alto; B, bajo; C, no consistencia

Los resultados de la identificación de las diferentes cepas por ambas técnicas mostraron un elevado grado de coincidencia (**Tabla 17**). Una de las discrepancias entre los dos métodos se encontró en la nomenclatura de un mismo aislado, que se asignó aparentemente a dos especies distintas, *Arthrobacter arilaitensis* (secuenciación de DNA) y *Glutamicibacter arilaitensis* (MALDI-TOF). Al igual que con *A. psychrophenicus* y *Paeniglutamicibacter psychrophenicus*. Esto se debe a una reciente reclasificación del antiguo género *Arthrobacter* en dos nuevos géneros, entre los cuales figuran *Glutamicibacter* y *Paeniglutamicibacter* (Busse, 2016), así como al uso de distintas bases de datos según la técnica utilizada.

Se encontraron otras discrepancias como la observada en la identificación del aislado UIX-6-9, identificado como *A. rhombi* por secuenciación mientras que no se pudo identificar por MALDI-TOF. Los aislados AUX-3-6 y AUX-3-14 mostraron discrepancias por lo que respecta a la identificación a nivel de especie. Esto se debe a que dentro de un mismo género el grado de parentesco entre las especies es cercano y puede dar lugar a una identificación ligeramente diferente, en función de la base de datos utilizada en cada método.

Los géneros identificados se corresponden con bacterias características de suelos, coincidiendo con estudios previos, en los que se han descrito como bacterias del suelo las de los géneros *Bacillus* (Drobniewski, 1993), *Sphingobacterium* (Armalyte *et al.*, 2019) y *Arthrobacter* (Kamigiri, 1996).

Coincidiendo también con la bibliografía, los géneros identificados también se caracterizan producir compuestos antimicrobianos. En concreto las cepas del género *Bacillus* son capaces de generar una gran cantidad de compuestos antimicrobianos (Madigan *et al.*, 2015). En 1977 ya se conocían 167 péptidos antimicrobianos diferentes producidos por bacterias de este género (Katz y Demain, 1977).

En conclusión, gracias a la labor realizada en el proyecto con la ayuda de los estudiantes de los diferentes institutos y el colegio se han logrado aislar cepas bacterianas productoras de compuestos antimicrobianos provenientes de las muestras de suelo. Su identificación ha revelado una diversidad de especies bacterianas del suelo, algunas de las cuales se han descrito como productoras de antibióticos.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer este proyecto a todo el equipo que ha colaborado conmigo para llevarlo a cabo. A los profesores y alumnos de los centros por su participación y entusiasmo, a mis tutores por guiarme para cumplir con los objetivos marcados y a mi compañero de laboratorio Luigi por su apoyo durante los momentos más duros. Especialmente, me gustaría agradecer de corazón a los estudiantes del IES Vicent Andrés Estellés participantes, los cuales desde el primer momento se implicaron en la actividad demostrando un gran sentido de la responsabilidad y un enorme interés. Muchas gracias a todos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamsen, L. (2004). Learning partnerships between undergraduate biology students and younger learners. *Microbiology Education*, 5, 21-29.
- Arahal, D. (2008). Value of recN sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family “*Leuconostocaceae*”. *International Microbiology*, 11, 33-39.
- Arboleda, F., Caicedo, F., Bermudez, D., Mora, C. L., Rojas, T. y Torres, C. F. (2016). Garittea del campo al campus. *Massat. E. Universidades solidarias*, 2, 129-135.
- Arboleda, F., Caicedo, F., Bermudez, D., Mora, C. L., Rojas, T. y Torres, C. F. (2016). Garittea del campo al campus. *Massat. E. Universidades solidarias*, 2, 136-140.
- Armalyte, J., Skerniskyte, J., Bakiene, E., Krasauskas, R., Siugzdiniene, R., Kareviene, V., Kerziene, S., Klimiene, I., Suziedeliene, E. y Ruzauskas, M. (2019). Microbial diversity and antimicrobial resistance profile in microbiota from soils of conventional and organic farming systems. *Frontiers in Microbiology*, 10, 892.
- Beltrán, O. (2013). Del aprendizaje en el servicio al medio ambiente. Centro para la solidaridad y la filantropía. *Proyectos de Aprendizaje en el Servicio 2012*, 22. Monterrey, Nuevo León: UDEM.
- Busse, H. J. (2016). Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensulato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 9-37.
- Casado, L. (2015). Aprendizaje servicio. Proceso de mejora para la ciudadanía. (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de Valladolid, Palencia.
- Casanova, M., Vera, W., Luzio, W. y Salazar, O. (2004). Guía de clases prácticas de edafología. Universidad de Chile, Chile.
- CDC (2013). Antibiotic resistance threats in The United States. U.S. Department of Health and Human Services. Centers for disease, control and prevention.
- Cervelló, J., Garriga, L., Langreo, S., Martínez, M. M., Moreno, F., Ochoa, L. y Ribas, C. (2009). Educación científica “Ahora”: El informe Rocard. Ministerio de Educación, Gobierno de España.
- Drobniewsky, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiological Reviews*, 6(4), 324-338.
- Field, B. y Hall, K. (2014). A multidisciplinary design and analysis for a green roof installation. *121St ASEE Annual Conference and Exposition*. Indianapolis. 15-18 de junio de 2014.
- Decreto Currículum 87/2015. (2015). Diario Oficial de la Comunidad Valenciana.

- Ferrán-Zubillaga, A., y Guinot-Viciano, C. (2012). Aprendizaje-servicio: propuesta metodológica para trabajar competencias. *Portularia*, 12(Addenda), 187–195.
- Floss, H. G. y Yu, T-W. (2005). Rifamycin mode of action, resistance and biosynthesis. *Chemical Reviews* 105(2), 621-632.
- Franco-Duarte, R., Cernakova, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stepien, K., Leszczewicz, M., Tintino, S. R., Cintia, V., Sharifi-Rad, J., Coutinho, H. D. M., Martins, N. y Rodrigues, C. F. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms - From past to present. *Microorganisms*, 7(5), 130
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T. y Ishi. S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications - a review. *Journal of Applied Microbiology* 123(3), 570-581.
- Jeyaraj, N. (2011). Environmental service learning. Experience of a few Indian colleges. Paper presented at the 3rd Asia-Pacific Regional Conference on Service Learning: Theory and Practice of Service-Learning: Cross-cultural service-Learning programme in Asia-Pacific Region, Hong Kong.
- Kamigiri, K. (1996). A novel quinolone antibiotic produced by *Arthrobacter* sp. *The Journal of Antibiotics*. 49, 823– 825.
- Kathrin, I. (2016). History of antibiotics research. *How to Overcome the Antibiosis Crisis*, 237-272.
- Krishnamurthy, M., Moore, R. T., Rajamani, S. y Panchal, R. G. (2016). Bacterial genome engineering and synthetic biology: combating pathogens. *BMC Microbiology*, 16-258.
- Kumar, M., Jaiswalb, S., Sodhia, K. K., Shreea, P., Singha, K., Agrawalc, P. K., Shuklab, P. (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International* 124, 448–461.
- Lagier, J-C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P-E., La Scola, B. y Raoult, D. (2015). The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 237-264.
- Lin, D. M., Koskella, B. y Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162-173.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. y Clark, D. P. (2015). Brock, biología de los microorganismos. 14E.
- Maier, T, Klepel, S, Renner, U, Kostrzewa, M. Fast and reliable. (2006) MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Methods*, 22.

