



**Universidad
Europea** VALENCIA

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

Facultad de Ciencias de la Salud

Grado en Biotecnología

Trabajo Fin de Grado
Curso 2024-2025

**Evaluación del potencial prebiótico y el
efecto antimicrobiano de los extractos
de alga *Ulva* y seta *Pleurotus eryngii***

Autor

Roselló Ruiz, Blanca

Tutor UEV

Dr. Bernat Ponce, Edgar

Tutor externo

Dr. Bernabeu Lorenzo, Manuel

Valencia, 2025

Evaluación del potencial prebiótico y el efecto antimicrobiano de los extractos de alga *Ulva* y seta *Pleurotus eryngii*

Trabajo Final de Grado, presentado por:

Roselló Ruiz, Blanca

Tutorizado por:

Dr. Bernat Ponce, Edgar

Tutorizado por:

Dr. Bernabeu Lorenzo, Manuel

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

VALENCIA

CURSO 2024-2025

Agradecimientos

Lo principal es dar las gracias a mis padres por darme la oportunidad de estudiar la carrera que quería y apoyarme en todo momento. A mis amigas por apoyarme en todo el proceso, y sobre todo a las personas que me llevo de estos cuatro años, que sin duda es la mejor parte de todas.

Siempre estaré agradecida de haber tomado este camino, además de por haber descubierto una profesión que me gusta, también por las personas que me he encontrado mientras tanto, desde el primer día que no sabíamos ni lo que era un DOI, hasta hoy, que estamos acabando la carrera y se cierra esta etapa, no podría haber sido mejor.

Índice de contenido

1. Introducción.....	1
1.1 Microbiota	1
1.2 Probióticos	2
1.3 Postbióticos	2
1.3.1 Ácidos grasos de cadena corta	3
1.4 Prebióticos.....	4
1.4.1 Alga <i>Ulva</i> y ulvanos.....	5
1.4.2 Seta <i>Pleurotus eryngii</i> y β -glucanos	6
1.5 Resistencia a antibióticos	6
1.6 Justificación	7
2. Hipótesis.....	8
3. Objetivos.....	8
4. Material y métodos	9
4.1 Materiales	9
4.2 Métodos.....	9
4.2.1 Evaluación del crecimiento de las bacterias con los extractos	9
4.2.2 Evaluación antimicrobiana utilizando sobrenadantes (SN) de los probióticos crecidos con y sin los extractos.....	12
4.2.3 Determinación de ácidos grasos de cadena corta.....	13
4.2.4 Inhibición de la conjugación bacteriana como método de transmisión de resistencia a antibióticos.	13
4.2.5 Análisis de datos	15
5. Resultados	16
5.1 Posible potencial prebiótico con extractos de alga <i>Ulva</i>	16
5.2 Posible efecto antimicrobiano con extractos de alga <i>Ulva</i>	17
5.3 Posible potencial prebiótico con extractos de seta <i>Pleurotus eryngii</i>	18
5.4 Determinación de los ácidos grasos de cadena corta.....	18
5.5 Posible efecto antimicrobiano con extractos de seta <i>Pleurotus eryngii</i>	19
5.6 Evaluación antimicrobiana utilizando sobrenadantes (SN) de los probióticos crecidos con y sin el extracto AF de seta <i>Pleurotus eryngii</i>	20
5.7 Medición de la inhibición de la conjugación bacteriana	22
6. Discusión	23
7. Conclusiones	25
8. Bibliografía.....	26
Anexos	31

Índice de figuras y tablas

Figuras

· Figura 1 Enfermedades asociadas a la disbiosis intestinal y como posible tratamiento están los prebióticos, probióticos y postbióticos.....	2
· Figura 2 Relación de los prebióticos y los probióticos hasta llegar a generar los postbióticos.....	3
· Figura 3 Ejemplos de los prebióticos más destacados y estudiados.....	4
· Figura 4 Actividades biológicas de los oligosacáridos de <i>Ulva</i>	5
· Figura 5 Arquitectura del T4SS conjuntivo.....	7
· Figura 6 Curvas de crecimiento y parámetros de las diferentes cepas probióticas con los extractos AF y AFP de alga <i>Ulva</i>	16
· Figura 7 Curvas de crecimiento y parámetros de las diferentes cepas potencialmente patógenas en presencia de los extractos AF y AFP de alga <i>Ulva</i>	17
· Figura 8 Curvas de crecimiento y parámetros de las diferentes cepas probióticas con los extractos AF y AFP de seta <i>Pleurotus eryngii</i>	18
· Figura 9 Producción de ácido acético por parte de las bacterias probióticas.....	19
· Figura 10 Curvas de crecimiento y parámetros de las diferentes cepas potencialmente patógenas en presencia de los extractos AF y AFP de seta <i>Pleurotus eryngii</i>	19
· Figura 11 Curvas de crecimiento y parámetros de las cepas de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> crecidas con los SN con y sin extracto AF de seta <i>Pleurotus eryngii</i>	21
· Figura 12 Curva de crecimiento y parámetros de <i>S. aureus</i> crecida con los SN con y sin extracto AF de seta <i>Pleurotus eryngii</i>	21
· Figura 13 Conjugación 1, con tres condiciones y conjugación 2, con cuatro condiciones diferentes.....	22

Tablas

· Tabla 1 Materiales utilizados en el estudio.....	9
· Tabla 2 Medios para evaluación de las bacterias probióticas con extractos de algas....	10
· Tabla 3 Medios para evaluación de las bacterias probióticas con extractos de setas....	10
· Tabla 4 Medios para evaluación del efecto antimicrobiano con extractos de algas.....	11
· Tabla 5 Medios para evaluación del efecto antimicrobiano con extractos de setas.....	11
· Tabla 6 Medios para evaluación del efecto del efecto antimicrobiano con SN de probióticos crecidos sin extracto y con extracto de seta AF10%.....	12
· Tabla 7 Diferentes combinaciones de conjugaciones realizadas.....	15

Anexo

· Tabla 1 Medios utilizados con sus correspondientes concentraciones.....	31
· Tabla 2 AGCC necesarios para la preparación de la recta patrón.....	31
· Tabla 3 Diluciones para la preparación de la recta patrón.....	32
· Tabla 4 Preparación de los antibióticos del stock.....	32
· Tabla 5 Preparación de medios para sembrar las diluciones de las conjugaciones.....	32

Listado de símbolos y siglas

- AGCC: Ácidos grasos de cadena corta
- ANOVA: Análisis de la varianza
- BHI: Brain Heart Infusion (Infusión de cerebro y corazón)
- Cm: Cloranfenicol
- Cys: Cisteína
- GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas
- IS: Estándar interno
- MRS: Man, Rogosa y Sharpe
- MRSm: MRS mínimo
- ODS: Objetivos de desarrollo sostenible
- PBS: Solución salina tamponada con fosfato
- SN: Sobrenadante
- Tc: Tetraciclina

Resumen

En el organismo, una de las representaciones más importantes de la comunidad microbiana se encuentra en el intestino, denominada microbiota intestinal. La microbiota intestinal es un ecosistema estable y diverso que desarrolla funciones digestivas y metabólicas complejas, que junto con el epitelio intestinal forman una barrera protectora contra amenazas infecciosas. La mayoría de las bacterias que componen la microbiota intestinal son especies protectoras, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sin embargo, hay otro grupo de bacterias en la microbiota que pueden causar amenazas para la salud humana una vez empiezan a multiplicarse sin control, estas son las bacterias patógenas o potencialmente patógenas que pueden llegar a provocar disbiosis. Por todo ello, lo que se quiso comprobar en este estudio era si los extractos alga *Ulva* y seta *Pleurotus eryngii* eran candidatos a ser prebióticos, comprobando si mejoraban el crecimiento de cepas probióticas y la producción de ácidos grasos de cadena corta. Además, se examinó si estos extractos eran capaces de tener efecto antimicrobiano en cepas patógenas, por sí mismos o a través de los sobrenadantes de las bacterias probióticas crecidas con los extractos. Finalmente se evaluó si estos extractos pudieran actuar como inhibidores de la conjugación bacteriana, poniéndole límite a la transmisión de genes de resistencia a antibióticos. Para ello, se realizaron crecimientos bacterianos con los extractos, tanto de cepas probióticas, como de cepas potencialmente patógenas, se determinaron los ácidos grasos de cadena corta que producían las cepas probióticas con la fermentación de los extractos y se realizaron conjugaciones para comprobar si los extractos eran capaces de inhibirla. Se obtuvo como resultado principal y más prometedor, que el extracto AF de seta *Pleurotus eryngii* puede llegar a tener potencial prebiótico y efecto antimicrobiano, ya que, ha mejorado el crecimiento de todas las cepas probióticas y ha aumentado la producción de ácido acético, así como ha disminuido el crecimiento de dos de las tres cepas potencialmente patógenas, tanto con el extracto solo como con los SN de probióticos crecidos con el extracto. Sin embargo, en la conjugación no se obtuvieron resultados significativos, pero se vieron indicios de la mejor combinación para la inhibición de la conjugación. Por lo tanto, existen evidencias de que alguno de los extractos puede llegar a tener beneficios para la salud.

Palabras clave

Alga, conjugación, efecto antimicrobiano, extracto, microbiota, potencial prebiótico, seta.

Abstract

One of the most important representations of the microbial community in the organism is found in the intestine, called the intestinal microbiota. The intestinal microbiota is a stable and diverse ecosystem that develops complex digestive and metabolic functions, which together with the intestinal epithelium form a protective barrier against infectious threats. Most of the bacteria that compose the intestinal microbiota are protective species, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. However, there is another group of bacteria in the microbiota that can cause threats to human health once they start to multiply uncontrollably, these are the pathogenic or potentially pathogenic bacteria that can lead to dysbiosis. Therefore, what we wanted to test in this study was whether the *Ulva* algae and *Pleurotus eryngii* mushroom extracts were candidates for prebiotics, checking if they enhanced the growth of probiotic strains and the production of short-chain fatty acids. In addition, we examined whether these extracts were capable of having an antimicrobial effect on pathogenic strains, by themselves or through the supernatants of probiotic bacteria grown with the extracts. Finally, it was evaluated if these extracts could act as inhibitors of bacterial conjugation, limiting the transmission of antibiotic resistance genes. For this purpose, bacterial growth was carried out with the extracts of both probiotic strains and potentially pathogenic strains, the short-chain fatty acids produced by the probiotic strains with the fermentation of the extracts were determined and conjugations were performed to check whether the extracts were capable of inhibiting it. The main and most promising result was that the AF extract of *Pleurotus eryngii* mushroom may have prebiotic potential and antimicrobial effect, since it improved the growth of all probiotic strains and increased the production of acetic acid, as well as decreased the growth of two of the three potentially pathogenic strains, both with the extract alone and with the SN of probiotics grown with the extract. However, in conjugation, no significant results were obtained, but indications of the best combination for conjugation inhibition were seen. Therefore, there is evidence that some of the extracts may have health benefits.

Keywords

Algae, antimicrobial effect, conjugation, extract, microbiota, mushroom, prebiotic potential

1. Introducción

1.1 Microbiota

El cuerpo humano contiene millones de microorganismos que construyen una comunidad microbiana compleja que desempeña funciones metabólicas e inmunes esenciales para la supervivencia (Iacob et al., 2019). Se cree que la colonización comienza desde el nacimiento, sabiendo que existen diferencias por numerosos factores como el tipo de parto, la edad gestacional, la alimentación inicial o la exposición a antibióticos, entre otros (Álvarez et al., 2021). Por ejemplo, en el caso de los bebés nacidos por parto vaginal, tienen una microbiota inicial semejante a la microbiota vaginal de la madre, mientras que los que son nacidos por cesárea, muestran semejanzas con la microbiota cutánea materna y perfiles propios del medio ambiente (Tidjani Alou et al., 2016). Cualquier alteración e interrupción de la colonización de la microbiota neonatal conlleva riesgo y predisposición a desarrollar enfermedades a corto o largo plazo (Samarra et al., 2024).

Una de las representaciones más importantes de esta comunidad microbiana se encuentra en el intestino, denominada microbiota intestinal. La microbiota intestinal es un ecosistema estable y diverso que desarrolla funciones digestivas y metabólicas complejas, que junto con el epitelio intestinal forman una barrera protectora contra amenazas infecciosas (Iacob et al., 2019). Además, la homeostasis de la microbiota intestinal es crucial para la regulación de la inflamación intestinal y para la maduración y regulación del sistema inmunitario (Ji et al., 2023; Samarra et al., 2024).

La mayoría de las bacterias que componen la microbiota intestinal son especies protectoras, entre las cuales, las más beneficiosas son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Iacob et al., 2019). Sin embargo hay otro grupo que son las bacterias patógenas o potencialmente patógenas que pueden causar amenazas para la salud humana una vez empiezan a multiplicarse sin control, provocando alteraciones en la homeostasis de la microbiota intestinal conocida como disbiosis (Ji et al., 2023; Tidjani Alou et al., 2016).

La disbiosis es un desequilibrio cualitativo y cuantitativo de la microbiota intestinal, alterando la composición y las funciones de esta (Figura 1). Principalmente, se caracteriza por la pérdida de especies beneficiosas que habitualmente son las dominantes y un aumento de patógenos oportunistas (Álvarez et al., 2021; Victoria Obayomi et al., 2024). La disbiosis puede contribuir al desarrollo de diversas enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal, obesidad, diabetes e incluso enfermedades sistémicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, trastornos neurodegenerativos, enfermedades renales y respiratorias. En definitiva, el equilibrio de nuestra microbiota intestinal es fundamental para mantener la salud y prevenir enfermedades (Álvarez et al., 2021; Ji et al., 2023; Tidjani Alou et al., 2016).

Al demostrar el papel fundamental de la microbiota intestinal en la salud humana, también se le da relevancia a los probióticos, prebióticos y postbióticos debido a su capacidad para promover la salud humana y tratar enfermedades a través de la modulación de la microbiota intestinal (Ji et al., 2023). Algunos de los componentes clave relacionados con la microbiota intestinal son los probióticos, que son microorganismos vivos reconocidos como beneficiosos para la salud si se ingieren en cantidades adecuadas (Sanders et al., 2018). Estos probióticos suelen asociarse a prebióticos, que son sustancias no digeribles cuya metabolización estimula especies específicas, promoviendo el crecimiento y la actividad de los probióticos (Tidjani Alou et al., 2016). También tienen importancia los postbióticos, que son sustancias activas producidas por los probióticos como resultado de la fermentación y de igual modo contribuye a la salud. En

definitiva, cada uno de estos tres componentes desempeña un papel distinto en la relación simbiótica pero todos son significativos en la homeostasis de la microbiota (Ji et al., 2023).

