



Universidad Nacional Autónoma de México

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Centro De Ciencias Genómicas

Dinámica ecológica de comunidades microbianas sintéticas

Tesis

para optar el grado de:

Doctora en Ciencias Biomédicas

Presenta:

Daniela Reyes González

Directora de tesis

Dra. Ayari Fuentes Hernández

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Comité tutor

Dr. David René Romero Camarena

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Dra. Ana Elena Escalante Hernández

Instituto de Ecología, UNAM.

Cuernavaca, México. Mayo, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El trabajo de investigación reportado aquí, se realizó en el laboratorio de Biología de Sistemas y Biología Sintética del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 572373 y el apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN215920.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a todas y todos mis mentores,

A Ayari Fuentes, por el apoyo, la confianza y paciencia que tuvo conmigo a lo largo de estos años. Ha sido un gran honor tenerte como tutora y modelo a lo largo de mi doctorado, gracias.

A mi comité tutor, Ana Escalante, por toda la paciencia y las recomendaciones académicas y consejos, A David Romero por el apoyo incondicional, la escucha y las reflexiones académicas y éticas que tuvimos en los últimos años, gracias, sin duda su integridad y empatía ayudó a que mi doctorado fuera una experiencia tan gratificante.

Y, a Rafael Peña, por invitarme a formar parte de proyectos tan extraños y divertidos, gracias por todos los retos propuestos en estos años.

A mis compañeros de laboratorio: Charly, Sandra, Haydée, Eric, Afra, Carles, Bruno, Monica y Andrea. Fue un gusto compartir con ustedes logros, frustraciones, éxitos y muchos cafés con ciencia.

A los alumnos de licenciatura con quienes tuve oportunidad de trabajar más de cerca: Athena, Sofía, Oto, Anel y Emiliano, muchas gracias por sus preguntas y entusiasmo, aprendí mucho de ustedes.

A mi jurado de grado: Dra. Gloria Soberon, Dra. María Lourdes Girard, Dra. Gabiela Olmedo, Dra. Ayari Fuentes y al Dr. Lorenzo Segovia por la revisión y comentarios hechos a este documento.

A la comisión de equidad y género del CCG por recibirme e impulsarme a aprender y cuestionar enfoques de género necesarios para mi formación tanto académica como personal.

A mis amigos de Cuernavaca: Agus, gracias por todo el apoyo y por enseñarme tantas cosas agradables de Cuernavaca. A Silvia, Lucía, Andrés y Pam por llenar de buenas pláticas, pilates y domino mis días.

Y por último a mi familia, por todo el apoyo, cariño y paciencia que me brindaron a lo largo de este camino, sin ustedes no tendría motor para seguir adelante, muchas gracias.

Resumen

Las comunidades microbianas son estructuras complejas que se definen de acuerdo a los organismos que las conforman, así como las interacciones que se dan entre dichos organismos y el medio ambiente en el que se encuentran. Las interacciones entre organismos se dan principalmente por el intercambio de metabolitos que favorecen o afectan el crecimiento de los integrantes. Existen muchos beneficios asociados a vivir en comunidad, principalmente la capacidad para responder a cambios ambientales como una función colectiva que no puede ser realizada por células individuales.

En este proyecto estudiamos el efecto que tienen los cambios ambientales (concentración de recursos limitantes) en el establecimiento de interacciones en un sistema con interdependencias metabólicas obligadas. Utilizando cepas de *Escherichia coli* con diferentes fenotipos auxótrofos a aminoácidos construimos una matriz de co-cultivos para la cual caracterizamos la dinámica de crecimiento en medio mínimo, posteriormente utilizando modelos de ecuaciones diferenciales simulamos el crecimiento de algunos co-cultivos en medio con diferentes concentraciones de aminoácidos y determinamos el perfil de interacción bajo diferentes condiciones.

Describimos como perfil de interacción al tipo de interacción presente entre los co-cultivos, la cual puede ser *cooperación* o *mutualismo* cuando la presencia de ambos integrantes favorecen el crecimiento del otro, *comensalismo* cuando solo uno de los integrantes beneficia al otro, *amensalismo* cuando uno de los integrantes afecta el crecimiento del otro y *competencia* cuando ambos integrantes compiten por un recurso limitante en el sistema que es importante para el crecimiento de ambos. Utilizando dos co-cultivos validamos experimentalmente que modificar las concentraciones de recursos limitantes en el medio es capaz de modificar las interacciones entre los integrantes del co-cultivo.

Además de los recursos limitantes, moléculas que causan estrés para los integrantes de una comunidad pueden modificar la dinámica de la misma, utilizando antibióticos medimos el efecto en la susceptibilidad de diferentes perfiles de interacción y encontramos que perfiles cooperativos son menos susceptibles al antibiótico, beneficiándose por la presencia de los mismos, lo que nos indica un *trade-off* entre el crecimiento y el establecimiento de una interacción; de manera semejante observamos que en aquellas condiciones donde se favorece un perfil competitivo hay una transición de competencia a cooperación en presencia de antibióticos teniendo un costo reflejado en la densidad celular.

Por último evaluamos el efecto de antibióticos en un sistema con cepas susceptibles y resistentes midiendo la susceptibilidad al antibiótico y la relación entre la abundancia de cada fenotipo asociada a diferentes perfiles y concentraciones de antibiótico.

Abstract

Microbial communities are complex structures that are defined by the organisms inside them, as well as the interactions between them and the surrounding environment. The interactions between organisms are mainly due to the exchange of metabolites that favor or affect the growth of the members. There are many benefits associated with living in a community, mainly the ability to respond to environmental changes as a collective function that cannot be performed by individual cells.

In this project we study the effect that environmental changes (concentration of limiting resources and fluctuations of such) have on the establishment of interactions in a system with obligate metabolic interdependencies. Using *Escherichia coli* strains with different amino acid auxotrophic phenotypes, we built a matrix of co-cultures, characterized their growth dynamics in minimal medium and using differential equation models, we simulated the growth of some co-cultures in medium with different concentrations of amino acids and determined the interaction profile under different conditions.

We describe as interaction profile the type of interaction present between the strains in the co-cultures, which can be *cooperation* or *mutualism* when the presence of both members favor the growth of the other, *commensalism* when only one of the members benefits the other, *amensalism* when one of the members affects the growth of the other and *competition* when both members compete for a limiting resource in the system that is important for the growth of both. Using two co-cultures, we validated experimentally that modifying the concentrations of limiting resources in the medium modifies the interactions between the members of the co-culture.

In addition to the limiting resources, molecules that cause stress to the community can modify its dynamics, using antibiotics we measured the effect on the susceptibility of different interaction profiles and we found that cooperative profiles are less susceptible to the antibiotic, benefiting by their presence, which indicates a *trade-off* between growth and the establishment of an interaction; Similarly, we observed that in those conditions where a competitive profile is favored by the environment, there is a transition from competition to cooperation in the presence of antibiotics, with a cost reflected in cell density.

Finally, we evaluated the effect of antibiotics in a system with susceptible and resistant strains by measuring antibiotic susceptibility and the relationship between the abundance of each phenotype associated with different interaction profiles and antibiotic concentrations.

Índice general

Agradecimientos	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
1 Introducción general	1
1.1 Comunidades microbianas en el contexto de la ecología microbiana	1
1.2 Interacciones a nivel metabólico	2
1.3 Comunidades bacterianas en el contexto de la resistencia a antibióticos	4
2 Co-cultivos auxótrofos con interdependencias metabólicas obligadas	7
2.1 Introducción	7
2.1.1 Comunidades sintéticas	7
2.2 Sistema experimental con cepas de <i>Escherichia coli</i>	8
2.3 Dinámica de crecimiento en medio sin aminoácidos	9
2.4 Dosis respuesta aminoácidos	12
2.5 Elección de co-cultivos	16
2.6 Crecimiento en sobrenadante de co-cultivos	19
3 Perfiles de interacción en sistemas mediados por cross-feeding.	22
3.1 Introducción	22
3.2 Simulación del crecimiento en medio con limitación de nutrientes, modelo proteómico	23
3.3 Modelado de la dinámica poblacional de un consocio con auxotrofías, modelo poblaciones	26
3.4 Validación experimental del crecimiento de co-cultivos en medio mínimo con aminoácidos.	29
3.5 Abundancia final de cada fenotipo en medio con gradiente de aminoácidos	33
3.6 Discusión	35
4 Susceptibilidad a antibióticos dependiente de los perfiles de interacción	37
4.1 Introducción	37
4.2 Susceptibilidad a antibióticos	37
4.3 Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio con Cloranfenicol	39
4.3.1 Porcentajes de inhibición en medio mínimo con cloranfenicol . .	39
4.3.2 Cambios en la abundancia relativa a las 24 horas de crecimiento en medio mínimo con Cloranfenicol	41
4.4 Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio mínimo con Ciprofloxacino	43
4.4.1 Porcentajes de inhibición en medio mínimo con Ciprofloxacino .	43
4.4.2 Cambios en la abundancia relativa a las 24 horas de crecimiento en medio M9 con Ciprofloxacino	47

4.5	Discusión	48
5	Cambios en la velocidad de crecimiento que modifican los perfiles de interacción	50
5.1	Introducción	50
5.2	Cinéticas de crecimiento	50
5.2.1	Cinética de crecimiento en medio mínimo con cloranfenicol	51
5.2.2	Cinética de crecimiento en medio mínimo con ciprofloxacino	53
5.3	Cambios en la velocidad de crecimiento asociados a los diferentes tratamientos de aminoácidos y antibióticos	55
5.3.1	Velocidad de crecimiento en medio mínimo con cloranfenicol	55
5.3.2	Velocidad de crecimiento en medio mínimo con ciprofloxacino	57
5.3.3	Curvas de crecimiento y velocidad de crecimiento en medio rico con ciprofloxacino	59
5.4	Discusión	62
6	Susceptibilidad a antibióticos en un sistema con bienes públicos	64
6.1	Introducción	64
6.2	Susceptibilidad a ampicilina	64
6.3	Bienes públicos en un sistema con cepas susceptibles y resistentes	70
6.4	Viabilidad versus abundancia de fenotipos	72
6.5	Discusión	74
7	Conclusiones y perspectivas	76
7.1	Elección de cepas y validación de fenotipos	78
7.2	Preparación de células para inoculación y preparación de microplacas	78
7.3	Dinámica de crecimiento en monocultivos	79
7.4	Crecimiento en sobrenadantes	79
7.5	Dosis respuesta de aminoácidos utilizando co-cultivos	80
7.6	Dosis respuesta a cloranfenicol y a ciprofloxacino	80
7.7	Cinéticas dosis respuesta a cloranfenicol y a ciprofloxacino	81
7.8	Dosis respuesta a ampicilina, monocultivos	81
7.9	Co-cultivo con cepas susceptibles y resistentes en presencia de ampicilina	82
7.10	Cuantificación de abundancias mediante citometría de flujo	82
7.11	Preparación de medios de cultivos y soluciones	83
7.11.1	Preparación de aminoácidos	84
7.11.2	Preparación de antibióticos	84
8	Material suplementario	86
8.1	Cepas y plásmidos	86
8.1.1	Cepario	86
8.1.2	Plásmidos utilizados	87
8.2	MS Capítulo 2: Descripción del sistema	88
8.2.1	Crecimiento co-cultivos en medio mínimo con diferentes concentraciones de glucosa	88