- Martínez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 33-39.
- Matamp, N. y Bhat, S. G. (2019). Phage endolysins as potential antimicrobials against multidrug resistant *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*: Current status of research and challenges ahead. *Microorganisms*, 7(3), 84
- Medina, E. y Pieper, D. H. (2016). Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria. *How to Overcome the Antibiotic Crisis*, 398, 3-33.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T. y Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18(3):268-81.
- Milshcheyn, A., Colosimo, D. A. y Brady, S. F. (2018). Accessing bioactive natural products from the human microbiome. *Cell Host and Microbe*, 23(6), 725-736.
- Munita, J. M. y Arias, C. A. (2015). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2).
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance*.
- Pagès, J. M., James, C. E. y Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893-903.
- Parece, T. y Aspaas, H. (2007). Reedy Creek Cleanup: The evolution of a university geography service-learning project. *Journal of Geography*, 106(4), 153-161.
- Peñúñuri, I. (2013). Troyanos en bici. Centro para la solidaridad y la filantropía. *Proyectos de Aprendizaje en el Servicio 2012*, 23. Monterrey, Nuevo León: UDEM.
- Pontificia Universidad Católica del Ecuador. (2014). Captación para la creación de huertos caseros por el método de la hidroponía. Kelly, V. *Universidades Solidarias*, 67-69.
- Ramírez, S. M. y Tomalsky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151-171.
- Ryan, M. (2012). Service-Learning after learn and serve America: How five states are moving forward. Education Commission of the States, June 2012.
- Sabariego, J. M. y Manzanares, M. (2006). Alfabetización científica. Congreso Iberoamericano de Ciencia, Tecnología, Sociedad e Innovación.

- Uroz, S., Kelly, L. C., Turpault, M. P., Lepleux, C. y Frey-Klett, P. (2015). The mineralosphere concept: Mineralogical control of the distribution and function of mineral-associated bacterial communities. *Trends in Microbiology*, 23(12), 751-762.
- Zunzunegui, M. (2017). Revisión bibliográfica sobre proyectos de medio ambiente y aprendizaje-servicio en el ámbito universitario. (Trabajo de Fin de Grado). Universitat de València, Valencia.

WEBGRAFÍA

Baker, L. (2015). Centre for community partnerships. Theory and praxis in food security. <http://www.studentlife.utoronto.ca/ccp/NEW342>

Competencias Clave. Ministerio de Educación y Formación Profesional. Gobierno de España. <https://www.educacionyfp.gob.es/educacion/mc/lomce/inicio.html>

Organización Mundial de la Salud. Farmacoresistencia. Preguntas más comunes sobre la resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/drugresistance/faq/es/>

Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Ribosomal RNA Sizes. ThermoFisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/ribosomal-rna-sizes.html>

Universidad de Granada. Introducción a la edafología, tema 2. Constituyentes del suelo. <http://edafologia.ugr.es/introeda/tema00/progr.htm>

Universitat de València. Biología. Prácticas de microbiología. <http://roderic.uv.es/handle/10550/63494>

University of Toronto-Mississauga. Restoration Ecology II. <https://www.utm.utoronto.ca/experience/experiential-learning-credit/community-engaged-service-learning/community-engaged-service-learning-2>

Anexo 1

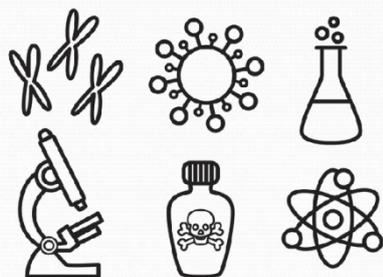
PROYECTO NATURA



Coordinador: Diego Arnal Sáez
Profesores: Sergi Maicas, Elena G. Biosca, Ángela Figàs,
Margarita Ortigosa, Dori Palencia, Juan José Pérez
2019

¿Qué son los Proyectos Natura?

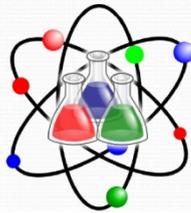
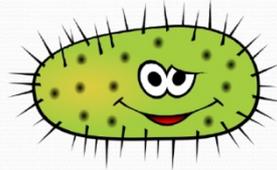
- Estrategia ApS.
- Proyectos de **divulgación** en institutos y colegios.
- Proyectos **multidisciplinares**.



Objetivos



- Divulgar ciencia en universidades, institutos y colegios.
- Despertar espíritu científico.
- Concienciar a la gente.
- Mejorar formación científica de los estudiantes.



Participantes

- Profesores y alumnos de la universidad.
- Profesores y alumnos de institutos.
- Profesores y alumnos de colegios.



1ª FASE: INSTITUTO

Proyecto SWI@VAL
IES Vicent Andrés Estellés



Sesiones

5 sesiones prácticas en aula:

- 1ª sesión: Toma de muestra de suelo.
- 2ª sesión: Cultivo de la biodiversidad.
- 3ª sesión: Aislamiento de microorganismos en cultivo puro.
- 4ª sesión: Ensayo de antibiosis sobre microorganismos testigos.
- 5ª sesión: Conclusiones.



2ª FASE: COLEGIO

CEIP San Juan de Ribera



Sesiones

- 1ª sesión: Introducción al proyecto.
Cultivo de bacterias de la tierra.
- 2ª sesión: Cultivo de las bacterias junto con microorganismos testigo. (no se hará en el aula).
- 3ª sesión: Observación de la diversidad y de la inhibición producida. Preguntas, encuestas y conclusiones.



Introducción al proyecto

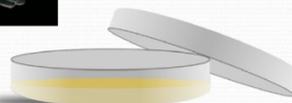
- ¿Qué es una bacteria?
- Diversidad microbiana.
- ¿Qué es un antibiótico?
- Auge de microorganismos resistentes a los antibióticos que producen enfermedades.
- Buscar alternativas.
- Medidas de seguridad.



Cultivo de bacterias de la tierra

Diluciones de tierra ya preparadas.

1. Mojar una torunda estéril en la muestra de tierra diluida.
2. Extender la torunda uniformemente por la superficie de la placa correspondiente a cada tubo.
3. Incubar en el laboratorio a 28 °C hasta la próxima sesión.