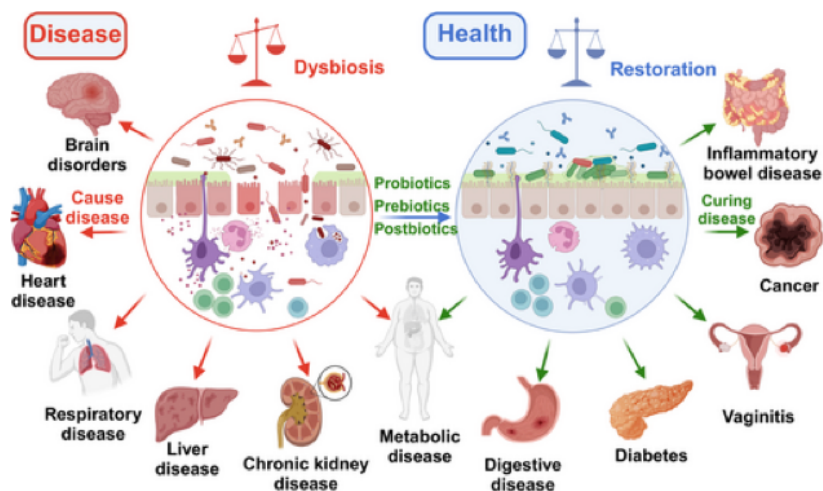


Figura 1. Enfermedades asociadas a la disbiosis intestinal y como posible tratamiento para restaurar la homeostasis de la microbiota intestinal están los prebióticos, probióticos y postbióticos (Ji et al., 2023).

1.2 Probióticos

Existen muchos tipos de probióticos provenientes de diferentes familias de bacterias y levaduras. Algunos de los géneros más reconocidos como probióticos son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Cada uno de estos géneros contiene varias especies, que a su vez en cada especie hay muchas cepas. En general, se considera que los efectos beneficiosos de los probióticos son específicos de cada cepa (Morales-Ferré et al., 2021; Victoria Obayomi et al., 2024).

Como se ha mencionado antes los probióticos son organismos vivos que cuando son administrados en proporciones adecuadas son beneficiosos para la salud del huésped (Gibson et al., 2017). Por ello, se le atribuyen funciones como ajustar la composición de la microbiota intestinal, competir con patógenos por nutrientes y sitios de unión en la pared intestinal, mejorar la función de la barrera intestinal y modular el sistema inmunitario (Álvarez et al., 2021). Al fortalecer el revestimiento intestinal, la absorción de toxinas y patógenos en sangre está más limitado, lo que conlleva al bienestar general y un sistema digestivo más saludable (Álvarez et al., 2021). Con todos los beneficios que le proporcionan al entorno, los probióticos también pueden ayudar en la absorción de nutrientes, lo que puede ser muy útil en personas con mala absorción (Victoria Obayomi et al., 2024). Además, los probióticos son capaces de producir sustancias antimicrobianas y otros metabolitos con efectos sistémicos que pueden influir en la salud del huésped (Ji et al., 2023; Sanders et al., 2018).

1.3 Postbióticos

Los postbióticos son una combinación de células microbianas inactivas, componentes celulares y metabolitos que se producen durante la fermentación o se liberan después de la descomposición bacteriana (Mishra et al., 2024; Moradi et al., 2021). La composición de los postbióticos que son producidos por el metabolismo probiótico varía según la cepa probiótica, las condiciones de crecimiento y los sustratos para la fermentación (Ji et al., 2023). Algunos de

los postbióticos son los ácidos grasos de cadena corta, los exopolisacáridos, las vitaminas, los ácidos orgánicos, las bacteriocinas y las enzimas (Isaac-Bamgboye et al., 2024; Victoria Obayomi et al., 2024) (Figura 2).

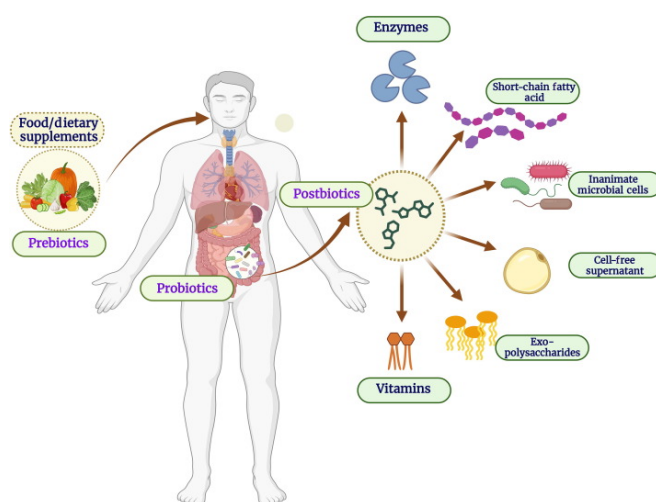


Figura 2. Relación de los prebióticos y los probióticos hasta llegar a generar los postbióticos como producto de la fermentación (Mishra et al., 2024).

Los postbióticos efectúan beneficios a través de diferentes mecanismos, algunos similares a los probióticos. Pueden modular la composición de la microbiota intestinal inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y mejorando la función de las bacterias beneficiosas, tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, además de mejorar la función de la barrera intestinal (Ji et al., 2023; Mishra et al., 2024). Por tanto, los postbióticos podrían ayudar a prevenir y tratar enfermedades infecciosas como la gastroenteritis, infecciones del tracto respiratorio provocadas por *Escherichia coli*, *Salmonella* o *Listeria*, también serían útiles para enfermedades inflamatorias como el síndrome del intestino irritable, colitis o asma (Isaac-Bamgboye et al., 2024; Morales-Ferré et al., 2021). Además, como ya se ha mencionado anteriormente, muchas enfermedades como la obesidad o la diabetes están vinculadas con la disbiosis de la microbiota intestinal, y como los postbióticos ofrecen un potencial significativo para el tratamientos de la disbiosis, podría sugerirse como posible tratamiento para enfermedades no directamente relacionadas con el intestino (Victoria Obayomi et al., 2024).

Por todo ello, los postbióticos pueden llegar a ser una alternativa para los probióticos en personas con enfermedades críticas o individuos inmunodeprimidos (Ji et al., 2023; Victoria Obayomi et al., 2024), porque aunque los probióticos son beneficiosos mayoritariamente, no dejan de ser bacterias y en casos muy poco frecuentes se han llegado a ver reacciones adversas como la expresión de factores de virulencia o la transferencia de genes de resistencia a antibióticos a bacterias patógenas del mismo intestino. Por estos motivos, se dice que los postbióticos pueden tener los efectos beneficiosos de los probióticos sin sus posibles desventajas (Morales-Ferré et al., 2021).

1.3.1 Ácidos grasos de cadena corta

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son un tipo de postbiótico, en concreto, un grupo de ácidos grasos con seis o menos carbonos como el ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico (Victoria Obayomi et al., 2024; Wei et al., 2024). Los AGCC son productos finales de la actividad de la microbiota intestinal, la cual se basa en fermentar las fibras dietéticas para producir estos AGCC, además están asociados con la

composición y función saludable de la microbiota intestinal (Morales-Ferré et al., 2021; Victoria Obayomi et al., 2024).

Los AGCC cumplen un papel importante en la regulación y mejora de la barrera intestinal, el metabolismo energético, la dieta y el control del peso (Den Besten et al., 2013). En concreto, los AGCC son absorbidos por las células y se utilizan como fuente de energía. En cuanto a la protección intestinal, los AGCC mejoran la función de la barrera intestinal porque provocan una reducción de la permeabilidad intestinal y promueven la expresión de proteínas de unión estrecha (Mishra et al., 2024; Wei et al., 2024).

1.4 Prebióticos

Los prebióticos son componentes dietéticos no digeribles que promueven el crecimiento y la actividad de los probióticos y deben provocar un beneficio neto para la salud (Bevilacqua et al., 2024; Gibson et al., 2017). En su mayoría son carbohidratos con diversas estructuras moleculares que se encuentran de forma natural en la dieta. Algunos de los prebióticos más comunes son la inulina, los fructooligosacáridos, los galactooligosacáridos, la lactulosa y los beta-glucanos, entre otros (Ji et al., 2023; Tidjani Alou et al., 2016) (Figura 3).

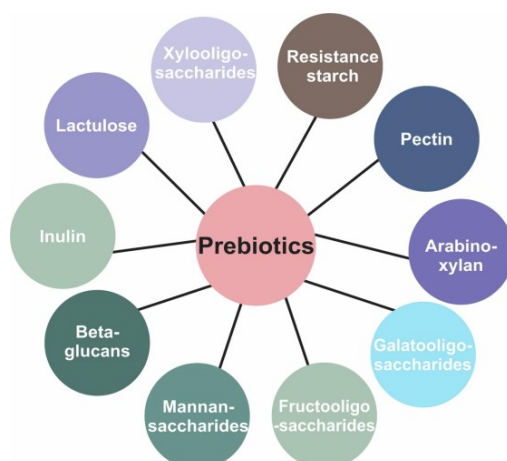


Figura 3. Ejemplos de los prebióticos más destacados y estudiados (Victoria Obayomi et al., 2024)

Algunas de las funciones beneficiosas de los prebióticos se basan en mantener una microbiota intestinal equilibrada, puede ser mediante la reducción de bacterias patógenas en abundancia o la estimulación selectiva del crecimiento de algunos probióticos, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Manzoor et al., 2022; Morales-Ferré et al., 2021).

Los prebióticos no deben metabolizarse ampliamente, sino que deben ir orientados hacia el metabolismo de los probióticos (Gibson et al., 2017), es decir, cuando son ingeridos, deben poder resistir los ácidos estomacales, las enzimas digestivas y la digestión general del tracto superior y al llegar al colon, actuar como sustratos y así poder ser fermentados por los probióticos de la microbiota intestinal, produciendo metabolitos beneficiosos para la salud (Ji et al., 2023; Victoria Obayomi et al., 2024). Los productos de fermentación de los prebióticos por parte de los probióticos suelen ser los AGCC y la reducción del pH (Tidjani Alou et al., 2016; Victoria Obayomi et al., 2024).

Los extractos que se quieren evaluar en este estudio para comprobar su posible potencial prebiótico provienen de algas y setas. Ambas tienen un alto contenido de polisacáridos que se describen como beneficiosos para la salud, como Ulvanos y β -glucanos, respectivamente. Por

ello, se quieren evaluar las posibles propiedades prebióticas de estos polisacáridos y comprobar si tienen el potencial de modular la composición de la microbiota intestinal (Cerletti et al., 2021; Gotteland et al., 2020).

1.4.1 Alga *Ulva* y ulvanos

a) Alga *Ulva*

Las algas marinas son un grupo diverso de organismos fotosintéticos que se encuentran en los océanos (Krangkratok et al., 2023). Normalmente, se clasifican según su pigmentación, siendo el primer grupo las algas pardas, con presencia de alginato, fucano y celulosa como polisacáridos primarios. En el segundo grupo están las algas rojas que tienen como polisacáridos primarios los agares y carragenanos. Por último, el grupo de nuestro interés, las algas verdes, que tienen como polisacáridos principal el ulvano (Jagtap et al., 2022; Seong et al., 2019). Las algas del género *Ulva* se clasifican dentro de las algas verdes y están extendidas por muchos países como Japón, China, Malasia, Tailandia y la parte occidental de América, entre otros (Krangkratok et al., 2023).

b) Ulvanos

Los polisacáridos extraídos de las algas tienen un alto peso molecular y para utilizarlos es necesario reducir su tamaño molecular a oligosacáridos (Kansandee et al., 2024; Krangkratok et al., 2023). En concreto, los ulvanos tienen limitaciones por su peso molecular, por su baja solubilidad y baja biodisponibilidad, por ello, es necesario degradarlos y saber que los oligosacáridos resultantes conservan bien la actividad biológica de los polisacáridos originales y mejora los defectos de insolubilidad y baja biodisponibilidad (Li et al., 2023).

Tanto los ulvanos como polisacárido, como los ulvanos degradados en oligosacáridos, tienen propiedades funcionales anticoagulantes, antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, prebiótica o antihiperlipidémicas, entre muchas otras (Gotteland et al., 2020; Kansandee et al., 2024; Li et al., 2023) (Figura 4).

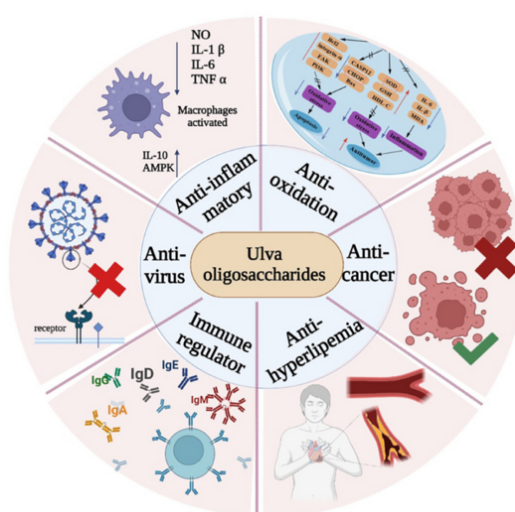


Figura 4. Actividades biológicas de los oligosacáridos de *Ulva* (Li et al., 2023)

En cuanto a sus propiedades prebióticas y su impacto en la microbiota, los ulvanos son resistentes a la digestión por enzimas del tracto digestivo superior, por ello, tienen potencial para

ser prebióticos. Por lo general, se ha visto que mejoran la disbiosis intestinal promoviendo el crecimiento de bacterias beneficiosas y productoras de AGCC, aunque esta aplicación no ha sido tan estudiada y necesita más investigación (Krangkratok et al., 2023; Li et al., 2023).

1.4.2 Seta *Pleurotus eryngii* y β -glucanos

a) Seta *Pleurotus eryngii*

Los hongos son muy conocidos por su valor nutricional y medicinal, además de por la diversidad de sus componentes bioactivos. Empezaron a reconocer los beneficios para la salud de los extractos de ciertos hongos en muchas culturas, especialmente en Oriente (Carbonero et al., 2006). *Pleurotus spp.* se encuentra en bosques frondosos de todo el mundo, en concreto *Pleurotus eryngii* es una especie comestible y medicinal distribuida por la zona del Mediterráneo, Europa central, Asia central y el norte de África (Stajic' et al., 2009).

Pleurotus spp. proporciona una gran fuente de carbohidratos sin almidón, con alto contenido de fibra dietética, cantidades de proteínas con aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas. Siendo más precisos, *Pleurotus eryngii* sintetiza polisacáridos que son los principales compuestos biológicamente activos, los cuales se clasifican farmacológicamente como modificadores de la respuesta inmune al mejorar el sistema inmune del huésped (Carbonero et al., 2006; Stajic' et al., 2009).

b) β -glucanos

Los β -glucanos son polisacáridos compuestos por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces β -glucosídicos. Los β -glucanos son componentes importantes de la pared celular de los hongos. Su función principal es modular el sistema inmunitario pero nuevos estudios indican que también podría tener potencial como prebióticos (Victoria Obayomi et al., 2024).