8.3	MS Capítulo 3: Perfiles de interacción en sistemas mediados por cross-feeding.	88
8.3.1	Parámetros modelo proteómico	88
8.3.2	Crecimiento de monocultivos en medio con aminoácidos, CB . . .	90
8.4	MS Capítulo 4: Susceptibilidad y perfiles de interacción	93
8.4.1	Densidad óptica de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta tyrA$ y el co-cultivo $\Delta leuB \& \Delta tyrA$ en medio mínimo con cloranfenicol . . .	94
8.4.2	Porcentajes de inhibición de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta tyrA$ y el co-cultivo $\Delta leuB \& \Delta tyrA$ en medio mínimo con cloranfenicol . . .	95
8.4.3	Densidad óptica de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta tyrA$ y el co-cultivo $\Delta leuB \& \Delta tyrA$ en medio mínimo con ciprofloxacino . . .	100
8.4.4	Porcentajes de inhibición de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta tyrA$ y el co-cultivo $\Delta leuB \& \Delta tyrA$ en medio mínimo con ciprofloxacino . . .	102
8.4.5	Densidad óptica de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta pheA$ y el co-cultivo $\Delta leuB \& \Delta pheA$ en medio mínimo con cloranfenicol . . .	106
8.4.6	Porcentajes de inhibición de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta pheA$ y el co-cultivo $\Delta leuB \& \Delta pheA$ en medio mínimo con cloranfenicol . . .	108
8.4.7	Densidad óptica de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta pheA$ y el co-cultivo $\Delta leuB \& \Delta pheA$ en medio mínimo con ciprofloxacino . . .	112
8.4.8	Porcentajes de inhibición de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta pheA$ y el co-cultivo $\Delta leuB \& \Delta pheA$ en medio mínimo con ciprofloxacino . . .	114
8.4.9	Análisis estadístico	118
8.5	MS Capítulo 5: Cambios en la velocidad de crecimiento que modifican los perfiles de interacción	126
8.5.1	Velocidad de crecimiento	126
8.5.2	Abundancia y viabilidad de fenotipos	129
8.6	MS Capítulo 6: Susceptibilidad a antibióticos en un sistema con bienes públicos	132
8.6.1	Densidad óptica y porcentaje de inhibición a las 17 horas	132
8.6.2	Conteo de colonias cultivo mixto con ampicilina.	134

Capítulo 1

Introducción general

1.1 Comunidades microbianas en el contexto de la ecología microbiana

Para los microorganismos como para otros seres vivos la capacidad de vivir en interacción con otros organismos en estructuras conocidas como comunidades, les otorga ventajas a corto y largo plazo, entre las cuales, se encuentran la capacidad de colonizar diversos ambientes complejos tales como la microbiota intestinal de diversos organismos o el suelo (Zengler and Zaramela (2018)). Gracias a esta capacidad de distribución, en la última década gran parte de los estudios relacionados a comunidades se han centrado en entender la relación entre los integrantes de una comunidad y su medio ambiente.

Cada comunidad se distingue por depender de su contexto ecológico, es decir su composición biológica (determinada por los organismos que la componen y la frecuencia de estos), los recursos presentes en el medio ambiente y en conjunto las interacciones entre los miembros de la comunidad y estos con su medio ambiente (Hoek et al. (2016); Sanchez-Gorostiaga et al. (2019)). Si bien pueden existir comunidades conformadas con la misma diversidad biológica, la frecuencia de sus integrantes y si estos dependen o no metabólicamente de los otros puede generar una dinámica diferente entre comunidades.

Herramientas como la metagenómica y la metabolómica nos han permitido estudiar a las comunidades microbianas naturales bajo un contexto ecológico específico, diversos estudios en comunidades presentes en el intestino, en el océano o en el suelo han demostrado que la funcionalidad de las comunidades depende de diversos aspectos como la diversidad y abundancia de especies y las funciones de las mismas.

Dentro de la diversidad de cada comunidad se observa que existe redundancia funcional, lo que permite que varios organismos sean capaces de realizar funciones que pueden ser esenciales para el funcionamiento global (Louca et al. (2018); Goldford et al. (2018)). La redundancia entre organismos es considerada solo si la especie puede ser reemplazada por otra capaz de realizar la misma función en determinada condición ambiental y con la misma eficiencia (Louca et al. (2018); Dal Co et al. (2019); Dal Bello et al. (2021a)), las fluctuaciones ambientales y los cambios en la velocidad de crecimiento y en abundancia de nutrientes favorecen dicha redundancia funcional, siendo así las comunidades con mayor abundancia de especies más productivas, teniendo como consecuencia especies que pueden tener roles esenciales para funcionalidad de la comunidad (Bell et al. (2005)).

La posibilidad de tener diferentes especies con las mismas habilidades funcionales permite que cada comunidad responda de una manera particular a la presencia de diferentes metabolitos, por lo tanto las fuentes de carbono y los recursos limitantes de

la misma juegan un papel importante en el establecimiento de especies foco dentro de la comunidad (Estrela et al. (2022a,b); Dal Bello et al. (2021b)), lo que a su vez permite que funciones específicas de la comunidad sean realizadas por diversos integrantes, esta habilidad es de gran importancia para sistemas sintéticos puesto que la distribuciones de funciones entre los integrantes de una comunidad permite la distribución de labores y un óptimo desarrollo de funciones específicas (Fritts et al. (2020)).

1.2 Interacciones a nivel metabólico

La estructura de las comunidades microbianas se ve afectada por los cambios ecológicos que permiten fluctuaciones en la diversidad y abundancia de las especies que conforman la comunidad (Sanchez-Gorostiaga et al. (2019); Johns et al. (2016)), estos cambios a nivel ecológico permiten entender el efecto que tiene el crecimiento individual sobre el resto de los integrantes (Niehaus et al. (2019)). Por lo tanto las fluctuaciones ambientales pueden favorecer distintos tipos de interacción entre los miembros de una comunidad (Rodríguez-Verdugo et al. (2019); Grilli (2020)).

Las interacciones pueden ser descritas de acuerdo al efecto que tiene cada integrante de la comunidad sobre el resto de la comunidad. Se ha observado que describir las interacciones a partir de pares permite predecir dinámicas más complejas (Friedman et al. (2017)) y que las interacciones a nivel metabólico permiten describir distintos escenarios. Las interacciones tipo intercambio metabólico (*cross-feeding*) se dan en aquellos medios ambientes donde un integrante de la comunidad es capaz de producir un metabolito que puede ser utilizado como fuente energía o nutriente por otro miembro de la comunidad (Germerodt et al. (2016); Goldschmidt et al. (2018); Hoek et al. (2016)). Este tipo de interacción también engloba a aquellos escenarios donde un grupo de la comunidad provee de movilidad, nutrición o protección al resto de la comunidad (Yurtsev et al. (2016)).

La naturaleza de las interacciones (positiva, negativa o neutra) se describe a partir del efecto por pares. En la Figura 1.1 se describe la direccionalidad de las interacciones donde las interacciones tipo *cooperación* o *mutualismo* se dan cuando ambos integrantes tienen un efecto positivo sobre el otro (**A**), las interacciones tipo *competencia* se dan cuando ambos integrantes compiten por un recurso limitante para su crecimiento (**D**), las interacciones donde solo uno de los integrantes tiene efecto sobre el otro se conocen como *comensalismo* cuando el efecto es positivo (**B**) y *amensalismo* cuando el efecto es negativo (**E**), aquellas donde un integrante tiene efecto positivo sobre el otro mientras que el segundo tiene un efecto negativo se conocen como depredación o parasitismo (**C**), por último existen los escenarios donde ninguno de los integrantes del par interactúa con el otro (**F**).