Grupos de alumnos

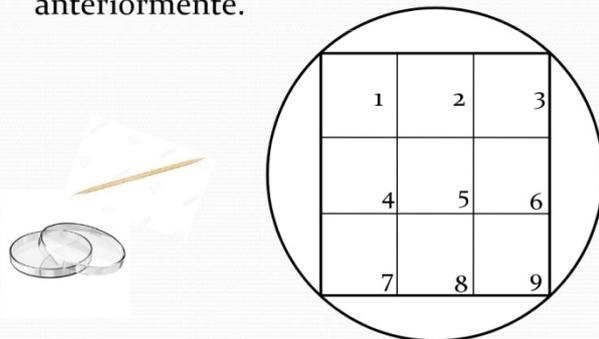
- 2 clases, una de 21 alumnos y otra de 24
- 5 grupos de 4 o 5 alumnos por clase, 10 grupos en total

Se les repartirán 6 placas de medio de cultivo, 6 torundas y los tubos con las correspondientes diluciones a cada grupo de alumnos. Cada alumno sembrará una placa, pero habrá alumnos que repetirán la siembra. Se les repartirá también una bata a cada uno y habrá cajas de guantes para que cojan guantes.

Se les explicará que las placas tienen dentro medio de cultivo, que es la “comida” de las bacterias, lo que hace que crezcan.

Cultivo de las bacterias frente a microorganismos testigo (no se hará en el aula)

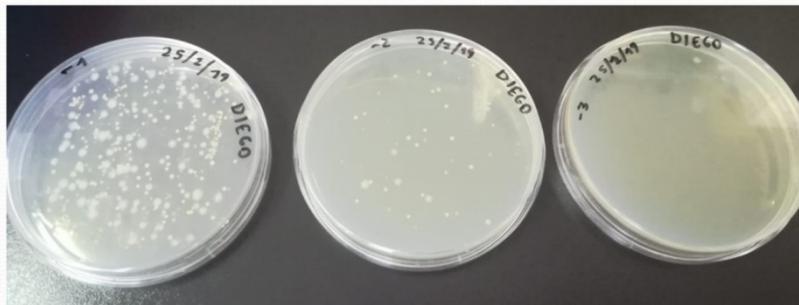
- Cultivar 9 bacterias de las crecidas en las placas en dos placas que contienen *Bacillus cereus* y *E. coli* ya incubadas anteriormente.



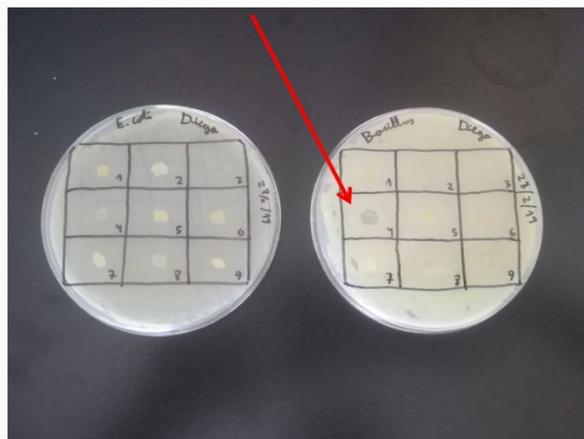
Observar diversidad

Objetivo:

Ser capaces de apreciar la diversidad microbiana que podemos encontrar en una muestra de tierra.



Ver inhibición producida



Preguntas y encuestas

- De la misma forma en que se hizo en el instituto, los alumnos deberán rellenar unas **encuestas anónimas** para evaluar la actividad.
- Además, al final del cuadernillo de prácticas tienen unas **preguntas** que deberán responder durante la última sesión.

Conclusiones

En esta sesión es importante recordarles los objetivos de las prácticas y valorar si se han cumplido:

- Divulgar ciencia en universidades, institutos y colegios.
- Despertar espíritu científico.
- Concienciar a la gente.
- Mejorar formación científica de los estudiantes.

CUÉNTALO!!



Anexo 2

PROYECTO NATURA



Diego Arnal Sáez

Proyecto Natura



INTRODUCCIÓN

¿Qué son las bacterias?

Las **bacterias** son **microorganismos**. Son seres vivos microscópicos, lo que quiere decir que no los podemos ver a simple vista a no ser que haya muchas juntas formando una **colonia**. Para ver una sola bacteria necesitamos un **microscopio**.

No todas son malas, de hecho muchas son buenas, pero algunas de ellas producen enfermedades si nos infectan. Las bacterias son un grupo de seres vivos muy diverso. Hay muchísimas, muy diferentes entre sí, y están por todas partes. ¡Hay bacterias incluso en nuestras caras y manos!

¿Qué son los antibióticos?

Los **antibióticos** son un tipo de medicamento que **mata a las bacterias**. Cuando vamos a la consulta del médico porque nos encontramos mal, si el médico ve que estamos enfermos por culpa de que nos ha infectado una bacteria muchas veces nos receta un antibiótico, nos lo tomamos, y volvemos a estar sanos.

Sin embargo, las cosas no son tan fáciles como parecen. Las bacterias se defienden, y mientras que las más débiles mueren enseguida, hay algunas que resisten. Las que resisten son las que luego se reproducen, hasta que al final todas las débiles mueren y sólo hay bacterias resistentes. Entonces es cuando el antibiótico deja de funcionar.

¿Qué podemos hacer?

Utilizar los antibióticos sólo cuando sea necesario. Si tomamos muchos, favorecemos que haya más bacterias que resistan a ellos. Debemos tomar antibióticos **sólo cuando nos los recete el médico y durante el tiempo que él/ella nos diga**.

También podemos **buscar nuevos antibióticos**. ¿Cómo hacemos esto? Primero hay que saber que los antibióticos los producen las bacterias y los hongos para luchar contra otras formas de vida que les amenazan. ¿Y dónde encontramos esas bacterias? Ya hemos respondido antes a esa pregunta: **¡Las bacterias están en todas partes!**

MEDIDAS DE SEGURIDAD

Durante estas sesiones, debemos seguir unas normas de seguridad. Anteriormente hemos visto que las bacterias pueden provocar infecciones, y en estas sesiones vamos a trabajar con diferentes tipos de bacterias. Sin embargo, no nos pasará nada si seguimos unas instrucciones muy sencillas:

1. Lavarnos las manos siempre antes y después de trabajar

Es muy importante siempre lavarnos las manos con agua y jabón. Recordad que estamos trabajando con bacterias y podemos coger alguna infección si no nos lavamos las manos.

2. Llevar puestos siempre los guantes y la bata

La bata y los guantes sirven para que las bacterias no estén en contacto con nuestra piel. Mientras estamos trabajando con ellas es importante que llevemos puestos tanto los guantes como la bata.

3. Seguir las instrucciones de los monitores

Los monitores están aquí para enseñarnos y para asegurarse de que aprendemos de una forma segura. Si no entendemos algo o no sabemos qué hacer podemos levantar la mano y preguntarles a los monitores. Ellos nos ayudarán amablemente.