Los β -glucanos al tener este potencial prebiótico, no se digieren en el tracto gastrointestinal, llegando al intestino prácticamente intactos, están asociados a la producción de AGCC, al ser fermentados por la microbiota intestinal (Cerletti et al., 2021). Al llegar prácticamente intactos, los β -glucanos forman un gel en la superficie de la mucosa del intestino que inhibe la reabsorción de las sales biliares, como consecuencia, el aumento de estas sales activa la utilización del colesterol circulante, reduciendo su nivel en sangre, por tanto los β -glucanos relacionan la modificación de la microbiota intestinal con la modulación de la absorción de las sales biliares (Morales et al., 2021).

Otras funciones de los β -glucanos son la aceleración del tránsito del contenido intestinal, aumentando la frecuencia y el volumen fecal, que provoca beneficios en cuanto a la protección contra el síndrome del intestino irritable o enfermedades diverticulares como estreñimiento, diarrea y dolor abdominal (Cerletti et al., 2021).

1.5 Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos es una de las grandes amenazas para la salud humana a día de hoy (Cabezón et al., 2017; Flannery et al., 2022). En las últimas décadas, han aumentado drásticamente las bacterias gramnegativas resistentes a múltiples fármacos, siendo algunas de estas *E. coli* y *K. pneumoniae*, entre otras (Flannery et al., 2022; Murray et al., 2022).

Uno de los principales mecanismos por el cual las bacterias se vuelven resistentes es la conjugación bacteriana, ya que, es el mecanismo por el que se transfiere el ADN entre dos bacterias (Cabezón et al., 2017; Samarra et al., 2023). En concreto, la microbiota puede ser una de las fuentes de genes de resistencia que los patógenos oportunistas pueden adquirir (Samarra et al., 2023) (Figura 5).

La conjugación consta de dos pasos, siendo el primero, la movilización del ADN por un conjunto de proteínas codificadas por genes MOB, que son cruciales para la movilización o transferencia de material genético, principalmente entre bacterias. En segundo lugar, el ADN se transporta a través del sistema de secreción tipo IV (T4SS) (Cabezón et al., 2017). El T4SS consiste en cuatro secciones: el pilus, el complejo del canal central, la plataforma de la membrana interna y las ATPasas hexaméricas que proporcionan la energía necesaria para el transporte de sustrato y la biogénesis del pilus (Cabezón et al., 2014, 2017).

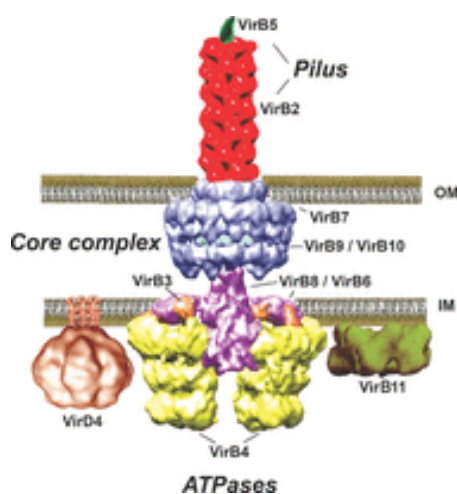


Figura 5. Arquitectura del T4SS conjuntivo. Se pueden distinguir cuatro dominios: el pilus está formado por un ensamblaje helicoidal de moléculas de pilina (VirB2) con moléculas de adhesina (VirB5). El complejo central se puede dividir en dos, la capa de membrana externo, formada por VirB7, VirB9 y el extremo C-terminal de VirB10, mientras que la otra parte es el dominio periplásmico, formado por VirB8, VirB10 y el extremo N-terminal de VirB6. Por último unidas a la membrana interna hay tres ATPasas hexaméricas, VirB4, VirB11 y la proteína de acoplamiento VirD4 (Cabezón et al., 2014).

A pesar de que cada vez hay más bacterias multirresistentes, no hay variedad de antibióticos nuevos para combatirlos, por ello, una de las estrategias para hacer frente a esta emergencia es la búsqueda de inhibidores específicos de la conjugación. Existen ya diversos estudios que están buscando alternativas a antibióticos como es la inhibición de ATPasa VirB11 por ácidos grasos insaturados (Cabezón et al., 2017), o inhibir la conjugación de plásmidos resistentes a antibióticos en presencia de AGCC (Ott & Mellata, 2024).

1.6 Justificación

Tras comprobar que la microbiota intestinal es importante para la salud, se necesitan más estudios para conseguir alternativas para el cuidado de esta, ya que en base a la regulación de la microbiota intestinal pueden tratarse otras enfermedades, y todo ello conlleva beneficios para la salud. Por todo ello, lo que se pretende en este estudio es comprobar si los extractos de setas y algas tienen potencial para ser prebióticos y tener efecto antimicrobiano, además de tener la capacidad de inhibir la conjugación bacteriana, y así evitar la transmisión de genes de resistencia a antibióticos. Si todo ello tuviera buenos resultados cabría la posibilidad de tener

nuevos extractos como alternativa para regular la microbiota intestinal y así demostrar su beneficio para la salud.

Todo lo planteado podría relacionarse con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) que son 17 objetivos globales adoptados por los estados miembros de las Naciones Unidas en 2015, que pretenden erradicar la pobreza, proteger el planeta y garantizar paz y prosperidad para todas las personas en 2030. En concreto, se podría relacionar con el ODS 3, “Salud y Bienestar”, que tiene como objetivo garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos y todas las edades (Pacto Mundial Red Española, s. f.).

2. Hipótesis

Los extractos de setas y algas podrían llegar a relacionarse con el potencial prebiótico, comprobando si mejoran el crecimiento de cepas probióticas y producen AGCC tras ser fermentados. Además, serían capaces de producir efecto antimicrobiano en cepas potencialmente patógenas, tanto los extractos directos en las bacterias, como los SN de las bacterias probióticas crecidas con el extracto, reduciendo su crecimiento, y así demostrar su beneficio para la salud en relación con la microbiota intestinal.

A su vez, alguno de estos extractos podría tener potencial para ser un inhibidor específico de la conjugación bacteriana, por sí mismo o gracias a los AGCC producidos al ser fermentados por bacterias probióticas, así evitar la transmisión de genes de resistencia a antibióticos y luchar contra las bacterias multirresistentes, lo que favorecería la salud también.

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es estudiar las funciones beneficiosas que pueden aportar a la salud los extractos de setas y algas. Para lograr este objetivo, se han establecido otros objetivos específicos:

1. Evaluar el potencial de estos extractos de actuar como prebióticos, mejorando el crecimiento de los probióticos y produciendo mayor número de AGCC.
2. Estudiar la capacidad antimicrobiana de los extractos ante cepas potencialmente patógenas.
3. Comprobar si alguno de estos extractos podría llegar a ser un inhibidor de la conjugación bacteriana y así evitar la transferencia de genes de resistencia.

4. Material y métodos

4.1 Materiales

Estos son los materiales más relevantes que han sido utilizados a lo largo de este estudio y están incluidos en los métodos (Tabla 1).

Tabla 1. Materiales utilizados en el estudio.

Material	Marca	Material	Marca
LB Broth	NZYtech	Filtros (0,45µm y 0,22µm)	Sarstedt
Lactobacilli MRS Broth	BD Difco	Jeringuillas (1, 5 y 10mL)	Ecoject y Fisher Scientific
MRS Broth w/o Dextrose	Condalab	Congelador -20°C	Liebherr
Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth)	Condalab	Congelador -80°C	Thermo Scientific
MacConkey Agar	Condalab	Jarra anaerobiosis	BD
European Bacteriological Agar	Condalab	Sobres anaerobiosis	Thermo Scientific
Phosphate buffered saline (PBS)	EPICA, S.L.	Cerillo	Cerillo Illuminate possibility
L- Cysteine Hydrochloride monohydrate	Thermo Scientific	Stacker	Equitec
D-glucosa	Sigma-aldrich	Espectrofotómetro (SPECTROstar Nano)	BMG LABTECH
Autoclave	Selecta	Internal standard (3-metilvalerico)	EPICA, S.L.
Estufa incubadora	Selecta	AGCC	Fluka
Pipetas	Labnet Biopette	Vortex	Labnet
Puntas de pipeta	DeckWorks	Viales cromatografía	Agilent
Cabina de seguridad biológica	Telstar (Bio II Advance)	GC-MS	Agilent
Balanza analítica	OHAUS	Antibiótico tetraciclina	Guinama
Placa Petri y placa 69 pocillos	Thermo Scientific	Antibiótico Cloranfenicol	Roche
Eppendorf (1,5 y 2mL), tubos (10mL) y falcon (50mL)	Fisher Scientific	X-gal	Thermo Scientific
Microcentrífuga refrigeradora	Axyspin R	Agitador magnético con calentamiento	LBX instruments

4.2 Métodos

4.2.1 Evaluación del crecimiento de las bacterias con los extractos

a) Evaluación del crecimiento de bacterias probióticas con los extractos

Los extractos utilizados en este estudio fueron de alga *Ulva* y seta *Pleurotus eryngii*. La extracción la realizó el grupo de investigación llamado Biofun, que también se encuentra en

el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA), como parte de una colaboración. Los extractos de setas y algas se dividieron en el extracto completo denominado AF y el extracto purificado en ulvanos o β -glucanos, que se denomina AFP. Se prepararon los medios con estos extractos como indica el Anexo 1. Una vez, estuvieron bien disueltos los medios, estos se filtraron secuencialmente por filtros de 0,45 μ m primero y por 0,22 μ m después para asegurarse de que no se quedara ninguna contaminación.

Con el fin de evaluar el crecimiento de bacterias, se prepararon los medios tanto líquidos como con agar para el crecimiento de las bacterias siguiendo el protocolo que se encuentra en el Anexo 2. Para poner a punto los cultivos y poder evaluar el crecimiento bacteriano se sembraron en placa Petri diferentes cepas de *Lactobacillus*: *L. plantarum* CECT 748, *L. casei* CECT 5275, *L. acidophilus* CECT 903 y *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 en MRS agar, además de una cepa de *Bifidobacterium*, *B. animalis* BB12 ATCC 27536, en MRS agar + 0,05% cisteína (cys), ya que las *Bifidobacterias* necesitan cys para crecer. Todas ellas se incubaron durante toda la noche en la estufa a 37°C y en el caso de *B.animalis* se hizo en condiciones de anaerobiosis (Snoeyenbos-West et al., 2024). Al día siguiente, se pasó una de las colonias crecidas a medio líquido, en el caso de los *Lactobacillus*, el medio fue MRS líquido y en el caso de *B.animalis*, el medio necesitó cys también. Todo ello, se incubó de nuevo en la estufa a 37°C otra noche más, poniendo a *B. animalis* en anaerobiosis de nuevo.

Tras la preparación de los medios y los cultivos bacterianos, fue necesario realizar lavados de los cultivos para eliminar el medio y evitar posibles alteraciones que pudieran causar sus componentes, como nutrientes o sales, en los experimentos posteriores (Bernabeu et al., 2024). Se centrifugaron los cultivos a 12.000 rpm, 2 minutos y se resuspendió el pellet en PBS para que quedara lo más limpio posible de medio. Se midió en el espectrofotómetro la OD a 600 nm en el programa Radiostar. Tras obtener los valores de la OD, se ajustó la OD a 1 en 1 mL.

Con el objetivo de evaluar el crecimiento bacteriano, se prepararon placas de 96 pocillos con los medios preparados y sus respectivos controles (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Medios necesarios para la placa en la que se evaluaron las bacterias probióticas con extractos de algas.

Placa con extracto de algas (Ulva)	
Controles negativos (sin inocular con bacteria)	MRS mínimo (MRSm) + 0,05% cys
	MRS + 0,05% cys
	MRSm + 0,05% cys + Ulva AF 10%
	MRSm + 0,05% cys + Ulva AFP 10%
Controles positivos (inoculados con bacteria)	MRSm + 0,05% cys + 1% glucosa
	MRS + 0,05% cys
Medios a evaluar (inoculados con bacteria) para comprobar si con el extracto son capaces de crecer más que con un medio mínimo	MRSm + 0,05% cys
	MRSm + 0,05% cys + Ulva AF 10%
	MRSm + 0,05% cys + Ulva AFP 10%

Tabla 3. Medios necesarios para la placa en la que se evaluaron las bacterias probióticas con extractos de setas.

Placa con extracto de seta	
Controles negativos (sin inocular con bacteria)	MRSm + 0,05% cys
	MRS + 0,05% cys
	MRSm + 0,05% cys + seta AF 10%
	MRSm + 0,05% cys + seta AFP 2%
Controles positivos (inoculados con bacteria)	MRSm + 0,05% cys + 1% glucosa
	MRS + 0,05% cys
	MRSm + 0,05% cys
	MRSm + 0,05% cys + seta AF 10%

Medios a evaluar (inoculados con bacteria) para comprobar si con el extracto son capaces de crecer más que con un medio mínimo	MRSm + 0,05% cys + seta AFP 2%
--	--------------------------------

En cada pocillo se añadieron 200 µL del medio y 10 µL de la bacteria correspondientes quedando a una OD_{600nm} de 0,05. Además, los pocillos que queden vacíos se llenaron con H₂O destilada para evitar la evaporación del medio al realizar las mediciones.

Para la incubación y medición se utilizaron diferentes métodos, aunque todos ellos se realizaron a 37°C. En el caso de la placa que contenía *B. animalis* se incubó en anaerobiosis y para ello se utilizó el cerillo, con agitación de 50 rpm, para la correcta homogeneización del medio, durante 48 horas. En el caso de la medición de los *Lactobacillus*, la placa con extractos de algas se midió en el espectrofotómetro con el programa Radiostar a 37°C, con agitación de 30 segundos, previa a cada ciclo de medición, que era cada 30 minutos, durante 48 horas. La placa con extractos de seta se midió en el stacker. Debido a que se midieron muchas otras placas a la vez, en este aparato se iba midiendo la OD en ciclos de 30 minutos, con una temperatura de 37°C, 70% de humedad, durante 48 horas (Bernabeu et al., 2024; Snoeyenbos-West et al., 2024).

b) Evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos.

Para esta evaluación se siguió el mismo procedimiento que en el apartado “a”, pero esta vez con *E. coli* MG1655 ATCC 700926, *S. aureus* CECT 86 y un aislado de *K. pneumoniae* procedente de la colección del grupo de investigación, que no tiene asignado un número de las colecciones internacionales.

Se prepararon los medios con los extractos como indica el Anexo 1. Una vez disueltos, se filtraron secuencialmente por 0,45 µm y después por 0,22 µm para asegurarse de que quedaba estéril. En este caso la siembra en placa se realizó en medio LB agar para *E.coli* y *K. pneumoniae* y en BHI agar para *S. aureus*. Se dejaron todas ellas incubando en la estufa a 37°C una noche. Al día siguiente, se realizó el pase a medio líquido y se incubó toda la noche a 37°C en agitación, 200 rpm. En este punto, se realizaron los lavados con PBS de los cultivos de las bacterias incubadas y se ajustó el cultivo para que quedase con OD 1 en 1 mL.