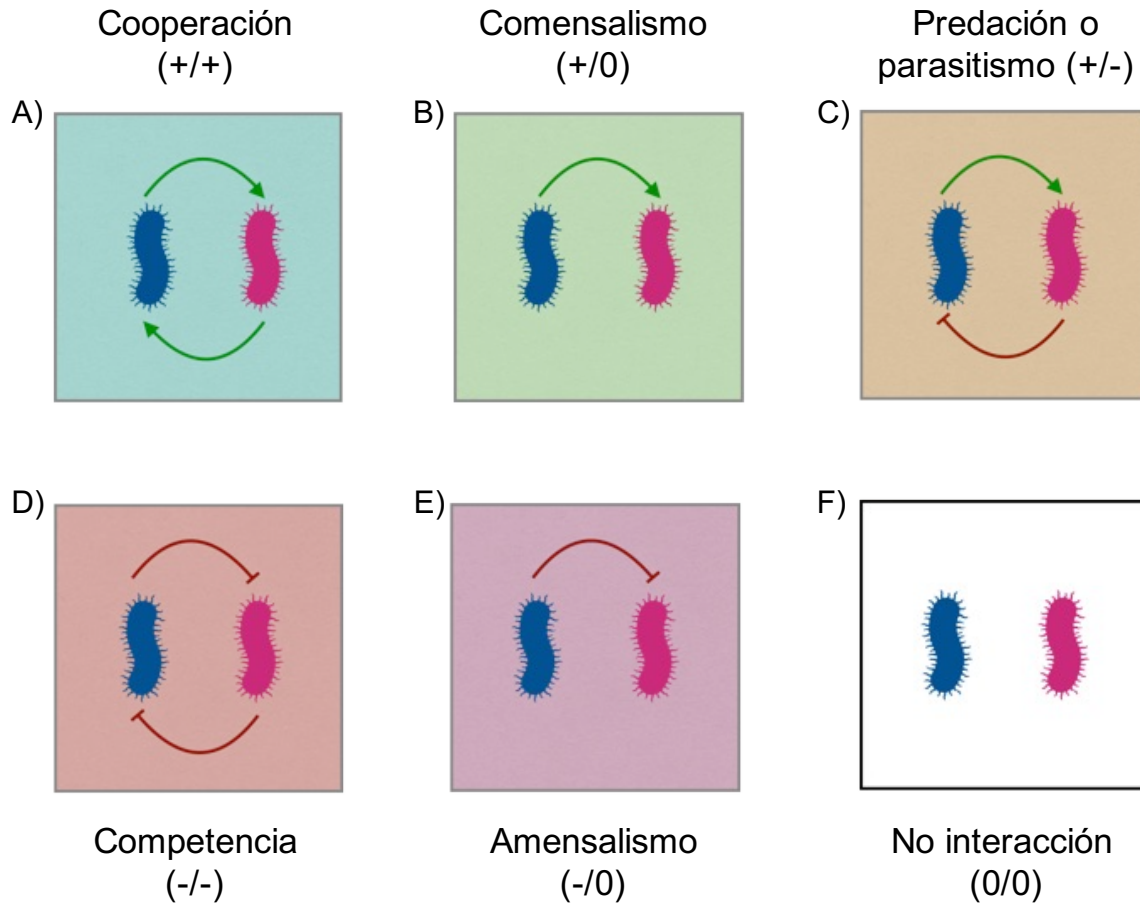


Figura 1.1: *Tipos de interacciones por pares*

La fuerza de dichas interacciones puede medirse a partir de la habilidad para sobrevivir a las fluctuaciones ambientales que pueden tener un efecto en la disponibilidad de los recursos metabólicos necesarios para establecer dicha interacción. La presencia de fenotipos capaces de secretar metabolitos al medio para que estos sean utilizados como nutrientes por el resto de la comunidad da robustez a la misma ante situaciones de estrés y fuertes fluctuaciones ambientales (Cavaliere et al. (2017); Rauch et al. (2017); Oña and Kost (2020)), por lo tanto los cambios en la composición nutricional puede favorecer escenarios en donde uno o más especies en coexistencia puedan ser llevadas a la extinción (Herren (2020); Amarnath et al. (2021)). Estudios en sistemas con *cross-feeding* obligado han demostrado que cambios abruptos en el medio ambiente favorecen la extinción de uno de los integrantes modificando las interacciones entre los mismos (Hammarlund et al. (2019)), por lo tanto, la estabilidad de la comunidad depende del reacomodo en abundancia e interacciones en respuesta a la perturbación (Niehaus et al. (2019)).

En espacios con mayor diversidad de especies se puede incrementar el número de nichos así como la posibilidad de un mayor número de interacciones metabólicas debido a una mayor diversidad de genes (Madi et al. (2020)). En comunidades naturales se

ha observado que la coexistencia entre especies es mediada por la estructura espacial. La estructura espacial permite que las distancias entre los miembros de la comunidad así como el movimiento permitan cambios en la distribución de las especies y de los metabolitos. La llegada de nuevos miembros puede favorecer la presencia de nuevas interacciones (Albright and Martiny (2018)), sin embargo el número de especies coexistiendo no puede exceder al número de recursos limitantes de la comunidad (Louca et al. (2018)).

En los últimos años diversos grupos se han enfocado en estudiar la importancia de la diversidad para el ensamblaje de comunidades capaces de coexistir por determinado tiempo y han encontrado que el medio ambiente es determinante para el establecimiento de interacciones; y que estas sufrirán modificaciones a lo largo del establecimiento de la comunidad; siendo más comunes las interacciones de tipo cooperación y sinergismos las cuáles dependen de las necesidades de uso y costo energético en la producción de los metabolitos requeridos dentro de la comunidad (Mee et al. (2014)).

1.3 Comunidades bacterianas en el contexto de la resistencia a antibióticos

Los antibióticos son metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias. Se utilizan principalmente como tratamientos para eliminar infecciones producidas por bacterias patógenas, como agentes preventivos de infecciones tanto en la industria alimentaria, ganadera y hospitalaria. Son naturalmente producidos por diferentes organismos como plantas, hongos e incluso bacterias, por lo tanto pueden ser encontrados en medios ambientes como suelo y agua, sin embargo las concentraciones a las cuales se encuentran en la naturaleza no siempre son necesariamente suficientes para causar inhibición en dichos sistemas.

Pocos años después del descubrimiento de la ampicilina, en 1928 por Alexander Flemming, se reportó la presencia de cepas bacterianas capaces de crecer en medio con antibiótico las cuales habían desarrollado un mecanismo que les confería resistencia al antibiótico. El uso desmedido de los mismos se ha favorecido la aparición de mecanismos y genes que confieren resistencia haciéndolos cada vez menos eficientes contra infecciones bacterianas.

En las últimas décadas el aumento en el número de organismos patógenos, la poca eficiencia de los antibióticos y la aparición de cepas con múltiples resistencias ha convertido a la resistencia a antibióticos en un problema de salud mundial, sin embargo poco se sabe del efecto que tienen estos metabolitos en un contexto fuera de la clínica y si es que las trazas de los mismos afectan o benefician a las bacterias que de manera natural no coexistían en un ambiente con antibióticos. A partir de estudios enfocados en conocer la composición metabólica de diversos nichos ecológicos sabemos que existen concentraciones de antibióticos en comunidades naturales (Thomashow (2002)), generalmente en dosis sub-inhedoras y se ha propuesto que estas dosis pueden

ser utilizadas como moléculas que permiten modular la composición de comunidades naturales favoreciendo algún tipo específico de interacción (Chacón and Harcombe (2016); Gerardin et al. (2016)).

La resistencia a antibióticos ha sido ampliamente estudiada a nivel de poblaciones o monocultivos, sin embargo poco se sabe del efecto de estas moléculas en estructuras complejas como las comunidades donde las interacciones entre los diferentes integrantes pueden jugar un papel importante en la respuesta a estreses ambientales como la presencia de antibióticos en el medio ambiente o cambios físicos como pH o temperatura. Estudios con comunidades sintéticas han encontrado un trade-off entre la susceptibilidad a antibióticos y las interacciones entre sus integrantes, donde en condiciones de cooperación la susceptibilidad de la comunidad disminuye al nivel de resistencia de la cepa más susceptible, en cambio en medios ambientes con todos los metabolitos limitantes del sistema cada integrante es capaz de formar un nicho y las cepas sensibles son excluidas, así como las interacciones de cooperación (Adamowicz et al. (2018)).

La susceptibilidad a antibióticos se mide desde la concentración más baja requerida para inhibir el crecimiento (Concentración mínima inhibitoria, MIC) y es específica para cada fenotipo bacteriano (inclusive bacterias de la misma especie pueden tener diferentes niveles de resistencia), por lo tanto se espera que dentro de las comunidades cada integrante presente un nivel de resistencia diferente, el cual puede afectar o beneficiar la respuesta colectiva ante ambientes con antibiótico.

Se sabe además que existen sub-poblaciones capaces de tolerar la presencia de antibióticos en el ambiente, o ser persistentes, es decir son capaces de sobrevivir temporalmente a la presencia de determinadas concentraciones de antibiótico entrando en un estado de inactividad metabólica (Bottery et al. (2021, 2022)). La importancia de entender el rol que juegan estas moléculas fuera de las infecciones es crucial puesto que pueden ser factores que cambien la dinámica de la comunidad protegiendo a fenotipos patógenos o favoreciendo la presencia de los mismos (Estrela and Brown (2018)).

Se ha descrito que las comunidades bacterianas pueden sobrevivir a la presencia de antibióticos utilizando tres estrategias diferentes: 1) *Resistencia colectiva*, donde las interacciones favorecen la resistencia al antibiótico aumentando la MIC de la comunidad; 2) *Tolerancia colectiva*, donde las interacciones alteran el estado de la célula disminuyendo la tasa de muerte sin incremento en la MIC de la comunidad y 3) *Protección a exposiciones* donde se protege a los fenotipos susceptibles degradando el antibiótico del medio (Vega and Gore (2014); Meredith et al. (2015)).

Vivir en comunidad implica modificaciones en la tasa de crecimiento de las especies debido a la presencia de otros fenotipos, sin embargo la presencia de diversos organismos dentro del mismo espacio favorece el establecimiento de interacciones tipo cooperativas. Si dentro de la comunidad hay fenotipos resistentes a antibióticos se pueden establecer este tipo de interacciones beneficiando a una o más especies susceptibles si los mecanismos de resistencia favorecen la degradación del antibiótico de manera global. En cambio, si la resistencia solo favorece a la cepa que contiene dichos genes se puede seleccionar la competencia como perfil de interacción (Frost et al. (2018)).

Comunidades bacterianas en el contexto de la resistencia a antibióticos

En este proyecto proponemos que las concentraciones sub-inhedorias de antibióticos funcionan como moduladores de interacciones, favoreciendo las transiciones de un tipo de interacción a otro en conjunto con las condiciones ambientales (recursos y abundancia de fenotipos).

Capítulo 2

Co-cultivos auxótrofos con interdependencias metabólicas obligadas

2.1 Introducción

2.1.1 Comunidades sintéticas

Los sistemas sintéticos han sido utilizados para estudiar preguntas relacionadas con la coexistencia de especies viviendo en el mismo espacio físico (Fritts et al. (2020)), la robustez de dicha coexistencia y la naturaleza de las interacciones entre los miembros de la misma; desde la perspectiva de interacciones tipo *cross-feeding*. Una de las interacciones ampliamente estudiada es el *mutualismo* en sistemas con poblaciones productoras de metabolitos y poblaciones con requerimientos metabólicos específicos (Friedman et al. (2017); Goldschmidt et al. (2018)). Existen interacciones metabólicas obligadas en muchos sistemas naturales, cuando la ruta metabólica está ausente o es interrumpida por la ausencia de un gen. A los fenotipos con la ausencia de determinados genes se les denomina auxótrofos, dichos fenotipos pueden crecer solo en medios suplementados con los metabolitos a los que se presenta la auxotrofia. Sistemas basados en fenotipos con auxotrofías han sido usados ampliamente como sistemas sintéticos, por ejemplo, en 2016 Hoek et al. utilizaron un sistema sintético con dos cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* con auxotrofia a los aminoácidos leucina y triptófano (respectivamente) y demostraron que es posible cambiar de interacciones tipo cooperación a parasitismo y competencia dependiendo de las condiciones ambientales (Hoek et al. (2016)).