CULTIVO DE BACTERIAS DE LA TIERRA

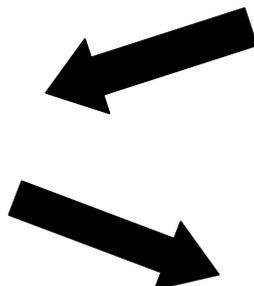
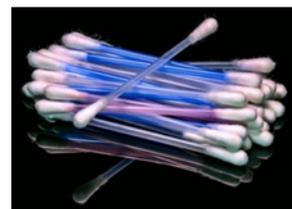
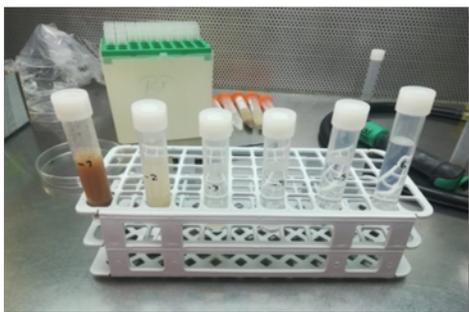
En la tierra podemos encontrar una gran cantidad de bacterias muy diferentes entre sí, entre las cuales puede haber algunas que produzcan antibióticos. En esta sesión cultivaremos las bacterias de la tierra para trabajar con ellas próximamente.

1. Material

- Torundas estériles.
- Tubos con tierra diluida.
- Placas con medio de cultivo (el medio de cultivo es el alimento que necesitan las bacterias para crecer).

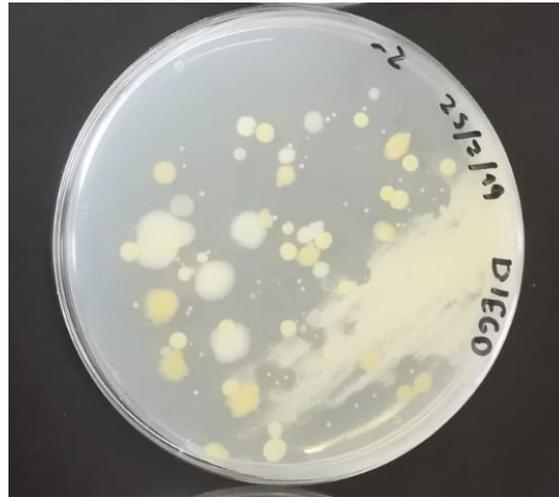
2. Procedimiento

1. Se saca la torunda del plástico sin que la punta de algodón toque nada.
2. Se abre el primer tubo con tierra diluida y se moja la punta de la torunda.
3. Se abre la placa y se extiende la punta de la torunda por la superficie de la placa. Luego la placa se vuelve a cerrar y los monitores las recogerán al final de la sesión. **NOTA:** No tocar el interior de la placa con las manos ni con nada que no sea la punta de la torunda.
4. Se repite el mismo procedimiento con los demás tubos.



OBSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD

En esta sesión veremos la cantidad de bacterias que pueden crecer en la tierra. Pueden tener muchas formas y colores, y además también podemos encontrar hongos.



Además, también veremos como algunas bacterias de la tierra producen antibióticos. Esto lo veremos porque cuando dos bacterias diferentes crecen juntas, si una de ellas produce algo que a la otra le puede matar, la segunda bacteria no crecerá cerca de la primera para no morir. Entonces veremos como se forman círculos donde no hay ninguna bacteria alrededor de las bacterias que producen antibióticos.



Anexo 3



Small World Initiative
crowdsourcing antibiotic discovery

Tiny Earth
studentsourcing antibiotic discovery

D+Dm
Grupo de Docencia y Difusión
Sociedad Española de Microbiología

Servei de Formació Permanent i Innovació Educativa

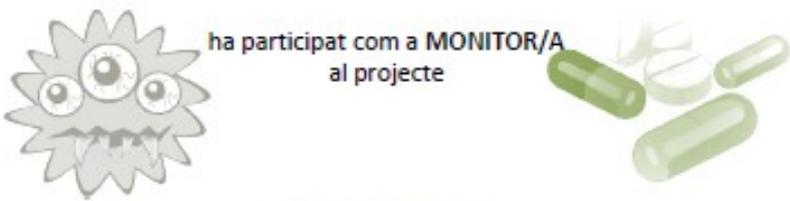
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Nom de l'alumne

alumne/a del centre

IES Vicent Andrés Estellés

ha participat com a MONITOR/A al projecte

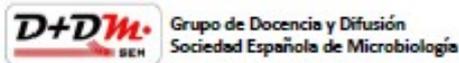


PROJECTE NATURA:
Descubriendo nuevos antibióticos producidos por microorganismos del suelo: SWI@VAL

Diego Arnal Sáez
Coordinador de la iniciativa SWI@VAL
al Projecte Natura

Sergi Maicas Prieto
Coordinador del Projecte SWI@VAL

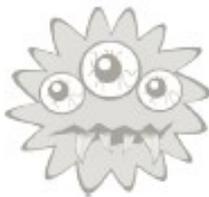
Universitat de València, Abril 2019



Nom de l'alumne

alumne/a del centre

CEIP San Juan de Ribera



ha participat al projecte



**PROJECTE NATURA:
Descubriendo nuevos antibióticos producidos por
microorganismos del suelo: SWI@VAL**

Diego Arnal Sáez
Coordinador de la iniciativa SWI@VAL
al Projecte Natura

Sergi Maicas Prieto
Coordinador del Projecte SWI@VAL

Universitat de València. Abril 2019

Anexo 4

PROJECTE NATURA

DESCOBRINT NOUS ANTIBIÒTICS PRODUÏTS PER MICROORGANISMES DEL SÒL

1. EQUIP PARTICIPANT

ÀREA TEMÀTICA: MICROBIOLOGIA					
Títol del projecte: Descobrint nous antibiòtics produïts per microorganismes del sòl					
	Nom i Cognoms	Centre	Localitat	Telèfon de contacte	Correu electrònic
Alumne UVEG	Arnal Sáez, Diego	Facultat de Biologia	Burjassot	606656380	diearsa@alumni.uv.es
Professor/a de la UVEG	González Biosca, Elena Maicas Prieto, Sergi Figàs Segura, Àngela	Facultat de Biologia	Burjassot	686777868 629688968 620936424	elena.biosca@uv.es; sergi.maicas@uv.es; angela.figas@uv.es
Professora de secundària	Ortigosa Güemez, Margarita	IES Vicent Andrés Estellés	Burjassot	657498669	margaritaortigosa@vice ntadresestelles.org
Mestra de Primària	Palencia Jiménez, Dori	CEIP San Juan de Ribera	Burjassot	645173626	adoraca@gmail.com

ALUMNES DE SECUNDÀRIA PARTICIPANTS	Curs	Assignatura
16 alumnes	1 ^{er} de Batxiller	Biologia i geologia

Nombre d'alumnes de primària que poden participar: 50 alumnes (2 classes)

Curs recomanat: tercer cicle de primària (6^é)

PROJECTE INTERDEPARTAMENTAL SI/NO: NO

DEPARTAMENTS QUE INTERVENEN: Departament de Microbiologia i Ecologia. El projecte està coordinat amb el RMD18-839102 (*Small World Initiative 2.0: A la búsqueda de nuevos productores de antibióticos mediante una estrategia ApS*), per la qual cosa, de manera puntual, aquest TFG pot rebre suport de les àrees d'Ecologia, Edafologia i Informàtica de la Universitat de València. Així mateixa, l'activitat es difondrà via la UCC-Càtedra de Divulgació de la Ciència.