Con el objetivo de evaluar el efecto antimicrobiano, se prepararon placas de 96 pocillos con los medios preparados y sus respectivos controles (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. Medios necesarios para la placa en la que se va a evaluar el efecto antimicrobiano con extractos de algas.

Placa con extracto de algas (Ulva)	
Controles negativos (sin inocular con bacteria)	LB
	BHI
	LB/BHI + Ulva AF 10%
	LB/BHI + Ulva AFP 10%
Controles positivos (inoculados con bacteria)	LB
	BHI
Medios a evaluar (inoculados con bacteria)	LB/BHI + Ulva AF 10%
	LB/BHI + Ulva AFP 10%

Tabla 5. Medios necesarios para la placa en la que se va a evaluar el efecto antimicrobiano con extractos de setas.

Placa con extracto de seta	
Controles negativos (sin inocular con bacteria)	LB
	BHI

	LB/BHI + seta AF 10%
	LB/BHI + seta AFP 2%
Controles positivos (inoculados con bacteria)	LB
	BHI
Medios a evaluar (inoculados con bacteria)	LB/BHI + seta AF 10%
	LB/BHI + seta AFP 2%

En cada pocillo se añadieron 200 μ L del medio y 10 μ L de la bacteria correspondientes quedando a una OD de 0,05. En el caso de la medición de la placa con extractos de algas se midió en el espectrofotómetro con el programa Radiostar a 37°C, con agitación de 30 segundos, previa a cada ciclo de medición, que era cada 30 minutos, durante 48 horas. La placa con extractos de seta se midió en el stacker, debido a que se midieron muchas otras placas a la vez. En este aparato también se iba midiendo la OD en ciclos de 30 minutos, con una temperatura de 37°C, 70% de humedad, durante 48 horas.

4.2.2 Evaluación antimicrobiana utilizando sobrenadantes (SN) de los probióticos crecidos con y sin los extractos.

Del experimento anterior se recogieron los pocillos que contenían las bacterias probióticas crecidas en MRS + 0,05% cys y en MRSm + 0,05% cys + seta AF 10% de la Tabla 3, puesto que fueron los que tuvieron mejores resultados en el ensayo anterior. Se centrifugó para separar los SN y descartar los pellets. Los SN se pasaron por los filtros de poro 0,2 μ m por si hubiera algún resto.

El protocolo de puesta a punto de cultivos se repitió, se sembraron en estría *E. coli* y *K. pneumoniae* en LB agar y *S. aureus* en BHI agar. Se incubaron toda la noche en la estufa a 37°C y al día siguiente se pasaron a su correspondiente medio líquido, dejándolas incubando a 37°C en agitación, 200 rpm, toda la noche. Al día siguiente se realizaban los lavados con PBS de los cultivos y se ajustó la OD a 1 en 1 mL.

Con el objetivo de evaluar el efecto antimicrobiano, se prepararon placas de 96 pocillos con los medios preparados y sus respectivos controles (Tabla 6).

Tabla 6. Medios necesarios para las placas en las que se van a evaluar el efecto antimicrobiano con SN de probióticos crecidos sin extracto y con extracto de seta AF10%.

Controles (Sin inocular)	Medios a evaluar
LB	LB
BHI	BHI
LB/BHI + 10% MRS	LB/BHI + 10% SN <i>L. plantarum</i>
	LB/BHI + 10% SN <i>L. casei</i>
	LB/BHI + 10% SN <i>L. acidophilus</i>
	LB/BHI + 10% SN <i>L. rhamnosus</i> GG
	LB/BHI + 10% SN <i>B. animalis</i>
LB AF	LB AF
BHI AF	BHI AF
LB/BHI + 10% MRSm y seta AF 10%	LB/BHI + 10% SN <i>L. plantarum</i> AF
	LB/BHI + 10% SN <i>L. casei</i> AF
	LB/BHI + 10% SN <i>L. acidophilus</i> AF
	LB/BHI + 10% SN <i>L. rhamnosus</i> GG AF
	LB/BHI + 10% SN <i>B. animalis</i> AF

En cada pocillo se añadieron 200 μ L del medio y 10 μ L de la bacteria correspondientes quedando a una OD de 0,05. Esta placa se midió en el espectrofotómetro con el programa Radiostar a 37°C, con agitación de 30 segundos, previa a cada ciclo de medición, cada 30 minutos, durante 48 horas.

4.2.3 Determinación de ácidos grasos de cadena corta.

Se prepararon los cultivos de las bacterias *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG y *B. animalis* en MRScys agar. Se incubaron en la estufa toda la noche a 37°C. Al día siguiente se pasó cada bacteria a tres medios diferentes: MRS, MRSm y el medio con el extracto de seta AF, todos ellos suplementados con 0,05% cys, y se dejaban incuban en la estufa a 37°C otra noche.

Para realizar el ensayo se siguió el proceso descrito por Eberhart et al. (2021). En primer lugar, se preparó el Internal Standard (IS) con ácido 3-metilvalérico a una concentración de 5 mM, diluyendo una solución stock a 10 mM con agua ultrafiltrada y ácido clorhídrico al 32%. Se siguió con la preparación de los estándares para hacer la recta patrón, siendo una solución madre con 8 AGCC (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido caprónico y ácido fórmico), a 100 mM y diluciones seriadas, como se indica en el Anexo 3.

Una vez preparadas las diluciones de la recta patrón se inició la extracción de las mismas. A 200 μ L de cada concentración de la recta patrón se le añadieron 800 μ L de solución IS y 1 mL de dietiléter, se agitó con el vórtex 10 segundos. Se añadió una cucharada pequeña de sulfato sódico para desecar la muestra, equivalente a 5-10 g, y se volvió a agitar con el vórtex 10 segundos, se centrifugó a 16000 g durante 2 minutos a 4°C. Se tomaron 200 μ L como mínimo de la fase superior, que es la fase orgánica, y se transfirieron a los viales de cromatografía.

A partir del protocolo de extracción de la recta patrón, se preparó el blanco siguiendo el mismo proceso, pero en este caso con MRS. Las muestras se prepararon a partir de los cultivos con los tres medios diferentes, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Se descartaron los pellets y se filtraron los SN. En este caso era muy importante mantener los SN en hielo para que no perdieran los compuestos volátiles. Se siguió la misma preparación que con la recta patrón, desde añadirle la solución IS hasta transferir la fase orgánica a las columnas de cromatografía.

El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante la cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GC-MS) en el sistema GC-MS Agilent GC 7890B-5977 equipado con un muestreador multipropósito (Gerstel MPS) y una columna de cromatografía Agilent DB-FATWAX de 30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μ m. El programa de temperatura del horno se ajustó de la siguiente manera: 100 °C durante 3 min, luego se aumentó a 100 °C a una velocidad de 5 °C por minuto, seguido de un aumento a 150 °C durante 1 min, luego se incrementó a 200 °C a una velocidad de 20 °C por minuto y finalmente se mantuvo a 200 °C durante 5 min. Se utilizó helio como gas portador con un flujo de 1 ml por minuto.

4.2.4 Inhibición de la conjugación bacteriana como método de transmisión de resistencia a antibióticos.

La preparación del ensayo se inició con el stock de antibióticos, medios suplementados con estos antibióticos y medios con extracto de seta AF10% indicados en el Anexo 4. Para realizar las conjugaciones se adaptó el protocolo utilizado en Hüttener et al. (2019). Se utilizaron dos *E. coli* diferentes, siendo la receptora *E. coli* MG1655 *lacZ::cm* que no produce

β -galactosidasa funcional (lacZ) y se sustituyó por una resistencia a cloranfenicol (cm), lo que le permite diferenciarlas. La donadora era *E. coli* MG1655 modificada con un nuevo plásmido (pKAZ3), que contenía resistencia a tetraciclina (tc).

- a) Conjugación utilizando el SN de *L. rhamnosus* con y sin extracto AF de seta como posible inhibidor.

Debido a los buenos resultados que se habían obtenido con los SN de las bacterias probióticas, se quiso comprobar si estos SN tuviesen también efecto sobre la conjugación bacteriana. En primer lugar, se seleccionó una bacteria probiótica, en concreto *L. rhamnosus*, para evaluar si la frecuencia de conjugación disminuía al añadirle su SN con y sin extracto AF de seta a la conjugación.

El primer paso fue sembrar e incubar ambas bacterias toda la noche en la estufa a 37°C. Fueron sembradas en medio MacConkey agar, que es un medio selectivo y diferencial, con el objetivo de diferenciar a simple vista las colonias resultantes de la donadora y las de la receptora, ya que, la receptora al no poder utilizar los azúcares del medio por su modificación debería tener colonias blancas, mientras que las de la donadora serían rojas, al no tener esa modificación. Al día siguiente, se pasó a medio líquido, preparando dos cultivos de cada bacteria, pasando la donadora a LB + tetraciclina (tc) (15 µg/mL) y a LB + SN de *L. rhamnosus* + tc (15 µg/mL), y la receptora a LB + cloranfenicol (cm) 25 µg/mL y LB + SN de *L. rhamnosus* + cm (25 µg/mL), se dejaron incubando una noche a 37°C.

Al inhibir el crecimiento de las *E. coli* con SN de *L. rhamnosus*, la conjugación se siguió con los cultivos que tenían solo LB en el medio. Se realizaron los lavados a los cultivos, centrifugando y descartando el SN, para resuspender el pellet en LB y ajustar cada cultivo a OD 1. La conjugación se llevó a cabo mezclando 200 µL de la cepa donadora con 200 µL de la cepa receptora (1:1) y se dejó incubando en estático durante 2 horas a 37°C. Se llevaron a cabo 3 conjugaciones a partir de estos cultivos, siendo la primera una conjugación en medio LB, en la segunda se añadió en el momento de la conjugación SN de *L. rhamnosus* y en la tercera se añadió SN de *L. rhamnosus* con extracto AF de seta.

Tras las dos horas, se realizó un banco de diluciones desde la -1 hasta la -6, empleando NaCl al 0,9%. Después se sembró en placas con medios suplementados con antibióticos mediante el método de siembra con bolas. En las placas que iban suplementadas con tc15 y cm25 como indica el Anexo 5, se sembraron la directa y la -1 del banco de diluciones, en las placas con solo tc15 o solo cm25 se sembraron la -5 y -6. De todas las siembras se realizaron duplicados y se dejaron incubando a 37°C durante toda la noche para realizar recuentos al día siguiente. Al día siguiente se realizaron los recuentos de cada una de las placas, teniendo en cuenta que las que llevaban tc15 eran mayoritariamente las donadoras, las que crecían en cm25 eran las receptoras y las de la placa con tc15 y cm25 eran las bacterias transconjugantes que tras la conjugación tenían las dos resistencias.

- b) Conjugación utilizando el extracto AF de seta como posible inhibidor.

En la segunda conjugación se quiso evaluar si el extracto AF de seta como tal, tenía efecto sin necesidad de crecer primero un probiótico y usando su SN, sino directamente el extracto en la conjugación. Se siguió el mismo protocolo que en el apartado “a” cambiando algunas condiciones. El pase a medio líquido se realizó pasando la donadora a LB + tc15 y a LB-setaAF10% + tc15, y la receptora a LB + cm25 y LB-setaAF10% + cm25, se dejaron incubando una noche a 37°C. Se realizaron los lavados a los cultivos, centrifugando y descartando el SN, para resuspender el pellet en LB o LB-setaAF10% y ajustar cada cultivo a OD 1. La conjugación

se llevó a cabo mezclando 200 μ L de la cepa donadora con 200 μ L de la cepa receptora (1:1) y se dejó incubando en estático durante 2 horas a 37°C. En este caso fueron 4 conjugaciones con diferentes combinaciones (Tabla 7).

Tabla 7. Diferentes combinaciones de conjugaciones realizadas, según el medio en el que se habían incubado y el medio que se había utilizado en el momento de la conjugación.

Conjugación 1	DLB	CONTROL. Ha crecido en LB y en los lavados se ha resuspendido en LB
	RLB	
Conjugación 2	DØAF	Ha crecido en LB y en los lavados se ha resuspendido en LB-setaAF10%
	RØAF	
Conjugación 3	DAFLB	Ha crecido en LB-setaAF10% y en los lavados se ha resuspendido en LB
	RAFLB	
Conjugación 4	DAFAF	Ha crecido en LB-setaAF10% y en los lavados se ha resuspendido en LB-setaAF10%
	RAFAF	

Tras las dos horas, se realizó un banco de diluciones desde la -1 hasta la -6, empleando NaCl al 0,9%. Después se sembró en placas con medios suplementados con antibióticos mediante el método de siembra con bolas. De todas las siembras se realizaron duplicados y se dejaron incubando a 37°C. Al día siguiente se realizaron los recuentos de cada una de las placas. Finalmente, la tasa de conjugación se calculó dividiendo el número de transconjugantes frente al número de donadores o receptores.

4.2.5 Análisis de datos

En el caso de las curvas de crecimiento obtenidas en los apartados anteriores se analizaron con el programa R (*R Core Team*, 2023), en concreto para el análisis de los datos obtenidos y el cálculo de los parámetros como tiempo de latencia (*lag time*), área bajo la curva (AUC) y la tasa de crecimiento ($\mu_{\max}/h$), se utilizó el paquete “tidyverse” (Wickham, 2016) y para la realización de los gráficos se utilizó el paquete “ggplot” (Wickham et al., 2007).

Para la estadística se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples mediante el software GraphPad Prism 10 (*GraphPad Prism*, 2023), para detectar diferencias estadísticamente significativas entre el control y las condiciones experimentales de los medios con extractos. Considerando significativos los valores con un p-valor < 0,05.

El análisis de datos de los AGCC, se utilizó la librería de compuestos NIST (National Institute of Standards and Technology), para identificar los ácidos presentes en cada cromatograma. A continuación, mediante los programas Agilent MassHunter Qualitative Analysis y Agilent MassHunter Quantitative Analysis (*MassHunter Workstation*, s. f.), se cuantificaron los AGCC de las muestras. Además, se realizó una prueba estadística ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples en GraphPad Prism 10 para saber si las diferencias de concentración de AGCC respecto al control eran significativas.

5. Resultados

5.1 Posible potencial prebiótico con extractos de alga *Ulva*.

Los resultados del estudio con los extractos de alga no tienen un efecto positivo ante el crecimiento de las bacterias probióticas (Figura 6a). Se observa que, en presencia de ambos extractos, tanto el *Ulva* AF como AFP, las bacterias crecen incluso menos que con el control de MRSm, que es un medio que como su propio nombre indica contiene solo los nutrientes esenciales para que las bacterias crezcan, pero no tienen ningún suplemento que lo enriquezca. Por tanto, los extractos de alga no han aportado ningún beneficio en el crecimiento de las bacterias probióticas.