Diversos estudios han demostrado que las interacciones se vuelven más cooperativas en ambientes con limitación de recursos cuando se favorece la producción y secreción de recursos que pueden ser intercambiados, disminuyendo así la inversión en su producción (Pacheco et al. (2019)). Por otro lado, en ambientes con alta concentración de recursos se observa mayor fluctuación de los mismos; lo que favorece la competencia. Las comunidades con dos integrantes en interacción metabólica son capaces de alcanzar estados estables si la especie con menor velocidad de crecimiento limita el crecimiento de la especie con mayor velocidad, en cambio, si las especies con mayor velocidad de crecimiento no son limitadas pueden llevar a la comunidad a un colapso (Chen et al. (2014)).

2.2 Sistema experimental con cepas de *Escherichia coli*

Proponemos un sistema sintético con interdependencias metabólicas compuesto por nueve cepas de *Escherichia coli* provenientes de la colección Keio (Baba et al. (2006)), cada cepa con una delección a genes involucrados en diversas rutas de biosíntesis a aminoácidos (métodos 7.1). Dichas delecciones confieren fenotipos auxótrofos a los siguientes aminoácidos esenciales: Fenilalanina (*F*), Glicina (*G*), Histidina (*H*), Isoleucina (*I*), Leucina (*L*), Metionina (*M*), Treonina (*T*), Triptófano (*W*) y Tirosina (*Y*). La presencia de cepas con auxotrofia a aminoácidos es relevante para el establecimiento de interacciones en comunidades complejas (Zengler and Zaramela (2018)).

Para establecer dicho sistema, evaluamos las interacciones por pares, para lo cual de manera general llamaremos *B_x* y *B_y* a las cepas que conformen cada par. Caracterizamos el crecimiento de los pares utilizando un medio de cultivo con limitación de recursos (medio mínimo sin aminoácidos), en el cuál es esencial el intercambio de metabolitos entre los integrantes del sistema, favoreciendo así el crecimiento de ambas cepas mediante una interacción tipo cross-feeding. Por lo tanto, para que el sistema funcione se requiere que la cepa *B_y* sea capaz de producir el metabolito *X* (aminoácido que compensa la auxotrofia de la cepa *B_x*) y a su vez que *B_x* sea capaz de producir el metabolito *Y* (que compensa la auxotrofia de la cepa *B_y*). En la Figura 2.1 representamos el cross-feeding del sistema, además de un segundo recurso, una fuente de carbono (*S*) consumida por ambas cepas.

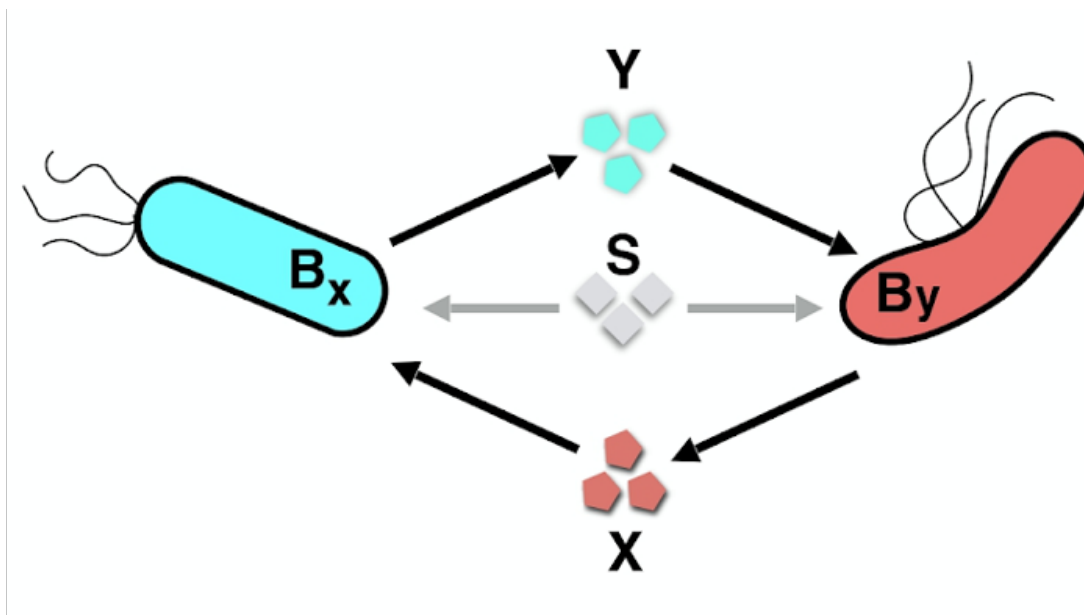


Figura 2.1: *Representación del sistema de cross-feeding*. La cepa auxótrofa a *Y* se representa en rojo y la cepa auxótrofa a *X* en azul, así como los aminoácidos que secretan, los rombos grises representan la fuente de carbono, glucosa (*S*).

2.3 Dinámica de crecimiento en medio sin aminoácidos

Para determinar las dinámicas de crecimiento de las cepas en co-cultivo combinamos las 9 cepas de *E. coli* ($\Delta pheA$, $\Delta glyA$, $\Delta hisB$, $\Delta ilvA$, $\Delta leuB$, $\Delta metA$, $\Delta thrC$, $\Delta trpC$ & $\Delta tyrA$) en 11 diferentes frecuencias iniciales. Midiendo la densidad óptica a las 48 horas de crecimiento en medio mínimo M9 sin aminoácidos determinamos la dinámica de interacción de cada co-cultivo (Figura 2.2). Reconstruyendo curvas de OD final en cada frecuencia podemos describir los siguientes posibles escenarios:

1. Ambas cepas producen el aminoácido que compensa la auxotrofia de la otra cepa, la producción es en concentraciones suficientes para ambos fenotipos, por lo tanto en la dinámica existe una combinación de frecuencias en la cual ambas cepas pueden cubrir con dichas necesidades metabólicas, en estos casos la dinámica presenta una concavidad positiva (ej: Co-cultivos $\Delta hisB$ & $\Delta pheA$ o $\Delta ilvA$ & $\Delta pheA$ Figura 2.2).
2. No existe un punto dentro de las frecuencias utilizadas donde se observe un máximo de crecimiento, por lo tanto las concentraciones de aminoácidos presentes en el medio no son las suficientes para cubrir la necesidad de ambas cepas, esto puede ser debido a que una o ambas no producen la concentración suficiente (ej: Co-cultivos $\Delta metA$ & $\Delta leuB$ o $\Delta tyrA$ & $\Delta ilvA$ Figura 2.2).

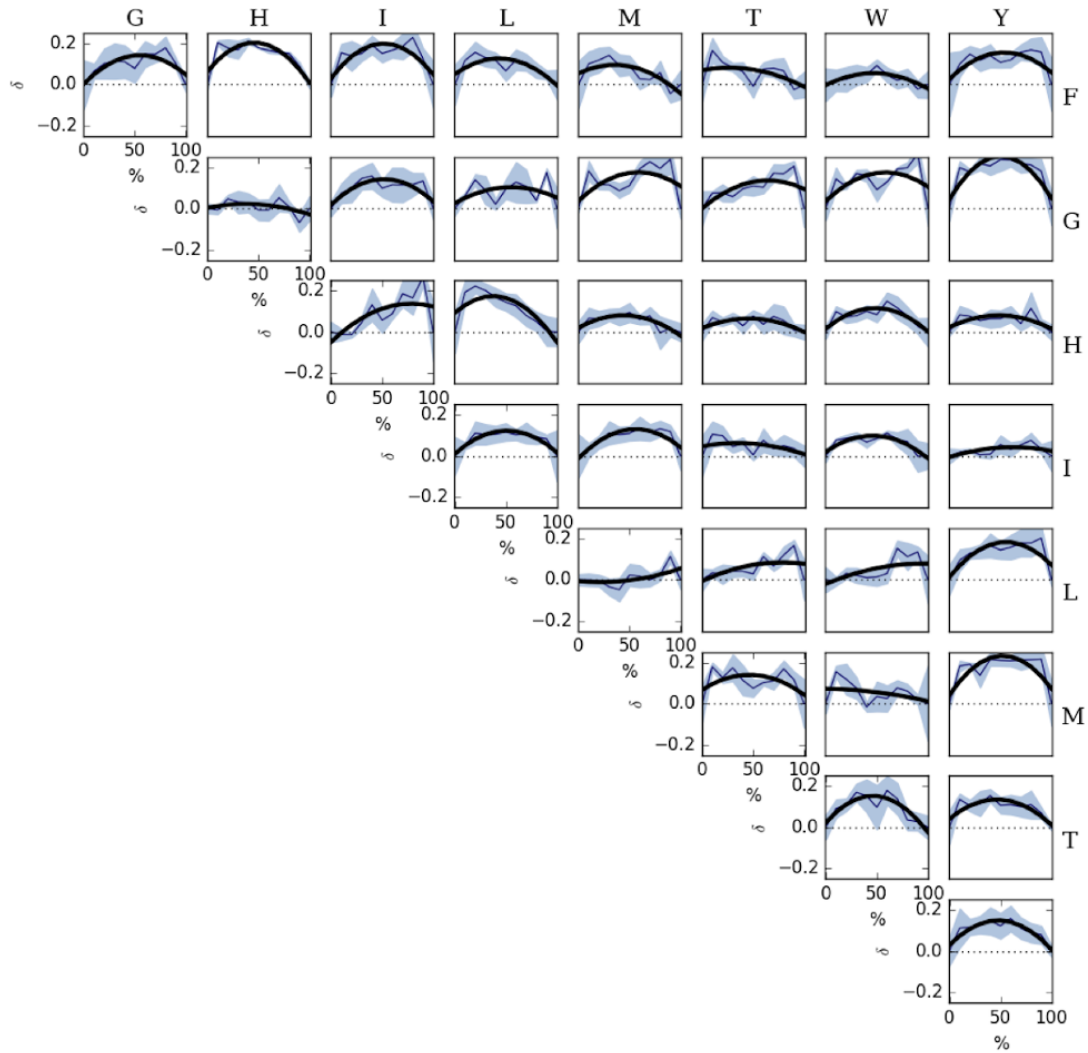


Figura 2.2: Caracterización del crecimiento de interacciones por pares. Cada cuadro representa el crecimiento en medio mínimo sin aminoácidos de cada uno de los 36 co-cultivos evaluados a las 11 diferentes frecuencias iniciales, la línea negra representa el promedio de las réplicas y el fondo azul la OD₆₃₀ de las réplicas (N=4), Figura modificada de Reyes-González et al. (2022).