2. OBJECTIUS

2.1 TEMA EN QUÈ S'ENMARCA EL PROJECTE: *Contextualització del projecte dins d'un marc temàtic concret de les Ciències Naturals*

Bloc temàtic de primària:

6^é de primària:

-Bloc 4: La salut, un bé comú.

Blocs temàtics de batxiller:

-Bloc 0: Metodologia científica. Els alumnes han d'anar avançant en la comprensió i utilització dels aspectes intel·lectuals i pràctics que els permeten afrontar els problemes des d'un punt de vista científic i augmentar la seua comprensió.

-Bloc 1: Els éssers vius: composició i funció. Característiques dels éssers vius i nivells d'organització dels mateixos.

2.2 CONCEPTE A TRANSMETRE: *quin és el concepte, idea bàsica o contingut essencial sobre el que es treballarà?*

Idea principal: Projecte de divulgació científica. El mal ús dels antibiòtics és un problema molt gran a la nostra societat actual (O'Neill 2016). Els microorganismes generen resistències degut a la selecció artificial que les persones hem aplicat sobre ells (Kumar et al., 2019). Aleshores es fa necessària la recerca de nous antibiòtics mitjançant processos respectuosos amb el medi ambient al mateix temps que la gent aprèn la relació que hi ha entre ciència i societat per a tractar de resoldre problemes que ens afecten directament.

Paraules clau: Aprenentatge-Servei (Aps), ciència ciutadana, micromecenatge, antibiòtics, selecció, microorganismes, medi ambient, resistències antimicrobianes.

2.3 OBJECTIUS: *què pot aportar en eixe sentit el nostre projecte, què esperem obtenir del desenvolupament del projecte?*

BATXILLER:

Objectiu didàctics: Transmetre als estudiants coneixements tant teòrics com pràctics sobre temes d'interés científic, millorar la cultura i la formació científica dels estudiants i crear sensibilitat respecte a les resistències microbianes.

Objectiu científics: Despertar l'interès científic dels estudiants. Trobar mostres de terra que presenten una alta diversitat de microorganismes. A partir d'aquestes mostres, trobar microorganismes productors d'antibiòtics nous i eficaços que puguin servir per a combatre malalties produïdes per bacteris resistents a un alt espectre d'antibiòtics.

PRIMÀRIA:

Objectius didàctics: Crear sensibilitat i coneixement de cara al problema de les resistències microbianes i transmetre conceptes bàsics de microbiologia.

Objectius científics: Despertar l'interès científic dels estudiants. Trobar mostres de terra que presenten una alta diversitat de microorganismes. A partir d'aquestes mostres, trobar microorganismes productors d'antibiòtics nous i eficaços que puguin servir per a combatre malalties produïdes per bacteris resistents a un alt espectre d'antibiòtics.

2.4. COMPETÈNCIES BÀSIQUES

- Coneixements de ciències naturals, concretament de Microbiologia i Ecologia, però també d'Edafologia en menor mesura.
- Treball en equip i cooperació.
- Consciència per a abordar problemes científics.
- Iniciativa per aprendre.
- Competències bàsiques en ciència i tecnologia.
- Competència aprendre a aprendre.

3. MATERIALS I METODOLOGIA

Materials:

- Tubs estèrils de plàstic
- Pots estèrils de plàstic
- Espàtules estèrils
- Caixes de guants de làtex o vinil
- Plaques Petri amb medi de cultiu TSA 1/10
- Plaques Petri amb medi de cultiu TSA

- Aigua destil·lada estèril
- Pipetes Pasteur
- Anses Digralsky
- Furgadents estèrils
- Retoladors permanents de punta fina
- Turundes estèrils
- Quadricula de referència amb 20 quadradets, 5x4, de la grandària d'una placa Petri.

Metodologia:

Batxiller:

- 1a sessió: Presentació i moderació d'un debat en l'IES sobre el problema de la resistència bacteriana i el seu impacte socioeconòmic. Explicació de la metodologia a realitzar. Els estudiants de l'IES entre esta sessió i la següent arrepleguen la mostra de terra que s'utilitza durant tot el projecte.
- 2a sessió: Desenvolupament de la pràctica en el laboratori de l'IES: Els estudiants sembren les mostres de sòl arreplegades anteriorment en plaques Petri amb medi TSA 1/10.
- 3a sessió: Desenvolupament de la pràctica en el laboratori de l'IES: Els estudiants veuen la diversitat microbiana que conté cada mostra de terra observant les diferents colònies que han crescut en el mig de cultiu. A més aïllen 20 colònies diferents de bacteris en una nova placa Petri.
- 4a sessió: Desenvolupament de la pràctica en el laboratori de l'IES: Amb els bacteris aïllats en la sessió anterior, els estudiants realitzen un assaig enfront de bacteris testimoni per a avaluar la possible producció d'antibiòtics.
- 5a sessió: Els estudiants veuen els resultats dels assajos. A més s'obri un altre debat en forma de preguntes que els estudiants responen per a assentar els seus coneixements.

Primària:

- 1ª sessió prèvia: Explicació de la segona fase del projecte als estudiants de batxiller.
- 2a sessió prèvia: Els estudiants de l'IES preparen les presentacions que exposaran en el CEIP, i es realitza una avaluació i correcció d'aquestes.
- 1a sessió pràctica: Introducció al projecte. Els estudiants de l'IES exposen les seues presentacions i els expliquen el projecte als estudiants del CEIP. Els estudiants del CEIP cultiven mostres ja preparades de terra diluïda en plaques Petri amb medi de cultiu TSA.
- 2a sessió pràctica: Els estudiants del CEIP observen en les plaques la diversitat microbiana veient les colònies crescudes en elles. Els alumnes del CEIP també poden veure fenòmens d'antibiosi. A més, responen a unes preguntes preparades per a ells per a assentar els seus coneixements.

Lloc i /o requeriments d'espai:

- Batxiller: Laboratori de l'institut.
- Primària: Dos classes del col·legi.

4. DESCRIPCIÓ DETALLADA

Amb les sessions mencionades anteriorment es busca formar els estudiants d'ambdós nivells educatius des d'un punt de vista científic. Per mitjà de la realització d'aquestes sessions no sols es busca generar coneixements de forma teòrica, sinó que també es busca que els estudiants puguin tindre referències visuals, i que ells mateixos puguin veure de forma il·lustrativa com el sòl alberga una gran quantitat de microorganismes diferents entre si i que alguns d'ells poden presentar propietats antimicrobianes. A més, un aspecte important d'aquestes sessions és que els alumnes realitzen per si mateixos un treball de laboratori que els permet obtenir els seus propis resultats i elaborar les seues conclusions.