Considerando significativos los valores con un $p\text{-valor} < 0,05$, los parámetros muestran que los valores más elevados del área bajo la curva son los de los controles positivos, MRScys y MRSm con glucosa, siendo estos significativos respecto al control ($p < 0,0001$). Además, el extracto *Ulva* AFP tiene mayor tiempo de latencia, es decir, retrasa el crecimiento bacteriano, que es justo lo contrario de lo que se busca. El único extracto en el que se detecta un resultado favorable es en *Ulva* AF, ya que en todas las cepas disminuye el tiempo de latencia, por tanto, empiezan la fase exponencial antes, aunque no llega a ser significativa en ningún caso, excepto en *B. animalis* ($p = 0,0147$), pero al no tener un área bajo la curva nada destacable, no se le puede atribuir ningún beneficio (Figura 6b).

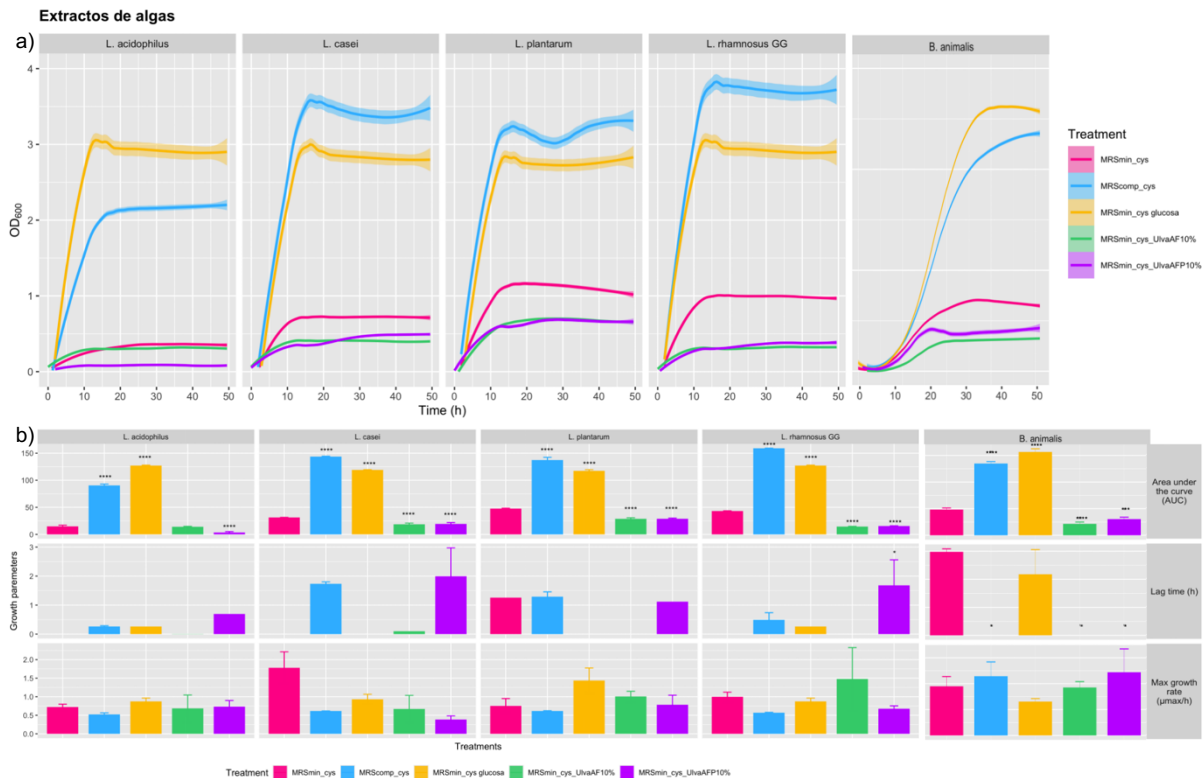


Figura 6. (a) Curvas de crecimiento de las diferentes cepas probióticas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con los extractos AF y AFP de alga *Ulva* y (b) sus respectivos parámetros, considerando significativos los valores con un $p\text{-valor} < 0,05$, incluyendo área bajo la curva, tiempo de latencia y tasa de crecimiento. Además, las barras de error representan la desviación estándar.

5.2 Posible efecto antimicrobiano con extractos de alga *Ulva*.

Comprobando el efecto antimicrobiano de los extractos de algas, *S. aureus* disminuía su crecimiento en presencia de los extractos, tanto AF como AFP, con lo cual sí se detecta un efecto positivo. No obstante, en cuanto a *E. coli* y *K. pneumoniae*, ambas tienen unos resultados parecidos, ya que el extracto AF les provoca un mayor crecimiento y el extracto AFP parece que les hace disminuir el crecimiento o ralentizarlo, pero no es un punto destacable, ya que en el caso de *E. coli*, tras 48 horas, en presencia de AFP crece al mismo nivel que el control, por lo que no es un efecto a largo plazo (Figura 7a).

Los parámetros refuerzan los resultados de las curvas de crecimiento porque la disminución del área bajo la curva en el caso de *S. aureus* en presencia de los extractos es significativa ($p < 0,0001$) y el tiempo de latencia aumenta para el AFP, lo que también determina un aspecto positivo. En cuanto a *E. coli*, el área bajo la curva en presencia de AF disminuye con respecto al control ($p < 0,0001$), pero en este caso no quiere decir que crezca menos, porque si lo contrastamos con las curvas de crecimiento, empieza a crecer más tarde y crece directamente de manera exponencial. En el caso de AFP, para *E. coli*, hay una disminución del área bajo la curva significativa ($p < 0,0001$), además de un aumento en el tiempo de latencia, y aunque llega a unos niveles de crecimiento elevados tras 48 horas, por lo menos se demuestra que ralentiza ese crecimiento. Con respecto a *K. pneumoniae*, el extracto AF hace que aumente su crecimiento y su área bajo la curva ($p < 0,0001$), mientras que en presencia de AFP disminuye ($p < 0,0001$), pero en ninguno de los dos casos el tiempo de latencia aumenta, sino que ocurre todo lo contrario (Figura 7b).

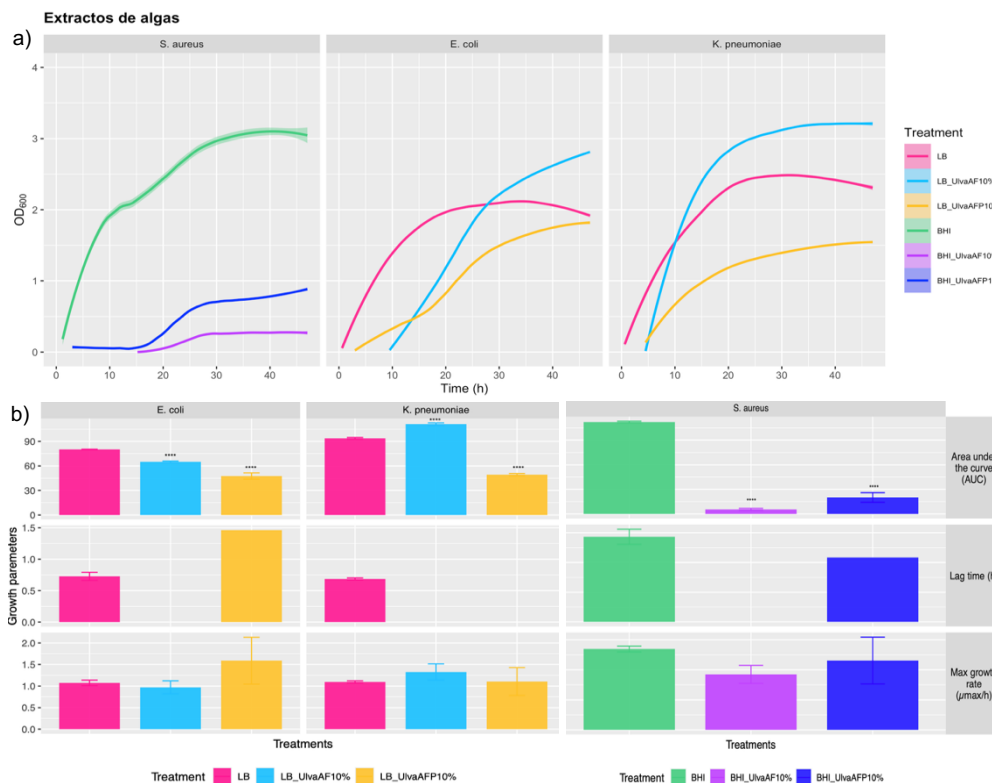


Figura 7. (a) Curvas de crecimiento de las diferentes cepas potencialmente patógenas en presencia de los extractos AF y AFP de alga *Ulva* y (b) sus respectivos parámetros, considerando significativos los valores con un p-valor < 0,05, incluyendo área bajo la curva, tiempo de latencia y tasa de crecimiento. Además, las barras de error representan la desviación estándar.

5.3 Posible potencial prebiótico con extractos de seta *Pleurotus eryngii*.

En los ensayos con los extractos de seta, del extracto AFP se tuvo que preparar al 2% por problemas en la disolución del propio extracto y quizá es uno de los motivos por los que no se detecta tanto efecto como con el AF. El extracto de seta AF ha tenido unos resultados destacables, ya que se ha podido observar un efecto positivo en el crecimiento de los probióticos, al aumentar el crecimiento en presencia del extracto en comparación con MRSm, llegando casi a los valores de los controles positivos o incluso estando por encima de uno de ellos, como en el caso de *B. animalis* (Figura 8a).

Estos resultados se ven reforzados con los parámetros, ya que, el área bajo la curva del extracto AF es significativamente mayor en todas las bacterias probióticas en comparación con el control, que es con el medio mínimo ($p < 0,0001$). El tiempo de latencia del extracto AF es menor en todas las cepas de *Lactobacillus*, llegando a ser significativo en *L. plantarum* ($p = 0,0002$) y en *L. acidophilus* ($p < 0,0001$), por lo que llegan a la fase exponencial antes, sin embargo, en *B. animalis* el tiempo de latencia es imperceptible en todos los medios, lo que significa que crecen exponencialmente desde el inicio (Figura 8b). En este caso, el extracto AF de seta *Pleurotus eryngii* sí que parece tener indicios de potencial prebiótico, ya que, tiene resultados positivos en todas las cepas probióticas, tanto *Lactobacillus* como *Bifidobacterium*.

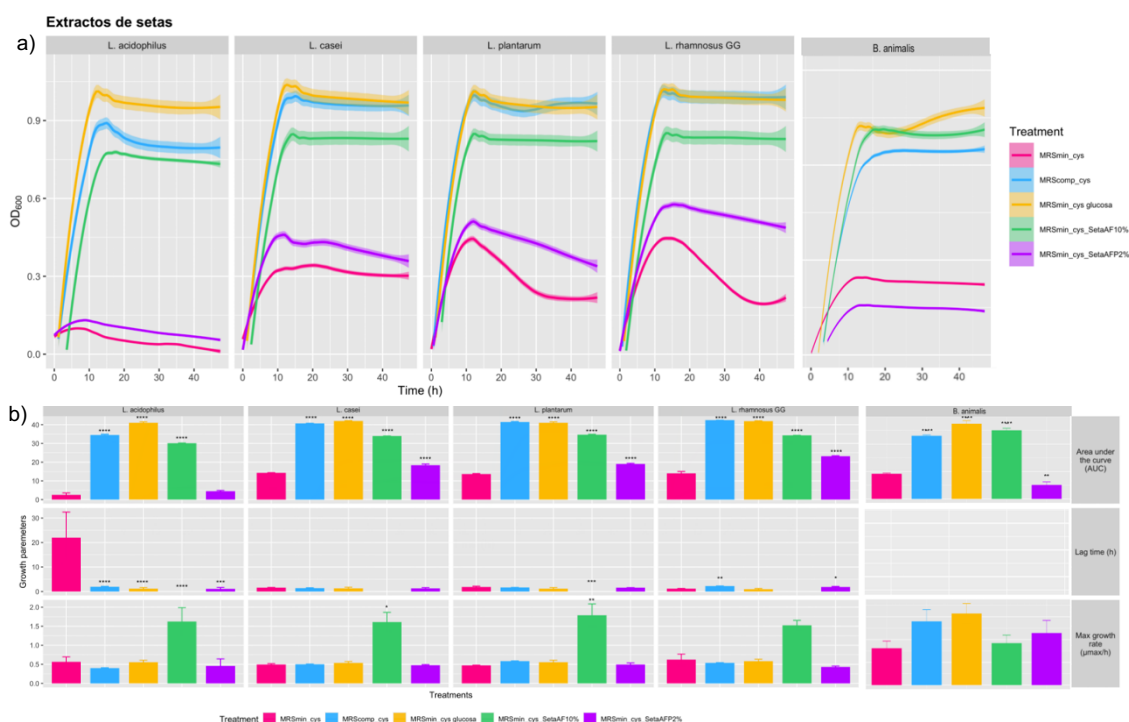


Figura 8. (a) Curvas de crecimiento de las diferentes cepas probióticas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con los extractos AF y AFP de seta *Pleurotus eryngii* y (b) sus respectivos parámetros, considerando significativos los valores con un p-valor $< 0,05$, incluyendo área bajo la curva, tiempo de latencia y tasa de crecimiento. Además, las barras de error representan la desviación estándar.

5.4 Determinación de los ácidos grasos de cadena corta

Al observar buenos resultados en el potencial prebiótico del extracto AF de seta *Pleurotus eryngii*, se quiso comprobar si estos resultados estaban relacionados con la producción de AGCC, ya que estos pueden ser uno de los productos de la fermentación de los extractos,

por parte de las bacterias probióticas. Los mejores resultados en la producción de AGCC, se encontraron en la producción de ácido acético en concreto, ya que, en el resto de AGCC no había diferencias entre los medios medidos (Figura 9).

Los resultados significativamente destacables centrándonos en el medio con el extracto AF, han sido con las bacterias *L. rhamnosus* y *B. animalis* ($p < 0,0001$), puesto que en ambos casos la mayor producción de ácido acético ha sido en el medio con presencia del extracto, en comparación con MRS y MRSm. En el caso de *L. acidophilus*, el medio con mayor producción de ácido acético ha sido MRS sin el extracto ($p = 0,0002$). Sin embargo, el medio con el extracto sigue teniendo un aumento significativo en la producción de ácido acético en presencia del extracto en comparación con el medio mínimo ($p = 0,0167$).