Los co-cultivos con una dinámica cóncava positiva los consideramos como consorcios con interacciones positivas entre sus integrantes (ej. $\Delta pheA$ & $\Delta ilvA$, $\Delta hisB$ & $\Delta trpC$, $\Delta ilvA$ & $\Delta metA$ y $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$), en cambio en los co-cultivos con una dinámica plana, la interacción puede ser nula o de competencia ($\Delta ilvA$ & $\Delta tyrA$ y

$\Delta leuB$ & $\Delta metA$). El rango de frecuencias iniciales utilizadas en cada co-cultivo permite encontrar puntos óptimos específicos de cada par, es decir, el punto en el cual la abundancia de cada fenotipo permite que las condiciones ambientales sean favorables para ambas cepas, en la figura 2.3 (A) observamos la frecuencia de mayor densidad óptica para todos los co-cultivos.

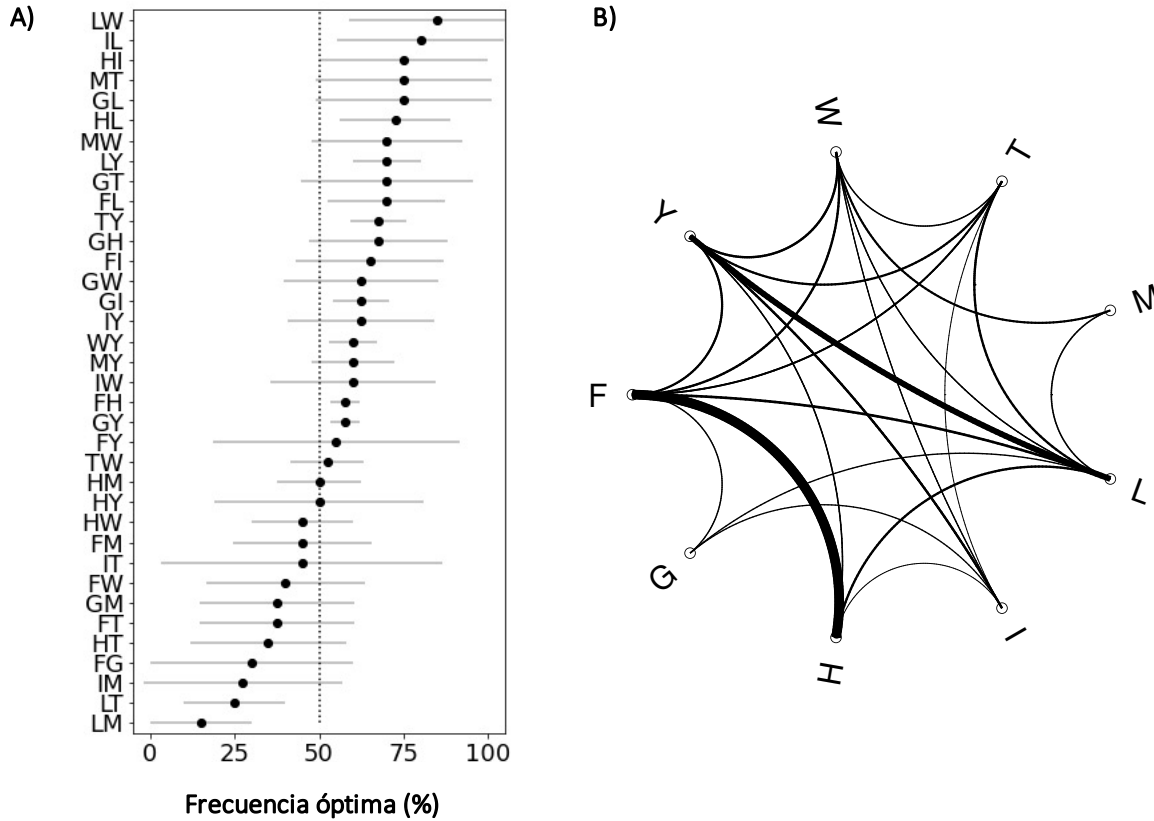


Figura 2.3: *Frecuencia óptima y alfa de co-cultivos en medio sin aminoácidos.* **A)** Frecuencia inicial óptima de cada co-cultivo, cada punto representa la frecuencia inicial a la cual se maximiza la densidad óptica en medio mínimo sin aminoácidos, las barras de error representan la desviación estándar (N=4), y **B)** Red de interacciones por pares, cada nodo representa la fuerza de la interacción (la auxotrofia de cada cepa esta representada con el código de una letra para aminoácidos), solo se muestran los nodos con una alfa mayor al promedio (N=4), los valores de alfa se resumen en la Tabla 2.1, Figura modificada de Reyes-González et al. (2022).

En la Tabla 2.1 se compara la densidad óptica alcanzada entre el promedio de los monocultivos, la densidad óptica del co-cultivo (frecuencias iguales), la diferencia entre densidades ópticas (ΔOD_{630}) que nos indica que tan positiva o negativa es la interacción de cada co-cultivo y α del ajuste cuadrático realizado a los puntos experimentales ($\alpha x^2 + \beta x$), los valores de α más altos indicarán una concavidad positiva mayor, por lo tanto mayor interacción entre las cepas.

2.4 Dosis respuesta aminoácidos

Para validar los resultados sobre los recursos limitantes de nuestro sistema comparamos el crecimiento de dos cepas ($\Delta ilvA$ y $\Delta tyrA$) en medio mínimo con aminoácidos y glucosa, realizamos curvas dosis respuesta utilizando el aminoácido que compensa la auxotrofia de cada cepa en un rango de concentraciones que va 0 a 4 veces la concentración mínima estimada para cada aminoácido (estimación obtenida del modelo iML1515), y evaluamos las 17 concentraciones de aminoácidos en 3 condiciones diferentes de glucosa, 2, 4 y 6 g/l. En las Figuras (2.4 y 2.5) podemos observar el crecimiento de las cepas $\Delta ilvA$ y $\Delta tyrA$, respectivamente.

En ambas cepas observamos un aumento en la densidad óptica que se correlaciona con la concentración de aminoácido presente en el medio. Para las concentraciones altas de aminoácidos (concentraciones arriba de la concentración basal necesaria de cada aminoácido, Métodos 7.3), las densidades ópticas son muy parecidas, esto se debe a que al parecer se sobrepasó la cantidad de aminoácido que la cepa es capaz de metabolizar. Con estas concentraciones altas se cubrió la concentración necesaria para todos los procesos metabólicos que involucran dicho aminoácido. En el caso de la cepa $\Delta ilvA$ la diferencia de crecimiento entre las concentraciones de glucosa no es significativo, en cambio para la cepa $\Delta tyrA$ a bajas concentraciones de aminoácido el crecimiento es mejor en 2 g/l de glucosa. Con este resultado podemos saber que el recurso limitante del crecimiento de las cepas es el aminoácido.

Dosis respuesta aminoácidos

<i>ID</i>	<i>Cepas</i>	<i>Promedio OD₆₃₀</i> <i>(monocultivos)</i>	<i>Promedio OD₆₃₀</i> <i>(50-50)</i>	ΔOD_{630}	α	R^2
FG	$\Delta pheA$ & $\Delta glyA$	0.4627	0.5417	0.079	0.39273	0.62
FH	$\Delta pheA$ & $\Delta hisB$	0.77335	0.952	0.17865	0.69142	0.759
FI	$\Delta pheA$ & $\Delta ilvA$	0.4064	0.5573	0.1509	0.351	0.666
FL	$\Delta pheA$ & $\Delta leuB$	0.473	0.54	0.067	0.35761	0.749
FM	$\Delta pheA$ & $\Delta metA$	0.466	0.56	0.094	0.39667	0.402
FT	$\Delta pheA$ & $\Delta thrC$	0.49315	0.4858	-0.00735	0.44008	0.100
FW	$\Delta pheA$ & $\Delta trpC$	0.52855	0.6215	0.09295	0.4694	0.750
FY	$\Delta pheA$ & $\Delta tyrA$	0.4615	0.57	0.1085	0.46357	0.585
GH	$\Delta glyA$ & $\Delta hisB$	0.4337	0.4263	-0.0074	0.29576	0.573
GI	$\Delta glyA$ & $\Delta ilvA$	0.44935	0.5477	0.09835	0.36992	0.708
GL	$\Delta glyA$ & $\Delta leuB$	0.4315	0.525	0.0935	0.35719	0.285
GM	$\Delta glyA$ & $\Delta metA$	0.3605	0.471	0.1105	0.39148	0.290
GW	$\Delta glyA$ & $\Delta trpC$	0.3821	0.4733	0.0912	0.35986	0.190
GY	$\Delta glyA$ & $\Delta tyrA$	0.37035	0.6073	0.23695	0.30094	0.796
GT	$\Delta glyA$ & $\Delta thrC$	0.36575	0.475	0.10925	0.29148	0.413
HI	$\Delta hisB$ & $\Delta ilvA$	0.4185	0.477	0.0585	0.4071	0.190
HL	$\Delta hisB$ & $\Delta leuB$	0.4274	0.573	0.1456	0.34599	0.748
HM	$\Delta hisB$ & $\Delta metA$	0.47265	0.5682	0.09555	0.39923	0.681
HT	$\Delta hisB$ & $\Delta thrC$	0.463	0.5415	0.0785	0.39782	0.494
HW	$\Delta hisB$ & $\Delta trpC$	0.44285	0.5277	0.08485	0.39261	0.730
HY	$\Delta hisB$ & $\Delta tyrA$	0.483	0.5495	0.0665	0.41851	0.414
IL	$\Delta ilvA$ & $\Delta leuB$	0.43685	0.5525	0.11565	0.40002	0.886
IM	$\Delta ilvA$ & $\Delta metA$	0.4559	0.5657	0.1098	0.43427	0.778
IT	$\Delta ilvA$ & $\Delta thrC$	0.4489	0.4547	0.0058	0.46806	0.149
IW	$\Delta ilvA$ & $\Delta trpC$	0.4905	0.5755	0.085	0.40843	0.764
IY	$\Delta ilvA$ & $\Delta tyrA$	0.53095	0.587	0.05605	0.46823	0.276
LM	$\Delta leuB$ & $\Delta metA$	0.44635	0.4697	0.02335	0.43427	0.422
LT	$\Delta leuB$ & $\Delta thrC$	0.4596	0.4883	0.0287	0.46806	0.416
LW	$\Delta leuB$ & $\Delta trpC$	0.46885	0.4828	0.01395	0.4099	0.416
LY	$\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$	0.57085	0.715	0.14415	0.45674	0.765
MT	$\Delta metA$ & $\Delta thrC$	0.3871	0.4613	0.0742	0.32419	0.379
MW	$\Delta metA$ & $\Delta trpC$	0.4221	0.4565	0.0344	0.31137	0.506
MY	$\Delta metA$ & $\Delta tyrA$	0.365	0.5745	0.2095	0.28458	0.687
TW	$\Delta thrC$ & $\Delta trpC$	0.4894	0.5862	0.0968	0.38874	0.778
TY	$\Delta thrC$ & $\Delta tyrA$	0.45825	0.5655	0.10725	0.34843	0.802
WY	$\Delta trpC$ & $\Delta tyrA$	0.47215	0.5945	0.12235	0.35519	0.035