A continuació s'arregla el procediment de cadascuna de les sessions pràctiques realitzades:

Batxiller: (*Small World Initiative*)

- **1^a sessió:**

Primer s'explica el projecte en línies generals. Es realitza l'explicació corresponent sobre l'impacte de les resistències microbianes com a problema de gran magnitud. També s'expliquen les mesures de seguretat treballant amb microorganismes. Es proporciona als estudiants el material necessari per a realitzar la recollida de mostra de sòl, i després són els estudiants els que realitzen el procediment:

- 1- Se selecciona el lloc on es va a prendre la mostra.
- 2- S'anoten totes les dades en el full de presa de mostres.
- 3- Amb els guants posats s'excava amb l'ajuda d'una espàtula estèril per a arregar la terra.
- 4- Se pren un tub estèril de 15 mL, s'obri i es pren una mostra d'aproximadament 1 gram de sòl.
- 5- Se pren també un pot estèril de 100 mL, s'obri i s'ompli amb una mostra de sòl sense arrels ni pedres per a realitzar posteriorment un estudi edafològic.
- 6- Se retola el tub amb el codi corresponent a la teua parella.
- 7- Se guarda la mostra protegida de la llum solar a una temperatura semblant a la del lloc d'on s'ha arregat.

- **2^a sessió:**

Una volta s'ha arregat la mostra de sòl, es treballa al laboratori de l'IES.

- 1- Es retola una bateria de quatre tubs estèrils de manera ordenada amb les dilucions que es van a realitzar (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) i tres plaques amb agar (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}).
- 2- S'afegeixen 9 mL d'aigua destil·lada estèril al tub que conté 1 g de mostra de sòl.
- 3- Es transfereix amb una pipeta Pasteur estèril d'un sol ús 1 mL de la mostra ben homogeneïtzada al primer tub (marcat 10^{-1}) que conté 9 mL d'aigua destil·lada i es mescla bé.
- 4- Es repeteix el procés amb atenció fins a realitzar les quatre dilucions 1/10 seriades respecte a la mostra original.
- 5- Començant per la més diluïda, es prenen 2 gotes de cada mostra amb la pipeta Pasteur estèril d'un sol ús i s'estenen per la superfície de l'agar de les plaques corresponents amb l'ajuda de l'ansa Digralsky.

6- S'incuben les plaques a temperatura ambient durant uns quants dies fins que apareguen colònies visibles en la superfície de l'agar.

- **3^a sessió:**
 - 1- Es calcula el nombre d'unitats formadores de colònies per mil·lilitre.
 - 2- Es marca per la part de fora de la placa cada colònia que es pretén aïllar amb un número de l'1 al 20.
 - 3- Es retola la base de la placa dibuixant una quadrícula utilitzant una que es dona de referència i es marca cada quadradet amb un número de l'1 al 20.
 - 4- Es trau un furgadents i es toca una de les colònies amb ell. El furgadents ha de tocar només la colònia, i després es toca suaument amb el furgadents el quadradet corresponent en la placa de la quadrícula.
- **4^a sessió:**
 - 1- Amb l'ajuda dels furgadents estèrils se sembra d'un en un cadascun dels microorganismes aïllats en la sessió anterior en la placa que conté *Bacillus cereus* fent altra vegada la quadrícula en la placa.
 - 2- Es repeteix el procés amb els mateixos microorganismes en la placa que conté *E. coli*.
 - 3- Es guarden les plaques a 28°C durant 48 hores.
- **5^a sessió:**

En aquesta sessió s'observen els halos d'inhibició en el creixement dels bacteris testic (si n'hi ha) a les plaques sembrades durant la sessió anterior. Si hi ha halo en la placa amb *Bacillus*, significa que es produeix un antibiòtic front a *Bacillus*. Si hi ha halo en la placa amb *E. coli*, significa que es produeix un antibiòtic front a *E. coli*. Durant aquesta sessió els alumnes responen a preguntes proposades pels monitors per a comprovar si han entès els conceptes principals i realitzen unes enquestes per a avaluar l'activitat.

Després d'aquestes sessions es realitzen les dues sessions prèvies amb els alumnes de l'IES que consisteixen en preparar-los per a ser els monitors dels alumnes del CEIP. En aquestes dues sessions se'ls explica com han de preparar les exposicions i com han d'explicar els conceptes per què els alumnes del CEIP puguin entendre-los. És prioritari que els alumnes de primària entenguin la importància de no automedicar-se, i de consumir antibiòtics expressament quan els recepte el metge, com recomana la Organització Mundial de la Salut, i que entenguin què és el que estan fent a les sessions.

A més, abans de la realització de les sessions pràctiques, s'estudien les diferents mostres de terra per veure de la biodiversitat que es pot trobar en elles al laboratori de la Universitat, i es preparen tubs amb diferents dilucions de les terres escollides per a que després els alumnes puguin treballar amb elles.

Entre la primera i la segona sessió al CEIP, es fan també a la Universitat assajos d'antibiosi amb els bacteris crescuts a les plaques que ells mateixos sembraren amb les mostres de terra durant la primera sessió per a que puguin veure resultats a la segona sessió.

Primària:

- **1ª sessió:**

El primer que es fa és l'explicació per part dels alumnes de l'IES. Aquests exposen la seua presentació i expliquen les mesures de seguretat als alumnes del CEIP. Després se'ls proporciona el material que utilitzaran durant aquesta primera sessió, que són bates, guants, plaques petri amb mig de cultiu, turundes estèrils, retoladors, i 6 tubs per cada grup de 4 o 5 alumnes amb la terra diluïda preparada anteriorment al laboratori. Quan tenen el material, els alumnes del CEIP poden començar amb el procediment.

1- Es retolen les plaques amb el nom de l'equip i amb el número de la dilució.

2- Es trau la turunda del plàstic sense que la punta de cotó toque res.

3- S'obri el primer tub amb terra diluïda i es mulla la punta de la turunda.

4- S'obri la placa i s'estén la punta de la turunda per la superfície de la placa.

5- Es repeteixen dos vegades més els passos 2 i 3 utilitzant la mateixa turunda.

6- Es tanca la placa i s'entrega a un monitor.

7- Es repeteix el mateix procediment amb els altres tubs.

- **2ª sessió:**

Els estudiants de l'IES tornen a realitzar una explicació per a que els estudiants del CEIP puguin entendre els resultats que van a veure. Després, se'ls donen les plaques on han crescut els microorganismes de les mostres de sòl que ells van sembrar a les plaques i se'ls donen també els assajos d'antibiosi realitzats entre les dues sessions al laboratori de la Universitat, on poden veure com alguns bacteris són capaços d'inhibir el creixement d'altres, és a dir, que poden produir antibiòtics.

Finalment els alumnes de primària contesten a unes preguntes bàsiques per a avaluar si han entès els conceptes principals del projecte, i després contesten a enquestes anònimes igual que ho van fer els estudiants de batxiller durant la primera fase del projecte, les quals serveixen per a avaluar el projecte en línies generals.

Resultats:

Com s'ha comentat anteriorment, durant aquest projecte es va buscar que els estudiants pogueren obtindre els seus propis resultats i aprendre d'ells. Els assajos d'antibiosi realitzats durant les dues fases van donar els resultats següents:

Taula 1. Resultats dels assajos d'antibiosis.