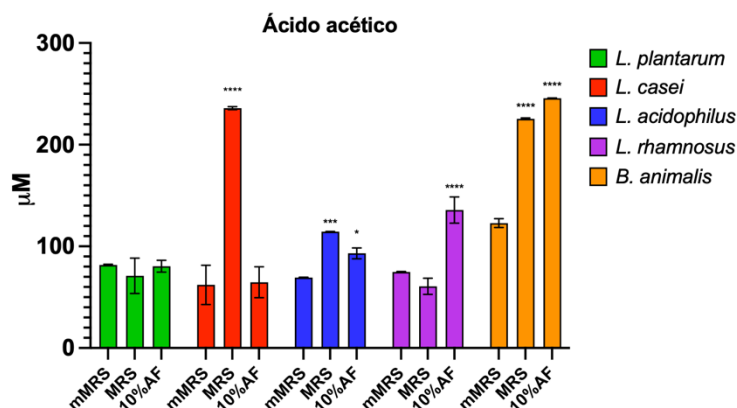
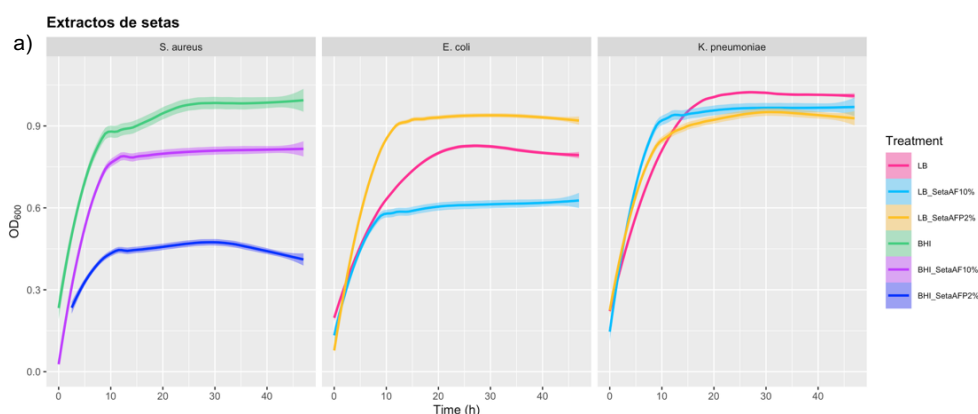


Figura 9. Producción de ácido acético por parte de las bacterias probióticas en medio MRSm, MRS y MRS con extracto AF, siendo significativos los valores con un p-valor $< 0,05$ y representando la desviación estándar con las barras de error.

5.5 Posible efecto antimicrobiano con extractos de seta *Pleurotus eryngii*.

En cuanto al efecto antimicrobiano, en *S. aureus* se puede observar disminución del crecimiento en presencia de ambos extractos, siendo más efectivo el AFP en este caso. Sin embargo, la *E. coli* aumenta su crecimiento en presencia del extracto AFP lo que es más perjudicial y disminuye su crecimiento de manera positiva en presencia de AF. En cuanto a *K. pneumoniae*, no le influye ningún extracto puesto que crece prácticamente igual de bien tanto en el control como en presencia de todos los extractos (Figura 10a).

En cuanto a los parámetros de estas curvas, se puede reforzar el resultado anterior, ya que, el área bajo la curva disminuye significativamente en presencia de AF para *E. coli* ($p < 0,0001$) y en presencia de AF y AFP para *S. aureus* ($p < 0,0001$). También se puede destacar que AF es el único extracto que hace que aumente el tiempo de latencia en todas las bacterias, por tanto, ralentiza el crecimiento de estas cepas (Figura 10b).



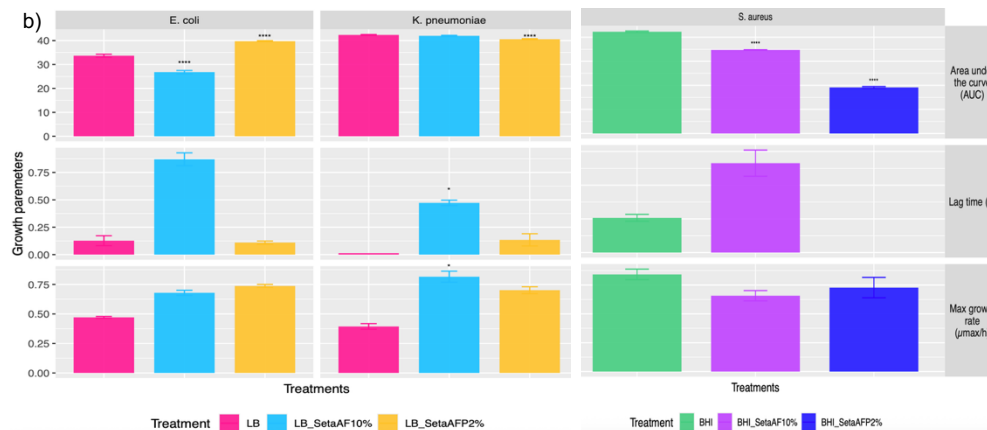


Figura 10. (a) Curvas de crecimiento de las diferentes cepas potencialmente patógenas en presencia de los extractos AF y AFP de seta *Pleurotus eryngii* y (b) sus respectivos parámetros, considerando significativos los valores con un p-valor < 0,05, incluyendo área bajo la curva, tiempo de latencia y tasa de crecimiento. Además, las barras de error representan la desviación estándar.

5.6 Evaluación antimicrobiana utilizando sobrenadantes (SN) de los probióticos crecidos con y sin el extracto AF de seta *Pleurotus eryngii*.

Al comprobar el efecto antimicrobiano de los SN de probióticos, se detecta que *E. coli* y *K. pneumoniae* tienen resultados positivos porque en ambos casos la mayoría de SN inhiben su crecimiento, por tanto, cumplen su función antimicrobiana. En concreto, todos los SN inhiben el crecimiento de *E. coli* excepto con el SN de *B. animalis* con AF y el SN de *L. acidophilus* sin AF. Respecto a *K. pneumoniae*, esta solo crece con el SN de *B. animalis* con AF y el SN de *L. acidophilus* con y sin AF, el resto de SN también inhiben su crecimiento (Figura 11a).

Para los parámetros, los SN que llevan el AF se comparan con LB con el extracto y los que no llevan AF se comparan con LB sin el extracto. En lo que respecta a *E. coli*, todos los SN con y sin AF hacen que disminuya significativamente el área bajo la curva con respecto a los controles ($p < 0,0001$). El SN de *B. animalis* con AF y el SN de *L. acidophilus* sin AF aunque siguen teniendo un área bajo la curva menor que sus respectivos controles son los únicos que no son capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria. En cuanto al tiempo de latencia, estos dos SN tienen un tiempo de latencia menor ($p = 0,0026$ y $p = 0,4003$ respectivamente) que los que inhiben su crecimiento, que no es lo que se busca, que detecta un tiempo de latencia máximo, pero lo que sucede es que no crecen ($p < 0,0001$).

En cuanto a *K. pneumoniae*, el área bajo la curva de SN de *B. animalis* y *L. acidophilus* con AF supera significativamente al control ($p < 0,0001$), aumentando el crecimiento de bacterias patógenas, mientras que con el SN de *L. acidophilus* sin AF aunque crece la bacteria, sigue teniendo un área bajo la curva significativamente menor que el control ($p < 0,0001$). Los tiempos de latencia más destacables en este caso son los del resto de SN ($p < 0,0001$), que son los que inhiben su crecimiento, porque los SN que hacen que crezca la bacteria son muy bajos y no significativos ($p = 0,3552$; $p = 0,1277$; $p = 0,9863$ respectivamente), por lo que hace que crezca la bacteria rápido (Figura 11b).

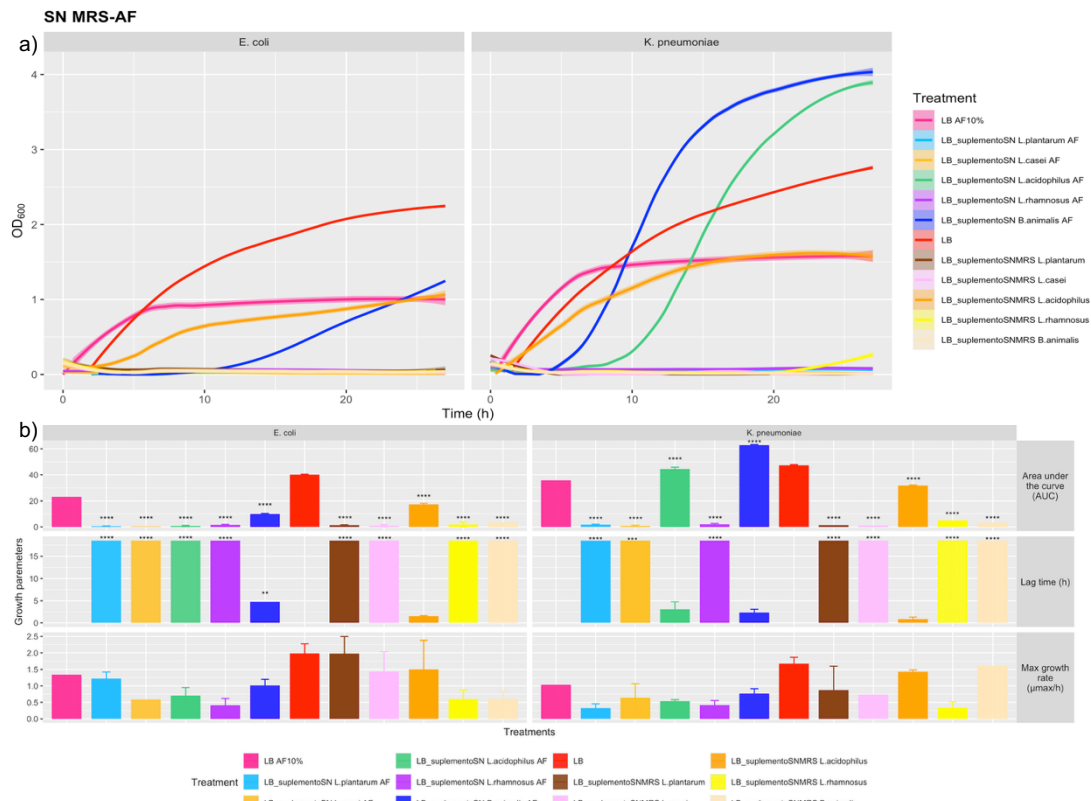
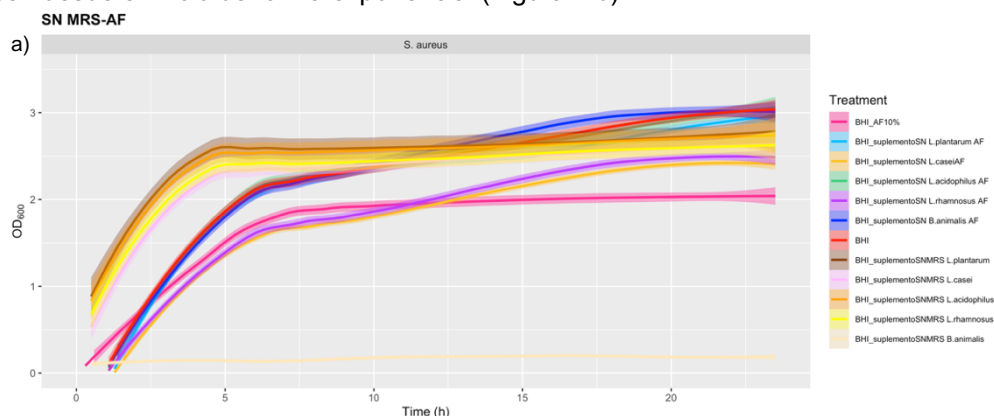


Figura 11. (a) Curvas de crecimiento de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* crecidas con los SN con y sin extracto AF de seta *Pleurotus eryngii* y (b) sus respectivos parámetros, considerando significativos los valores con un p-valor < 0,05, incluyendo área bajo la curva, tiempo de latencia y tasa de crecimiento. Además, las barras de error representan la desviación estándar.

Pasando al crecimiento de *S. aureus* con los SN de las bacterias probióticas con y sin extracto, se puede ver como cambian en este caso tanto las curvas de crecimiento como los parámetros, ya que, *S. aureus* puede crecer con todos los SN excepto con el SN de *B. animalis* sin extracto, que es el único caso en el que se inhibe el crecimiento (Figura12a).

En los parámetros podemos observar como casi todos los SN aumentan significativamente el área bajo la curva con respecto al control, algunos de estos son SN de *L. plantarum* con y sin AF ($p < 0,0001$); el SN de *L. casei* sin AF ($p = 0,0012$), con AF no es significativo ($p = 0,3240$); el SN de *L. acidophilus* con y sin AF ($p < 0,0001$); SN de *L. rhamnosus* con y sin AF ($p = 0,0018$ y $p < 0,0001$ respectivamente); SN de *B. animalis* con AF ($p < 0,0001$). La única área bajo la curva que se puede destacar de forma positiva en la del SN de *B. animalis* sin AF ($p < 0,0001$), además de tener un tiempo de latencia tan elevado porque su crecimiento es casi imperceptible ($p < 0,0001$). El resto de valores del tiempo de latencia son inexistentes porque crecen desde el inicio de forma exponencial (Figura12b).



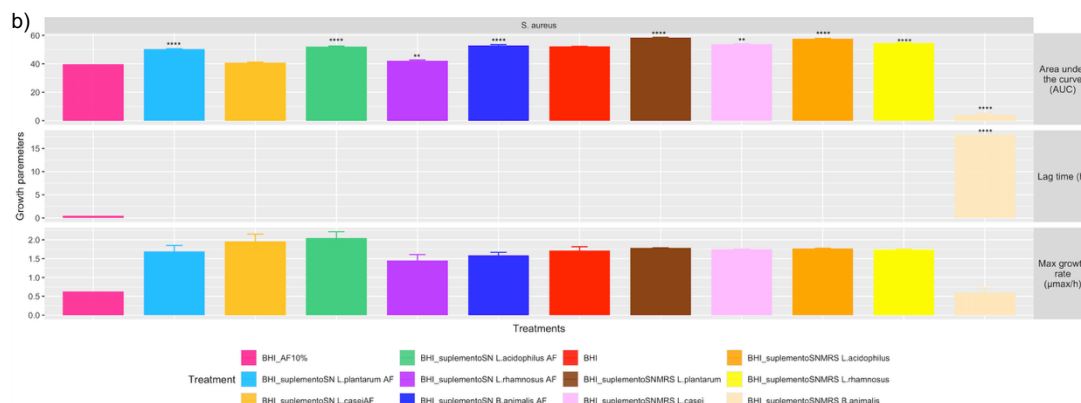


Figura 12. (a) Curva de crecimiento de *S. aureus* crecida con los SN con y sin extracto AF de seta *Pleurotus eryngii* y (b) sus respectivos parámetros, considerando significativos los valores con un p-valor < 0,05, incluyendo área bajo la curva, tiempo de latencia y tasa de crecimiento. Además, las barras de error representan la desviación estándar.