Cuadro 2.1: Perfiles de interacción obtenidos a partir de interacciones por pares de cepas auxótrofas de *E. coli*

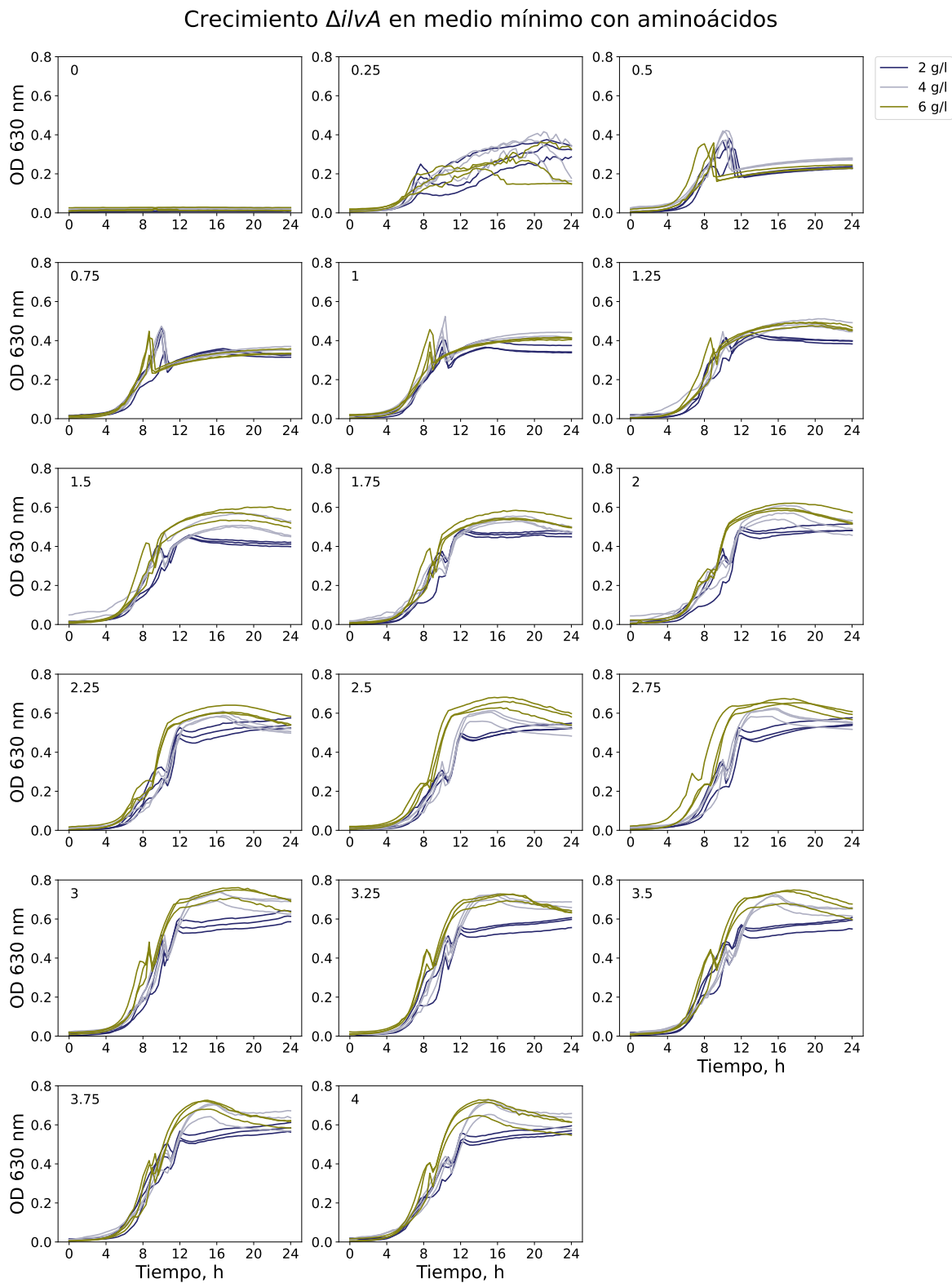


Figura 2.4: *Cinéticas de crecimiento en dosis respuesta a isoleucina. Cepa $\Delta ilvA$ en medio mínimo con 2, 4 y 6 g/l de glucosa. El color azul representa las réplicas con 2 g/l, el gris en 4 g/l y el verde 6 g/l de glucosa, cada cuadro representa una concentración específica de isoleucina, siendo 1 la concentración basal (10.9 g/l) . N=3 para cada condición.*

Crecimiento $\Delta tyrA$ en medio mínimo con aminoácidos

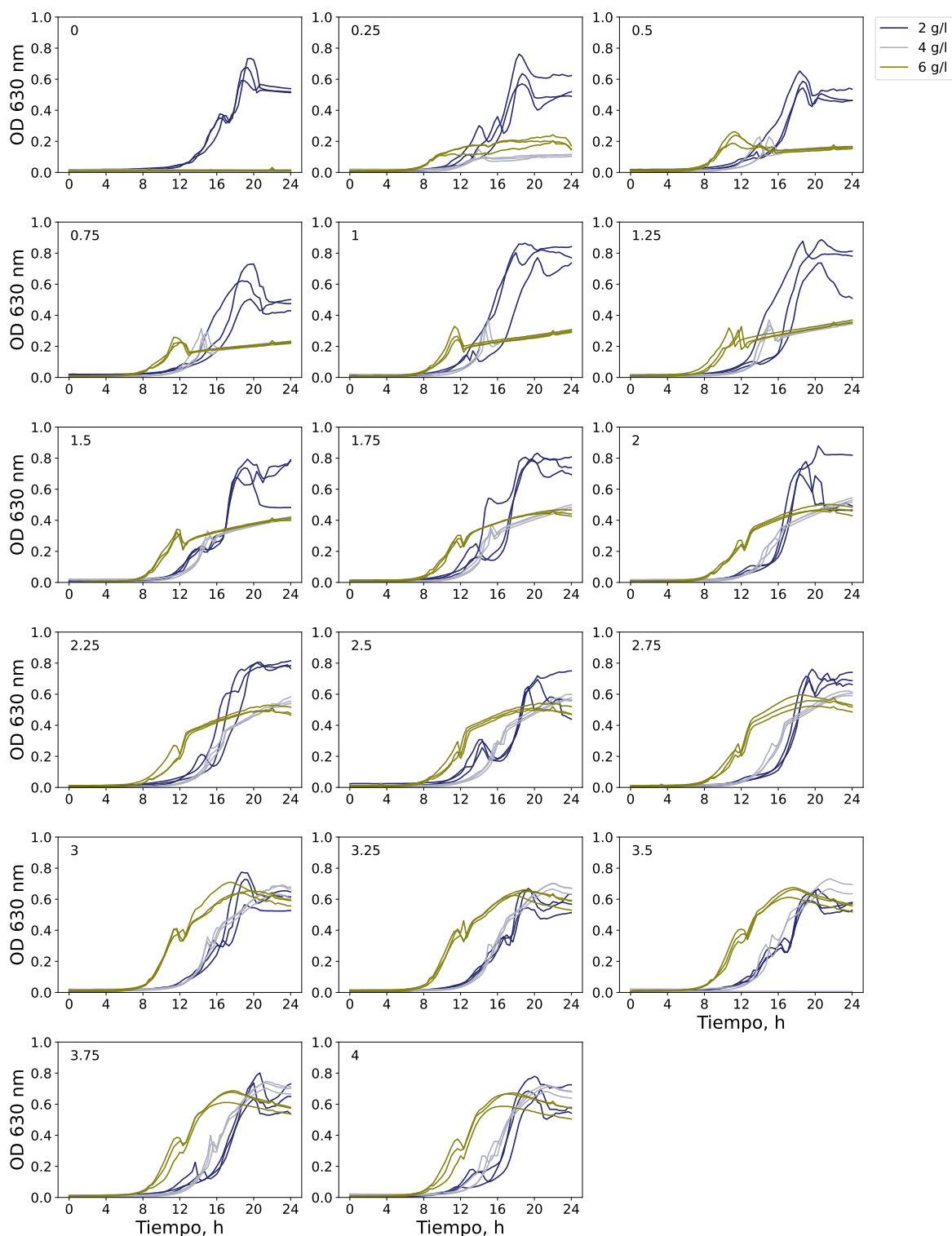


Figura 2.5: Cinéticas de crecimiento en dosis respuesta a tirosina. Cepa $\Delta tyrA$ en medio mínimo con 2, 4 y 6 g/l de glucosa. El color azul representa las réplicas con 2 g/l, el gris en 4 g/l y el verde 6 g/l de glucosa, cada cuadro representa una concentración específica de tirosina, siendo 1 la concentración basal (7.15 g/l) . N=3 para cada condición.

2.5 Elección de co-cultivos

Posterior a validar que el principal recurso limitante de nuestro sistema son los aminoácidos, elegimos los co-cultivos $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$, $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ y $\Delta tyrA$ & $\Delta ilvA$ con el fin de evaluar el efecto de los aminoácidos en el establecimiento de diferentes perfiles de interacción. Los co-cultivos elegidos tienen diferentes dinámicas de crecimiento en medio sin aminoácidos y a su vez la naturaleza, el costo de producción en cuanto a moléculas de glucosa necesarias (Kaleta et al. (2013)) y la tasa de uso de los aminoácidos es diferente para cada una de las auxotrofías.

Para diferenciar entre fenotipos dentro del co-cultivo transformamos las cepas con un plásmido que contiene la proteína fluorescente mCherry o eCyan (Métodos 7.1), y posteriormente evaluamos el costo de los plásmidos comparando el crecimiento de la cepa sin fluorescencia y con ambas fluorescencias (por separado) en una dosis respuesta al aminoácido que compensa su auxotrofia (Métodos 7.1 y 7.3).