	Nombre de colònies estudiades	Halos <i>Bacillus</i>	Halos <i>E. coli</i>	% de colònies amb activitat antimicrobiana
IES	120	13	2	12,50%
Col·legi	320	15	0	4,68%

Els alumnes van poder veure resultats tant positius com negatius als assajos, però també van poder veure que avui en dia és molt difícil trobar bacteris amb activitat antimicrobiana, però que es poden trobar i poden tindre propietats interessants. En l'apartat **IMATGES DEL DESENVOLUPAMENT DEL PROJECTE** es poden apreciar també imatges dels assajos d'antibiosis realitzats.

Per una altra part, els estudiants també van poder veure la diversitat de microorganismes que poden créixer a partir d'una mostra de sòl (**Figura 1**). També van veure com depenent de la dilució de terra utilitzada per a sembrar les plaques, el nombre de colònies crescudes varia, perquè com menys mostra de terra hi ha, menys microorganismes hi haurà a la mostra.

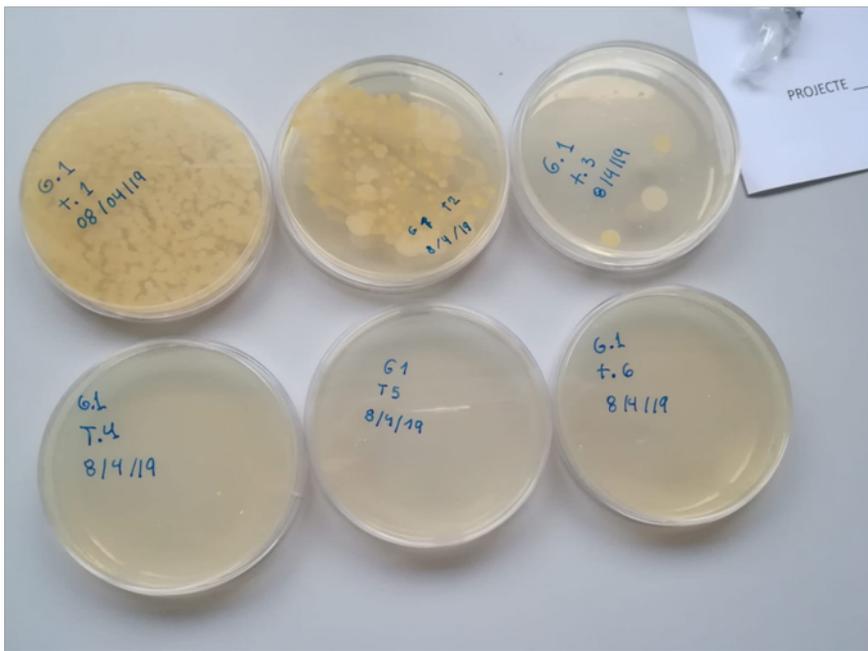


Figura 1. Exemple de plaques de medi de cultiu sembrades pels alumnes de primària una vegada crescuts els microorganismes en elles.

Com podem observar a la **Figura 1**, la quantitat de colònies de microorganismes disminueix d'una dilució a la següent.

Enquestes de satisfacció:

Com s'ha comentat anteriorment, els alumnes tant de primària com de batxiller van realitzar enquestes anònimes per a avaluar diferents característiques del projecte. Per tal d'obtenir aquests resultats cada estudiant va avaluar de l'1 al 5 diferents aspectes de l'activitat. Després es va traure la mitjana de la puntuació donada pels estudiants per a cada aspecte. Els resultats mostrats en les **taules 2 i 3** van ser els següents:

Taula 2. Resultats de les enquestes de satisfacció dels estudiants de l'IES Vicent Andrés Estellés.

Interès científic	
La participació en aquest projecte ha despertat el teu interès o curiositat per la ciència	4,38
Esta experiència t'ha acostat a un problema de interès	4,46
Els teus resultats poden contribuir a l'avanç científic	2,69
Aquest projecte ha tingut repercussió en el teu coneixement de la diversitat microbiana en el medi ambient	4,67
Resistències antibiòtics	
La teua participació en el projecte ha contribuït a conèixer millor el problema de la resistència als antibiòtics	4,15
Aquesta experiència ha modificat la teua percepció sobre l'ús d'antibiòtics	4,23
Altres	
Aquest projecte ha millorat la teua formació científica	4,62
Recomanaries a altres companys o centres la participació en aquest projecte	4,77
Reflexa la teua opinió global sobre la participació en aquest projecte	4,62

A part, 8 alumnes dels que hi van participar 13 van comentar que el pitjor aspecte o més millorable van ser les bates de plàstic d'un sol ús que se'ls va repartir per a realitzar l'activitat amb seguretat. A més, 5 alumnes van comentar que les sessions haurien d'haver-se realitzat en més temps, i 3 d'ells van afirmar que el pitjor va ser que els seus resultats no van ser els idonis.

Taula 3. Resultats de les enquestes de satisfacció dels estudiants del CEIP San Juan de Ribera.

Aprenentatge	
He entès per què prendre antibiòtics quan no he de prendre-los pot ser perillós	4,95
He après coses noves sobre els bacteris y els antibiòtics	4,70
Ara pense que sé més coses de les que sabia abans de participar en el projecte	4,66
Interès	
Les activitats han sigut entretingudes i interessants	4,76
Este proyecto ha ajudat a que m'agrade més la ciència	4,15
Monitors	
Els monitors han fet bé el seu treball	4,83

A banda, la majoria dels alumnes van respondre que ells no canviarien res respecte a l'activitat, i que els va agradar tant l'explicació teòrica com la part pràctica. 7 d'ells van comentar que l'aspecte que menys els va agradar va ser l'olor de les colònies, mentre que altres 4 van comentar que no els havien agradat les bates ni els guants. Alguns també van comentar que les sessions van ser molt curtes.

5. CONCLUSIONS

Principals conclusions extretes per l'equip en el procés d'elaboració del projecte

Conclusions dels alumnes:

En base als resultats obtinguts de les enquestes realitzades pels estudiants mostrats en les taules anteriors es pot concloure que s'ha arribat molt satisfactòriament a les metes dels objectius inicials del projecte, tant didàctics com científics.

Conclusions de l'equip docent:

Com s'ha comentat anteriorment, va haver-hi diversos moments al llarg de les sessions en què els alumnes van respondre preguntes sobre l'activitat per a comprovar si havien entès adequadament els conceptes que se'ls volia transmetre. Va ser reconfortant per als membres de l'equip docent comprovar que la majoria d'ells va respondre bé a aquestes preguntes i que realment havien captat la informació que es pretenia que captaren.

Per tant, gràcies als resultats de les enquestes i al que es va poder apreciar durant les activitats, la conclusió principal de l'equip docent és que els objectius mencionats al principi d'aquest document s'han acomplert, i que els estudiants han gaudit d'activitats entretingudes i d'utilitat.