5.7 Medición de la inhibición de la conjugación bacteriana.

Las *E. coli* que se cultivaron toda la noche con el SN de *L. rhamnosus*, directamente no crecieron y las que se cultivaron con LB sí. Con estas últimas fue con la que se realizó la conjugación, obteniendo unos resultados poco destacables, ya que, añadirle los SN tanto con extracto como sin, apenas afectaba a la conjugación, manteniendo prácticamente igual que el control la frecuencia de conjugación. Se puede observar un ligero aumento en la tasa de conjugación utilizando el SN sin el extracto y una disminución de la frecuencia en presencia del extracto en el SN pero sin ser nada de ello significativo ($p=0,7179$ y $p=0,4332$).

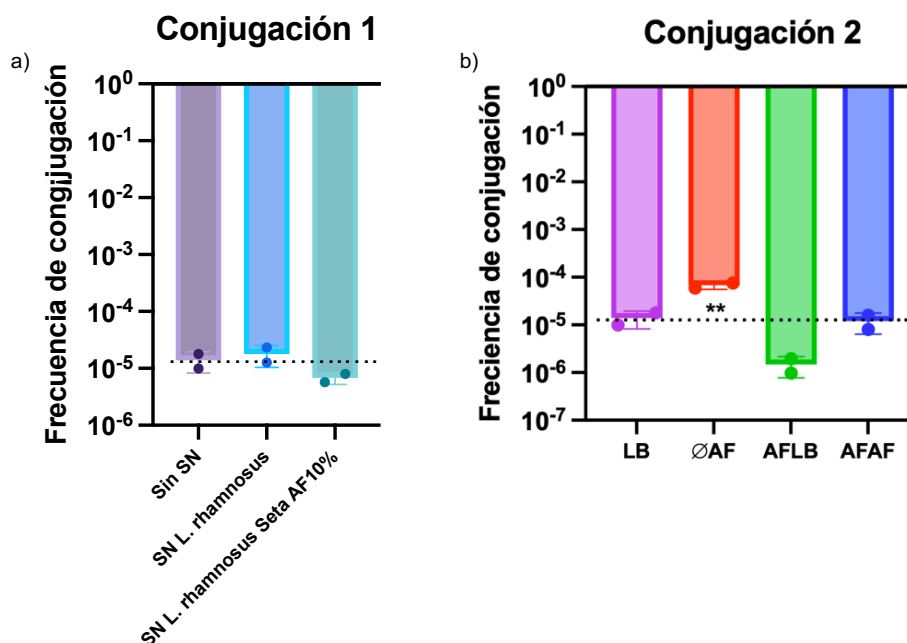


Figura 13. (a) Conjugación 1, con tres condiciones: el control (sin SN) y SN de *L. rhamnosus* sin y con extracto AF de seta *Pleurotus eryngii*. (b) Conjugación 2, con cuatro condiciones diferentes: el control (LB), incubadas con LB y añadiendo el extracto en el momento de conjugación (ØAF), incubándolas en presencia del extracto y sin adición de extracto adicional (AFLB) y, por último, incubadas en presencia del extracto y añadiendo más extracto en el momento de la conjugación (AFAF). Además, las barras de error representan la desviación estándar.

Los resultados de la segunda conjugación son más prometedores. El control en este caso sería el LB, comparándolo con el resto de condiciones, la de AFAF tiene prácticamente la

misma frecuencia de conjugación que el control ($p=0,9859$), la de ØAF tiene una frecuencia de conjugación significativamente más alta ($p=0,0039$), sin ser esto algo positivo, y por último el AFLB es la única que tiene una frecuencia de conjugación menor, sin llegar a ser significativa ($p=0,3187$).

6. Discusión

Los extractos de seta *Pleurotus eryngii* y alga *Ulva* han sido estudiados con la idea de poder demostrar su potencial prebiótico y antimicrobiano, pero no en todos los casos los resultados han sido los esperados.

Si observamos los resultados de los ensayos con extractos de alga, en cuanto al posible potencial prebiótico, lo esperado era que las bacterias probióticas en presencia de los extractos AF y AFP de alga crecieran igual que los controles positivos que eran MRS y MRSm con glucosa o que acelerarían el crecimiento, disminuyendo el tiempo de latencia, para que pudieran llegar a tener la posibilidad de tener potencial para ser prebióticos. Sin embargo, no se ha obtenido ningún resultado prometedor, ya que ni si quiera le permite a los probióticos aumentar el crecimiento en comparación con el medio mínimo. En el caso del efecto antimicrobiano, lo esperado era que redujeran el crecimiento de las bacterias potencialmente patógenas al crecerlas con los extractos, lo que supondría un beneficio para la salud, en este caso, se han obtenido mejores resultados, al observar que *S. aureus* sí disminuía su crecimiento en presencia de ambos extractos.

Con respecto al potencial prebiótico, otros estudios presentan resultados prometedores en condiciones similares, que afirman que los extractos de algas, en concreto el ulvano tiene potencial prebiótico al estimular el crecimiento de *Bifidobacteria* y *Lactobacillus* y promover la producción de ácidos grasos de cadena corta (Kansandee et al., 2024; Seong et al., 2019). Concretamente, en un estudio en Corea afirman que los extractos puros, ulvanos, extraídos de las algas, es decir, similar al AFP, aumentan significativamente el crecimiento de algunas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, disminuyendo a su vez el pH. Además afirman que las bacterias patógenas no tienen cambios de crecimiento (Seong et al., 2019). Estas afirmaciones son completamente contrarias a los resultados obtenidos en este trabajo, puesto que los resultados expuestos centrándonos en AFP de alga, no mejoraron el crecimiento de las cepas probióticas mientras que sí fueron capaces de disminuir el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas incluso aumentando su tiempo de latencia, además de disminuir su crecimiento.

En el caso de las setas, los extractos de *Pleurotus eryngii* han demostrado en otro estudio ser mejor fuente de crecimiento que otras cepas como *Pleurotus ostreatus* (Synytsya et al., 2009). En el estudio mencionado, el crecimiento bacteriano de probióticos con los extractos de *Pleurotus eryngii* presenta resultados similares, a pesar de no realizar exactamente la misma extracción. En los resultados que hemos obtenido en cuanto al potencial prebiótico de los extractos de seta, lo esperado era que las bacterias probióticas en presencia de los extractos pudieran crecer significativamente más en comparación con el medio mínimo e incluso más rápido, y sí se ha obtenido un resultado similar a lo esperado, sobre todo con el extracto AF de seta, con lo cual existe la posibilidad de que los extractos de *Pleurotus eryngii* sean grandes candidatos para ser prebióticos.

Relacionado con los AGCC, podemos observar como el más relevante en este estudio es el ácido acético y en algunas bacterias si se detecta un aumento en la producción de este al añadirle el extracto AF de seta *Pleurotus eryngii*, destacando *L. rhamnosus* y *B. animalis*. Como estas bacterias pueden representar los probióticos que existen en la microbiota intestinal, se

pueden relacionar con estudios *in vivo*. En concreto, con un estudio que se realizó en China, en el que se le suministraba extractos de algas a ratones en diferentes concentraciones para ver si aumentaba la producción de AGCC en el ciego y colon, de ser así, mejoraría la microbiota intestinal, y se observó que cuanto mayor concentración del extracto de seta, mayor producción de AGCC, lo que suponía un efecto beneficioso (Ma et al., 2017). Por tanto, existe relación entre los extractos y la producción de AGCC, ya que, aunque se varíe la concentración administrada *in vivo* de extracto, se siguen produciendo cantidades de AGCC, y al ser estos beneficiosos, no se ha observado incompatibilidad al aumentar la concentración.

Debido a los buenos resultados obtenidos en el potencial prebiótico de los extractos de seta, es muy importante destacar el efecto antimicrobiano de los mismos. En este caso, se esperaba que las bacterias potencialmente patógenas crecieran menos en presencia de estos extractos. En este estudio se ha observado efecto antimicrobiano en *S. aureus* con los dos extractos, AF y AFP, y en *E. coli* solo con AF, lo que también se ha observado en un estudio externo en China que los polisacáridos extraídos de *Pleurotus eryngii* mostraron actividad inhibitoria en estas dos bacterias también, sin embargo con otra cepa de *Pleurotus*, *P. eous* consiguieron actividad inhibitoria en *K. pneumoniae* además de en *E. coli* y *S. aureus* (Liu et al., 2022), que son justo las tres bacterias potencialmente patógenas estudiadas en el trabajo.

Existen multitud de estudios anteriores que explican los buenos resultados del uso de los SN de cepas probióticas para actividad antimicrobiana o incluso otros efectos. Como el uso del SN de *L. plantarum* para efecto antimicrobiano en *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* y *S. aureus* (Danilova et al., 2019). También hay un estudio que muestra buenos resultados en la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* mediante el uso del sobrenadante de *L. acidophilus* (Michetti et al., 1999). Además estos sobrenadantes pueden tener otros efectos beneficiosos en la salud como la inhibición de la invasión de células cancerosas de colon al influir en la actividad de la proteína de unión estrecha gracias a los sobrenadantes de *L. casei* y *L. rhamnosus* GG (Escamilla et al., 2012).

Por todo ello, al comprobar que el extracto AF de seta *Pleurotus eryngii* puede tener efecto antimicrobiano en algunos casos, se quiso comprobar si los propios SN de las bacterias probióticas crecidas con y sin extracto AF afectaban al crecimiento de las bacterias potencialmente patógenas. Lo ideal sería que, al cultivar las bacterias patógenas con los SN, se inhibiera el crecimiento bacteriano. En el caso de *E. coli* y *K. pneumoniae* se obtuvieron resultados bastante prometedores tanto con los SN de las bacterias con y sin extracto. Sin embargo, en el caso de *S. aureus* en este mismo ensayo solo tiene buenos resultados con el SN de *B. animalis* sin extracto, que es un resultado que ya se había observado en otro estudio en Finlandia, que estudiaron diferentes cepas de *Bifidobacterium* extraídas de personas ancianas y algunas de ellas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus* (Lahtinen et al., 2007).

De todas las cepas probióticas utilizadas, se seleccionó el *L. rhamnosus* GG para realizar la conjugación porque está descrito en artículos como una de las cepas probióticas más utilizadas y que tiene diversos efectos positivos sobre la salud como prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales y diarrea, y la estimulación de la respuesta inmunitaria (Segers & Lebeer, 2014). Además, en otro estudio se había demostrado que los AGCC habían sido capaces de inhibir la conjugación de dos bacterias y por tanto había disminuido la tasa de conjugación (Ott & Mellata, 2024). Por estos dos factores y los buenos resultados del ensayo con los SN, se quiso llevar a cabo las conjugaciones con SN de *L. rhamnosus* GG. Lo ideal en la inhibición de la conjugación era que disminuyera la frecuencia de conjugación, por tanto, disminuiría la transmisión de resistencia a antibióticos y se abordaría desde otro punto el gran problema que hay hoy en día con las bacterias multirresistentes. En este caso los resultados no fueron óptimos, ya que, si se añadía el SN en el momento de la conjugación, no se detectaba

apenas cambio con el control, siendo el *L. rhamnosus* GG una de las cepas que había obtenido resultados significativos en el ensayo de los AGCC. Quizá sea necesaria una concentración significativa de todos los AGCC para que evite la conjugación, y como en este solo es significativo el ácido acético, no es suficiente. Una vez se utilizaba el extracto en sí, se empezaba a ver mejores resultados en la inhibición de la conjugación, sin llegar a ser significativos, lo que puede deberse a una baja concentración del extracto y quizá sea necesario mayor concentración del mismo para que estos resultados lleguen a significativos, pero ya se puede extraer la información, de que la mejor manera para inhibir la conjugación es incubando las bacterias con el extracto y después en el momento de la conjugación, no añadirle más extracto.

Por todo ello, este trabajo podría relacionarse con la ODS 3 “Salud y Bienestar”, ya que, con los efectos vistos en los extractos, sobre todo en AF de seta *Pleurotus eryngii*, se puede ver que sí tiene potencial para llegar a ser prebiótico, así como efecto antimicrobiano, tanto por sí mismo, como los SN de las bacterias probióticas crecidas con el extracto, todo conlleva a posibles beneficios y podría llegar a relacionarse con la salud de la microbiota intestinal.

Al ser un estudio inicial sobre los extractos, sólo se han podido probar sus efectos a determinadas concentraciones y sobre pocas cepas, tanto probióticas como patógenas. Además, no se han podido hacer réplicas de los experimentos, por falta de tiempo. Pero al obtener buenos resultados en uno de los extractos y comprobar que sí puede llegar a ser prometedor, es necesario mucho más estudio alrededor de este tema para obtener resultados significativos, en todos los aspectos de los extractos y así poder llevar este estudio un paso más allá. En cuanto a futuras líneas de investigación para continuar con el estudio podrían ser, seleccionar los mejores extractos a nivel antimicrobiano y comprobar su efecto en un gran número de patógenos variados para asegurarse de que su efecto no sea por el tipo de cepa, sino que es un efecto general. También, en este estudio se han aplicado porcentajes concretos de extracto, 10% en todos, menos AFP de seta al 2%, por lo que se podría ver si su efecto cambia según el porcentaje de extracto que se ponga al medio y así tener un ensayo de dosis-respuesta. Incluso sería relevante seguir con un ensayo de precipitación de proteínas de los SN de las bacterias probióticas crecidas con y sin extracto, para compararlos, y ver si hay diferencias que pudieran repercutir en el efecto antimicrobiano. Por último, un ensayo a nivel más global sería seleccionar el extracto más prometedor y utilizarlo para una digestión simulada y fermentación colónica, con el fin de ver cómo modula la microbiota mediante la secuenciación del 16S.

7. Conclusiones

- Con respecto al objetivo general, existen evidencias por parte de alguno de los extractos, de que pueda tener beneficios para la salud teniendo en cuenta su posible potencial prebiótico y efecto antimicrobiano.

- Respecto al primer objetivo específico del trabajo se concluye que el extracto a destacar por su posible potencial prebiótico es el extracto AF de seta *Pleurotus eryngii*, por mejorar el crecimiento de todas las cepas probióticas y aumentar la producción de ácido acético en presencia del extracto.

- En cuanto al potencial antimicrobiano pueden destacarse varios extractos, como el AFP de alga *Ulva* y el AF de seta *Pleurotus eryngii* porque ambos tienen la capacidad de disminuir el crecimiento de al menos dos de las tres cepas potencialmente patógenas estudiadas.

- El extracto AF de seta *Pleurotus eryngii* no puede destacarse como inhibidor de la conjugación, pero sí se puede concluir que la mejor manera para tener indicios en la inhibición de la conjugación es incubar las bacterias con el extracto y no agregar extracto adicional en el momento de la conjugación.