En la Figura 2.6 observamos la densidad óptica (OD_{630nm}) alcanzada a las 24 horas en cada una de las concentraciones utilizadas, representando en amarillo las cepas con fluorescencia en mCherry, en azul las cepas con fluorescencia en eCyan y en gris las cepas sin fluorescencia, los promedios para cada cepa están representados en líneas punteadas del color correspondiente. Para los casos de $\Delta ilvA$ y $\Delta pheA$ en concentraciones de aminoácidos mayores a la mínima necesaria (concentración basal de cada aminoácido Métodos: 7.3) las cepas con fluorescencia en mCherry alcanzan una densidad óptica mayor, mientras que para los monocultivos de $\Delta leuB$ y $\Delta tyrA$ hay un decremento en la densidad óptica a partir de 2 veces la concentración mínima de aminoácido. En el caso de la cepa con auxotrofia a leucina ($\Delta leuB$) este decremento puede estar asociado a una limitación en el transporte e intercambio de aminoácidos previamente descrito a niveles tóxicos del aminoácido (Quay et al. (1977)).

Posterior a la caracterización de monocultivos en diferentes concentraciones de glucosa, evaluamos la diferencia en crecimiento de los co-cultivos $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ y $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio mínimo sin aminoácidos y en medio mínimo con altas concentraciones de ambos aminoácidos (3 veces la concentración mínima) utilizando 3 concentraciones de glucosa: 2, 4 y 6 g/L. En la Figura 2.7 podemos observar el promedio de la densidad óptica final en cada una de las condiciones para ambos co-cultivos (valores de densidad óptica se resumen en la Tabla: 8.3). Ambos tratamientos fueron significativos entre medio M9 sin aminoácidos y medio con aminoácidos (p-value < 0,001 co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ y p-value < 0,001 co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$; Welch Two Sample t-test) y no significativo entre tratamientos de glucosa (p-value > 0,01 para el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ y p-value > 0,001 para el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$; Wilcoxon rank sum test). Este experimento valida que el recurso limitante para el crecimiento son los aminoácidos y que la concentración de los mismos puede favorecer un aumento en la densidad óptica final de los co-cultivos.

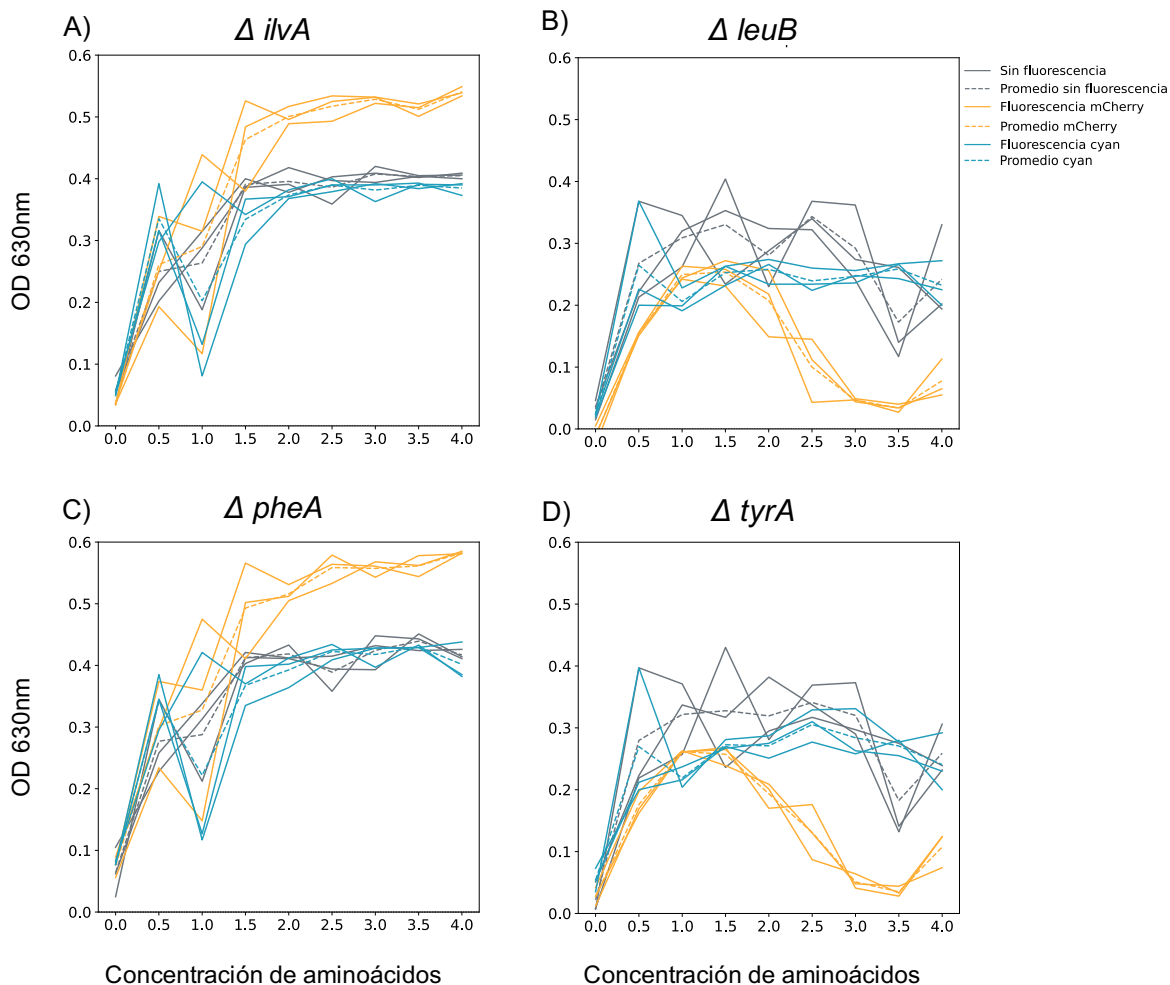


Figura 2.6: *Densidad óptica final de cepas con y sin fluorescencia.* **A)** cepa $\Delta ilvA$, **B)** cepa $\Delta leuB$, **C)** cepa $\Delta pheA$ y **D)** cepa $\Delta tyrA$. En azul se representa a las cepas con la proteína fluorescente ecyan, en amarillo a las cepas con la proteína mCherry y en gris a las cepas sin proteínas fluorescentes, las líneas punteadas representan el promedio y las líneas sólidas representan las réplicas de cada cepa bajo cada concentración de aminoácidos, 1 representa la concentración basal de cada aminoácido (N=3).

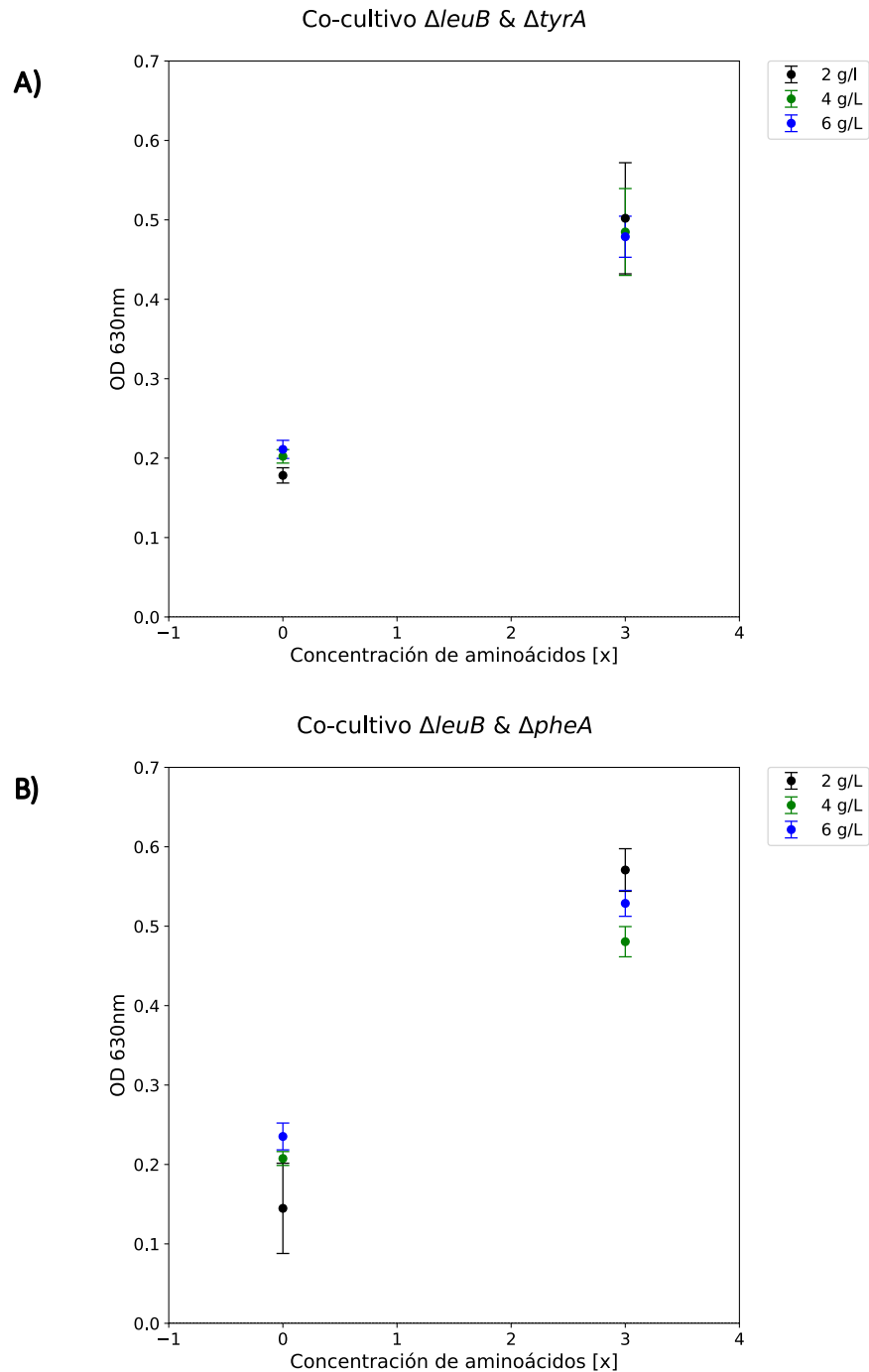


Figura 2.7: Densidad óptica final de co-cultivos en medio mínimo con aminoácidos y glucosa. **A)** $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ y **A)** $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio mínimo M9 sin aminoácidos y con alta concentración de cada aminoácido (3 veces la concentración basal) y glucosa a 2 g/L (negro), 4 g/L (verde) y 6 g/L (azul), cada punto representa el promedio de las réplicas con su desviación estándar representada en barras (N=3).