6. VALORACIÓ DEL PROJECTE

En aquesta primera edició del projecte els alumnes, tant del col·legi com de l'institut, han demostrat que la joventut té ganes d'aprendre i de formar-se científicament. Han demostrat prendre's seriosament l'existència del problema vigent de les resistències microbianes, i també han demostrat voler contribuir a remeiar-ho.

Els alumnes de primer de batxiller de l'IES Vicent Andrés Estellés en concret han treballat molt per a poder transmetre als alumnes de sisé de primària els conceptes que van aprendre durant la primera fase del projecte, demostrant que han comprés perfectament els conceptes que es va tractar de transmetre'ls.

D'altra banda, els alumnes de sisé de primària del CEIP Sant Joan de Ribera han demostrat molt d'interés per les sessions pràctiques realitzades per a ells, i han denotat un clar interès per l'aprenentatge. La seua actitud ha sigut completament satisfactòria, i no han tingut inconvenient a preguntar els dubtes que els anaven sorgint al llarg de les sessions.

El desenvolupament de les sessions ha sigut excel·lent. La programació s'ha acomplert tal com es pretenia que es complira i a pesar de la sensació ocasional de falta de temps, finalment s'han acomplert les expectatives.

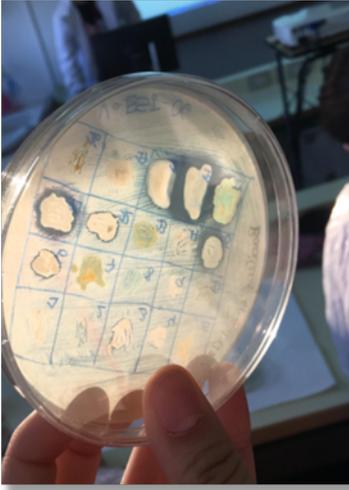
A més, els estudiants han pogut veure resultats tant positius com negatius en els assajos d'antibiosi realitzats durant les dues fases del projecte, i han pogut apreciar de forma qualitativa la biodiversitat existent en les mostres de terra.

Per tot açò, es pot dir també que els estudiants han tingut referències visuals que sustenten els conceptes que es va pretendre transmetre.

7. IMATGES DEL DESENVOLUPAMENT DEL PROJECTE

1ª fase: IES Vicent Andrés Estellés:





2ª fase: CEIP San Juan de Rivera:





8. EXPOSICIÓ DE LES DIFICULTATS PER DESENVOLUPAR EL PROJECTE

Una de les majors dificultats trobades en aquest projecte ha sigut l'organització del temps. La docència comporta generalment moltes hores d'organització, pel fet que tant en els instituts com en els col·legis hi ha una guia docent que seguir per a assegurar que l'ensenyança és eficient i que els estudiants captin els conceptes teòrics i pràctics que se'ls vol transmetre. Per tant, la implantació d'activitats complementàries en els col·legis i en els instituts és molt interessant però comporta una coordinació efectiva.

En aquest projecte en concret, s'han hagut de coordinar les activitats de manera que hi haja temps per a realitzar-les i que no hi haja impediments horaris per part de cap dels participants. Açò comporta una certa càrrega d'estrès i de treball, ja que és necessari invertir temps a organitzar i coordinar les activitats de forma efectiva entre els diferents centres implicats.

No obstant això, el fet d'haver d'adaptar els conceptes a transmetre en dos nivells educatius diferents no ha suposat tanta dificultat com pareixia en un primer moment, i s'ha sabut transmetre adequadament la finalitat del projecte.

9. BIBLIOGRAFIA

Kumar. M., Jaiswalb. S., Sodhia K. K., Shreea. P., Singha. K., Agrawalc. P. K., Shuklab. P. (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International* 124, 448–461.

O'Neill. J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance*.

Organización Mundial de la Salud. Farmacoresistencia. Preguntas más comunes sobre la resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/drugresistance/faq/es/>

Small World Initiative: Research Protocols and A Research Guide to Microbial and Chemical Diversity, 2012.

Anexo 5



PROJECTES NATURA

Facultat de Ciències Biològiques



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Delegació per a la Incorporació a l'Universitat

DESCUBRIENDO NUEVOS ANTIBIÓTICOS PRODUCIDOS POR MICROORGANISMOS DEL SUELO



Diego Arnal Sáez
Departament de Microbiologia i Ecologia

¿Qué son las bacterias?

-Las bacterias son microorganismos, lo que quiere decir que no las podemos ver a simple vista a no ser que se encuentren muchas de ellas formando colonias visibles. Las bacterias están en todas partes. Algunas de ellas provocan enfermedades, pero no todas ellas son malas. (Muchas bacterias pueden producir antibióticos)

¿Qué son los antibióticos?

-Los antibióticos son sustancias que matan a las bacterias, pero no se debe abusar de ellos porque las bacterias se defienden, y muchas de ellas generan resistencias frente a ellos, lo que hace que sean muy difíciles de matar, dificultando el tratamiento de las enfermedades que causan.

¿Qué podemos hacer nosotros?

-Consumir antibióticos bajo prescripción médica. También podemos contribuir a la búsqueda de nuevos antibióticos, ya que los producen las bacterias que están en todas partes, y en grandes cantidades en el suelo.

Las bacterias son un grupo de microorganismos muy diverso. Hay miles de millones de bacterias diferentes y muchas de ellas tienen un enorme potencial a nivel ambiental, industrial y sanitario.

Se estima que en el año 2050 se podrían producir 300 millones de muertes prematuras como consecuencia de las resistencias a antibióticos.

El suelo es un gran reservorio de diversidad microbiana. Cada suelo está formado por un gran número de microorganismos que interactúan para sobrevivir, algunos mediante la producción de antibióticos.

Small World Initiative: "Descubrimiento de antibióticos por crowdsourcing" es un proyecto que nace en 2012 en la Universidad de Yale con el fin de descubrir nuevos antibióticos y de fomentar la cultura científica de estudiantes de universidades, institutos y colegios. Consiste en la realización de sesiones prácticas para formar a los estudiantes en el terreno de la Microbiología y las Ciencias Naturales.

Proyecto coordinado con *Small World Initiative 2.0: A la búsqueda de nuevos productores de antibióticos mediante una estrategia ApS* (SFPIE RMD18_839102). Avalado por la Sociedad Española de Microbiología y el Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos.

PROCEDIMIENTO DE LA ACTIVIDAD



1) Sacar una torunda con cuidado de que no toque nada



2) Mojar la torunda en un tubo de tierra diluida



3) Extender la torunda por la superficie de una placa Petri con medio de cultivo para bacterias con cuidado de no romper la superficie



4) Incubar la placa a 28°C durante 2-5 días y después ver los microorganismos crecidos

* Proyecto realizado en colaboración con Margarita Ortigosa (IES Vicent Andrés Estellés) [Alumnos de 1º de bachiller] y CEIP San Juan de Ribera (Dori Palencia - Juan José Pérez) [alumnos de 6º de primaria]. TFG codirigido por Àngela Figàs, Elena G. Biosca y Sergi Maicas







108