8. Bibliografía

Álvarez, J., Fernández Real, J. M., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., Saenz De Pipaon, M., & Sanz, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y Hepatología*, 44(7), 519-535. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>

Bernabeu, M., Salgado-Ramos, M., Barba, F. J., Collado, M. C., & Castagnini, J. M. (2024). Impact of sweet potato peels extracts obtained by pulsed electric fields on the growth of probiotic strains from *Lactobacillus* genus. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 92, 103590. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103590>

Bevilacqua, A., Campaniello, D., Speranza, B., Racioppo, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2024). An Update on Prebiotics and on Their Health Effects. *Foods*, 13(3), 446. <https://doi.org/10.3390/foods13030446>

Cabezón, E., De La Cruz, F., & Arechaga, I. (2017). Conjugation Inhibitors and Their Potential Use to Prevent Dissemination of Antibiotic Resistance Genes in Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2329. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02329>

Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., De La Cruz, F., & Arechaga, I. (2014). Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiology Reviews*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12085>

Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Smiderle, F. R., Rosado, F. R., Sassaki, G. L., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2006). A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. *Carbohydrate Polymers*, 66(2), 252-257. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.03.009>

Cerletti, C., Esposito, S., & Iacoviello, L. (2021). Edible Mushrooms and Beta-Glucans: Impact on Human Health. *Nutrients*, 13(7), 2195. <https://doi.org/10.3390/nu13072195>

Danilova, T. A., Adzhieva, A. A., Danilina, G. A., Polyakov, N. B., Soloviev, A. I., & Zhukhovitsky, V. G. (2019). Antimicrobial Activity of Supernatant of *Lactobacillus plantarum* against Pathogenic Microorganisms. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 167(6), 751-754. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04615-9>

Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325-2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>

Eberhart, B. L., Wilson, A. S., O'Keefe, S. J. D., Ramaboli, M. C., & Nesengani, L. T. (2021). A simplified method for the quantitation of short-chain fatty acids in human stool. *Analytical Biochemistry*, 612, 114016. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.114016>

Escamilla, J., Lane, M. A., & Maitin, V. (2012). Cell-Free Supernatants from Probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG Decrease Colon Cancer Cell Invasion In Vitro. *Nutrition and Cancer*, 64(6), 871-878. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.700758>

Flannery, D. D., Chiotos, K., Gerber, J. S., & Puopolo, K. M. (2022). Neonatal multidrug-resistant gram-negative infection: Epidemiology, mechanisms of resistance, and management. *Pediatric Research*, 91(2), 380-391. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01745-7>

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Gotteland, M., Riveros, K., Gasaly, N., Carcamo, C., Magne, F., Liabeuf, G., Beattie, A., & Rosenfeld, S. (2020). The Pros and Cons of Using Algal Polysaccharides as Prebiotics. *Frontiers in Nutrition*, 7, 163. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00163>

GraphPad Prism (Versión 10.1.1). (2023). [Software]. <https://www.graphpad.com>

Hüttener, M., Prieto, A., Aznar, S., Bernabeu, M., Glaría, E., Valledor, A. F., Paytubi, S., Merino, S., Tomás, J., & Juárez, A. (2019). Expression of a novel class of bacterial Ig-like proteins is required for IncHI plasmid conjugation. *PLOS Genetics*, 15(9), e1008399. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008399>

Iacob, S., Iacob, D. G., & Luminos, L. M. (2019). Intestinal Microbiota as a Host Defense Mechanism to Infectious Threats. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3328. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03328>

Isaac-Bamgboye, F. J., Mgbeghidinma, C. L., Onyeaka, H., Isaac-Bamgboye, I. T., & Chukwugozie, D. C. (2024). Exploring the Potential of Postbiotics for Food Safety and Human Health Improvement. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2024(1), 1868161. <https://doi.org/10.1155/2024/1868161>

Jagtap, A. S., Parab, A. S., Manohar, C. S., & Kadam, N. S. (2022). Prebiotic potential of enzymatically produced ulvan oligosaccharides using ulvan lyase of *Bacillus subtilis*, NIOA181, a macroalgae-associated bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 133(5), 3176-3190. <https://doi.org/10.1111/jam.15775>

Ji, J., Jin, W., Liu, S., Jiao, Z., & Li, X. (2023). Probiotics, prebiotics, and postbiotics in health and disease. *MedComm*, 4(6), e420. <https://doi.org/10.1002/mco2.420>

Kansandee, W., Moonmangmee, S., Vangpikul, S., Kosawatpat, P., & Tamtin, M. (2024). Physicochemical properties and in vitro prebiotic activity of *Ulva rigida* polysaccharides. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 59, 103252. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103252>

Krangkratok, W., Chantorn, S., Choosuwan, P., Phomkaivon, N., La-ongkham, O., Kosawatpat, P., Tamtin, M., & Praiboon, J. (2023). Production of prebiotic ulvan-oligosaccharide from the green seaweed *Ulva rigida* by enzymatic hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 54, 102922. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102922>

Lahtinen, S. J., Jalonen, L., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. J. (2007). Specific *Bifidobacterium* strains isolated from elderly subjects inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 125-128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.023>

Li, C., Tang, T., Du, Y., Jiang, L., Yao, Z., Ning, L., & Zhu, B. (2023). Ulvan and Ulva oligosaccharides: A systematic review of structure, preparation, biological activities and applications. *Bioresources and Bioprocessing*, 10(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s40643-023-00690-z>

Liu, Q., Wu, H., Wu, Y., Liu, M., Zhang, Y., & Song, Y. (2022). Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of the Polysaccharides from Mycelium and the Culture Medium of *Pleurotus Eryngii* Strain UN-1. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 18(3), 261-270. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2022.261.270>

Ma, G., Kimatu, B. M., Zhao, L., Yang, W., Pei, F., & Hu, Q. (2017). In vivo fermentation of a *Pleurotus eryngii* polysaccharide and its effects on fecal microbiota composition and immune response. *Food & Function*, 8(5), 1810-1821. <https://doi.org/10.1039/C7FO00341B>

Manzoor, S., Wani, S. M., Ahmad Mir, S., & Rizwan, D. (2022). Role of probiotics and prebiotics in mitigation of different diseases. *Nutrition*, 96, 111602. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2022.111602>

MassHunter Workstation (Versión version B.08.00). (s. f.). [Software]. <https://www.agilent.com/en/promotions/masshunter-mass-spec>

Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P. H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A. L., & Corthésy-Theulaz, I. (1999). Effect of Whey-Based Culture Supernatant of *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* La1 on *Helicobacter pylori* Infection in Humans. *Digestion*, 60(3), 203-209. <https://doi.org/10.1159/000007660>

Mishra, N., Garg, A., Ashique, S., & Bhatt, S. (2024). Potential of postbiotics for the treatment of metabolic disorders. *Drug Discovery Today*, 29(4), 103921. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.103921>

Moradi, M., Molaei, R., & Guimarães, J. T. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109722. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109722>

Morales, D., Shetty, S. A., López-Plaza, B., Gómez-Candela, C., Smidt, H., Marín, F. R., & Soler-Rivas, C. (2021). Modulation of human intestinal microbiota in a clinical trial by consumption of a β -d-glucan-enriched extract obtained from *Lentinula edodes*. *European Journal of Nutrition*, 60(6), 3249-3265. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02504-4>

Morales-Ferré, C., Azagra-Boronat, I., Massot-Cladera, M., Tims, S., Knipping, K., Garssen, J., Knol, J., Franch, À., Castell, M., Rodríguez-Lagunas, M. J., & Pérez-Cano, F. J. (2021). Effects of a Postbiotic and Prebiotic Mixture on Suckling Rats' Microbiota and Immunity. *Nutrients*, 13(9), 2975. <https://doi.org/10.3390/nu13092975>

Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Ott, L. C., & Mellata, M. (2024). Short-chain fatty acids inhibit bacterial plasmid transfer through conjugation in vitro and in ex vivo chicken tissue explants. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1414401. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1414401>

Pacto Mundial Red Española. (s. f.). *17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)*. Recuperado 11 de mayo de 2025, de <https://www.pactomundial.org/que-puedes-hacer-tu/ods>

R Core Team (Versión R version 4.2.3). (2023). [Software]. <https://www.r-project.org/>

Samarra, A., Esteban-Torres, M., Cabrera-Rubio, R., Bernabeu, M., Arbolea, S., Gueimonde, M., & Collado, M. C. (2023). Maternal-infant antibiotic resistance genes transference: What do we know? *Gut Microbes*, 15(1), 2194797. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2194797>

Samarra, A., Flores, E., Bernabeu, M., Cabrera-Rubio, R., Bäuerl, C., Selma-Royo, M., & Collado, M. C. (2024). Shaping Microbiota During the First 1000 Days of Life. En S. Guandalini & F. Indrio (Eds.), *Probiotics and Child Gastrointestinal Health* (Vol. 1449, pp. 1-28). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-58572-2_1

Sanders, M. E., Merenstein, D., Merrifield, C. A., & Hutkins, R. (2018). Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*, 43(3), 212-225. <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>

Segers, M. E., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>

Seong, H., Bae, J.-H., Seo, J. S., Kim, S.-A., Kim, T.-J., & Han, N. S. (2019). Comparative analysis of prebiotic effects of seaweed polysaccharides laminaran, porphyran, and ulvan using in vitro human fecal fermentation. *Journal of Functional Foods*, 57, 408-416. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.014>

Snoeyenbos-West, O. L. O., Guerrero, C. R., Valencia, M., & Carini, P. (2024). Cultivating efficiency: High-throughput growth analysis of anaerobic bacteria in compact microplate readers. *Microbiology Spectrum*, 12(5), e03650-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03650-23>

Stajic', M., Vukojevic', J., & Duletic'-Laušević', S. (2009). Biology of *Pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1), 55-66. <https://doi.org/10.1080/07388550802688821>

Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Kovářiková, E., & Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 548-556. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.021>

Tidjani Alou, M., Lagier, J.-C., & Raoult, D. (2016). Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. *Human Microbiome Journal*, 1, 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2016.09.001>

Victoria Obayomi, O., Folakemi Olaniran, A., & Olugbemiga Owa, S. (2024). Unveiling the role of functional foods with emphasis on prebiotics and probiotics in human health: A review. *Journal of Functional Foods*, 119, 106337. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106337>

Wei, L., Wang, B., Bai, J., Zhang, Y., Liu, C., Suo, H., & Wang, C. (2024). Postbiotics are a candidate for new functional foods. *Food Chemistry: X*, 23, 101650. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101650>

Wickham, H. (2016). *tidyverse: Easily Install and Load the «Tidyverse»* (p. 2.0.0) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.tidyverse>

Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D., & Van Den Brand, T. (2007). *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics* (p. 3.5.2) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ggplot2>

Anexos

1. Preparación de medios con extractos.

Para las bacterias probióticas se preparaba en el caso del alga *Ulva*, MRSm + 0,05% cys + 10% AF o 10% AFP, y para la seta MRSm + 0,05% cys + 10% AF o 2% AFP debido a las dificultades para la disolución y filtración de este extracto.

Para el efecto antimicrobiano, se preparaba LB/BHI + 10% AF o 10% AFP en el caso del alga *Ulva*, y para la seta LB/BHI + 10% AF o 2% AFP debido a las dificultades para la disolución y filtración de este extracto.

2. Preparación de medios de cultivo y suplementos necesarios

Los medios de cultivo utilizados durante todos los experimentos se preparan con H₂O destilada, hasta el volumen que se necesite:

Tabla 1. Medios utilizados con sus correspondientes concentraciones.

Medios finales sólidos	Medios finales líquidos
MRS (55g/L) + agar (15g/L)	MRS (55g/L)
MRS (55g/L) + agar (15g/L) + 0,05% cys	MRSm (without dextrose) (35,15g/L)
LB (25g/L) + agar (15g/L)	LB (25g/L) + agar (15g/L)
BHI (37g/L) + agar (15g/L)	BHI (37g/L) + agar (15g/L)
MacConkey (50g/L) + agar (15g/L)	PBS (1 pastilla cada 200 mL)

Se autoclavan todos los medios a 121°C durante 15 minutos, si son medios líquidos se dejan tal cual y si son medios con agar se tienen que preparar las placas Petri, en las que se vierte entre 20 y 25 mL por placa, cuando se secan, se guardan a 4°C para que se conserven bien mientras no se estén usando.

Para la cisteína, se prepara un stock al 2,5%, y para la glucosa se prepara un stock al 10% y todo se filtra por el filtro de 0.22 µm.

3. Preparación de la recta patrón para la identificación y cuantificación de AGCC.

Se prepara una solución madre con 8 AGCC a 100 mM con un volumen final de 5 mL con H₂O mq.

Tabla 2. AGCC necesarios para la preparación de la recta patrón que será el estándar.

AGCC	Volumen (µL) que hay que añadir a los 5 mL
Ácido acético	28,6
Ácido propiónico	37,3
Ácido butírico	46,0
Ácido isobutírico	46,4
Ácido isovalérico	55,2
Ácido valérico	54,4
Ácido caprónico	76,9
Ácido fórmico	18,9

Después de tener la solución madre con los 8 AGCC a una concentración de 100 mM, se realizan diluciones para crear la recta patrón con diferentes concentraciones.

Tabla 3. Diluciones para la preparación de la recta patrón.

mM	μL (100 mM)	μL H2O
25	250	750
20	200	800
10	100	900
4	40	960
2	20	980
0,4	4	996
0,2	2	998
0,1	1	999

4. Preparación de stock de antibióticos para la conjugación

Tabla 4. Preparación de los antibióticos del stock.

Antibiótico	Preparación
cm (25 mg/mL)	4 mL etanol 100% + 100 mg cm
tc (15 mg/mL)	4 mL H ₂ O + 60 mg tc -> filtrar por 0,2 μm
X-gal (40 mg/mL)	4 mL dimetilformamida + 160 mg X-gal

Después de preparar los stocks, hacemos alícuotas de 500 μL para congelarlas.

5. Preparación de las placas para sembrar las conjugaciones.

Hay tres tipos de placa, las que solo llevan tc que serán donde crecerán las donadoras, las que lleven cm donde crecerán las receptoras y las que lleven ambos antibióticos que crecerán las transconjugantes. De todos los antibióticos que se añadan, se tiene que calcular la dilución 1:1000 del stock, quedando:

Tabla 5. Preparación de medios para sembrar las diluciones de las conjugaciones.

LB (25g/L) + agar (15g/L) + X-gal + tc	Donadoras
LB (25g/L) + agar (15g/L) + X-gal + cm	Receptoras
LB (25g/L) + agar (15g/L) + X-gal + cm + tc	Transconjugantes

Después de preparar los medios, se autoclavan a 121°C durante 15 minutos, y añaden los antibióticos y X-gal. Se preparan las placas Petri, en las que se vierte entre 20 y 25 mL por placa, cuando se secan, se guardan a 4°C para que se conserven bien mientras no se estén usando.