2.6 Crecimiento en sobrenadante de co-cultivos

El intercambio de aminoácidos entre las cepas del sistema es fundamental para el establecimiento del mismo, por lo tanto si una o ambas cepas son incapaces o ineficientes para producir la concentración de aminoácido necesaria para cubrir las necesidades metabólicas de ambas cepas se espera que el sistema colapse. Una manera indirecta de validar la presencia de los aminoácidos en el medio es utilizar el sobrenadante de co-cultivos como medio de cultivo para monocultivos. En las Figuras 2.8 y 2.9 se observan halos de crecimiento de las cepas $\Delta pheA$ y $\Delta leuB$ utilizando el sobrenadante proveniente de diferentes co-cultivos iniciados con frecuencias iguales. Para el co-cultivo $\Delta leuB$ - $\Delta tyrA$ se evaluó además la frecuencia para el crecimiento óptimo 2.3, proporciones iniciales de 9:1 (Métodos 7.4).

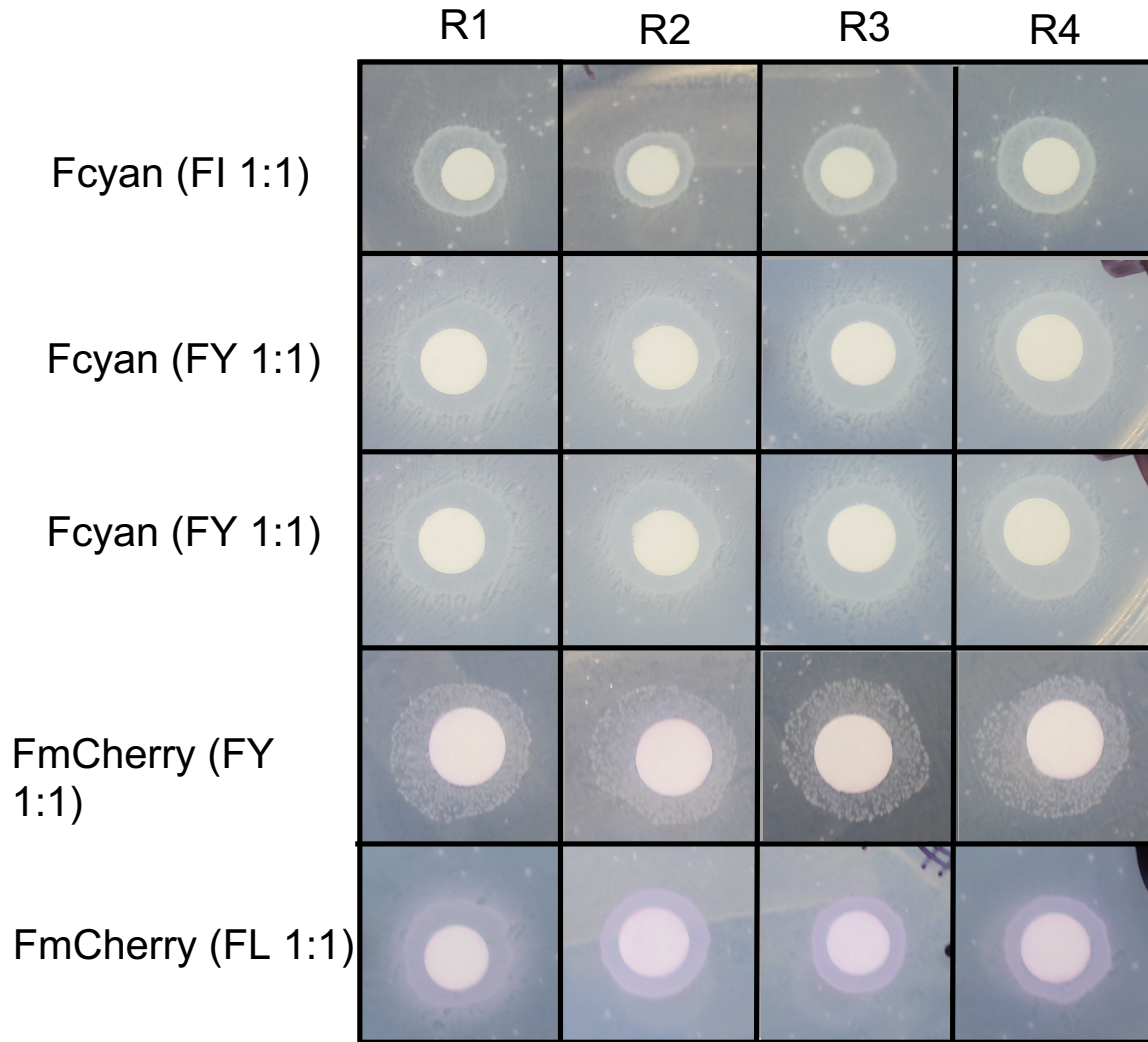


Figura 2.8: *Crecimiento en sobrenadante*. Halos de crecimiento de la cepa $\Delta pheA$ en medio mínimo con el sobrenadante proveniente de co-cultivos con crecimiento de 24 horas, las réplicas de cada condición se describen como R1, R2, R3 y R4

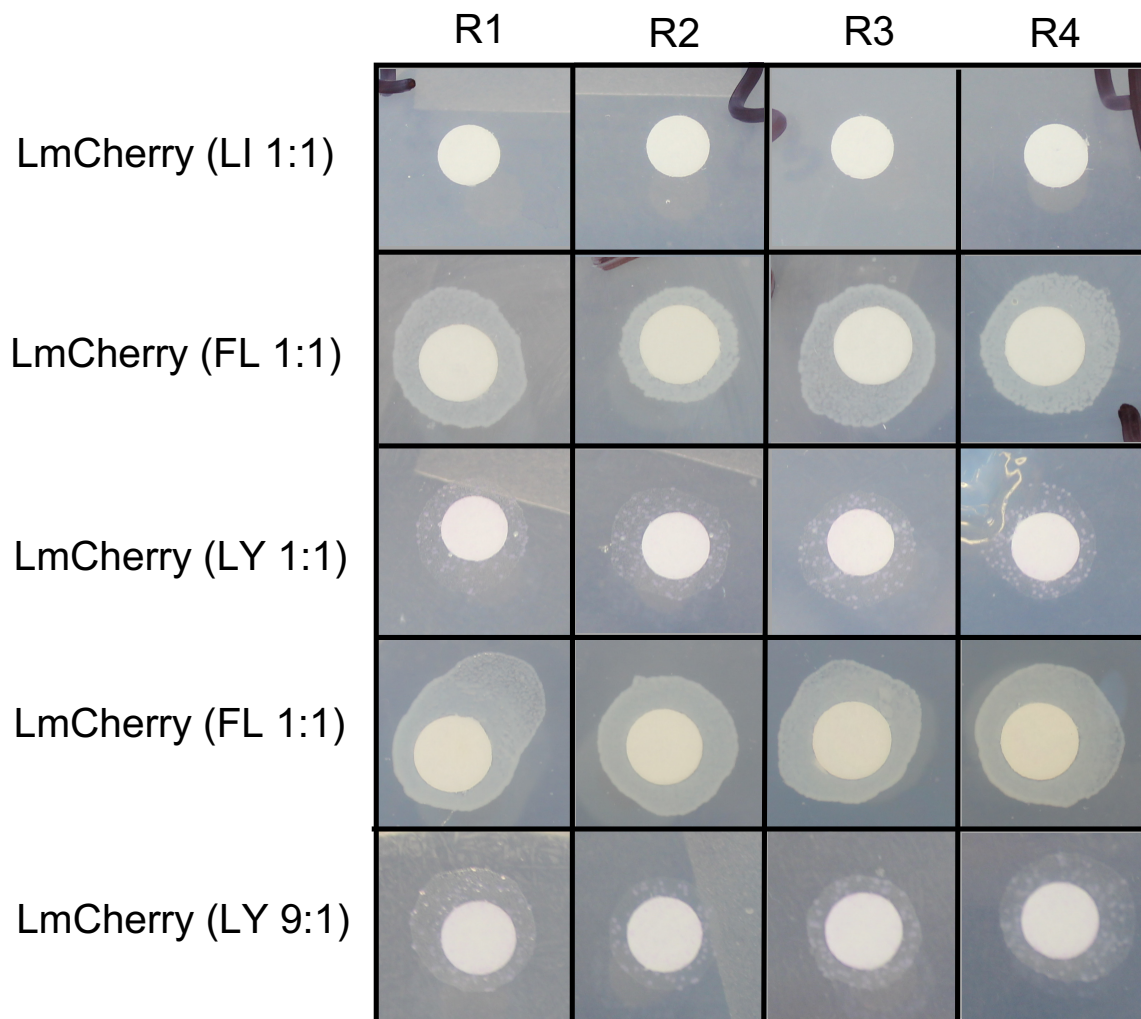


Figura 2.9: *Crecimiento en sobrenadante* Halos de crecimiento de la cepa $\Delta leuB$ medio mínimo con el sobrenadante proveniente de co-cultivos con crecimiento de 24 horas, las réplicas de cada condición se describen como R1, R2, R3 y R4.

Capítulo 3

Perfiles de interacción en sistemas mediados por cross-feeding.

3.1 Introducción

Las interacciones tipo cross-feeding ocurren cuando los integrantes de una comunidad son capaces de intercambiar los metabolitos entre ellos, dichos metabolitos pueden ser producidos solo por una parte de la población (Turner et al. (1996); Harcombe et al. (2014); Germerodt et al. (2016); Adamowicz et al. (2018); D’Souza et al. (2018); Niehaus et al. (2019)). Este tipo de interacción favorece que la abundancia de integrantes cambie teniendo como consecuencia cambios en la composición y dinámica de la comunidad (Herren (2020); Amarnath et al. (2021)). En algunos escenarios los cambios producidos favorecen la cooperación metabólica (MacLean et al. (2010); Ziesack et al. (2019)).

Cambios continuos en la concentración de nutrientes y bioproductos producidos puede favorecer a las interacciones contexto dependientes (Harcombe et al. (2014)), por lo tanto niveles óptimos de nutrientes reflejan el costo-beneficio que tienen los integrantes de la comunidad (Hesse et al. (2019)), de tal manera que pueden existir diferentes condiciones iniciales que permitan la cooperación en el sistema (Shou et al. (2007)).

Para determinar la dinámica de la comunidad y cómo las interacciones entre sus integrantes cambian (perfil de interacción) se evalúan las interacciones por pares entre los integrantes del sistema. Para ello se determina si hay beneficio como consecuencia del intercambio de metabolitos. En aquellas condiciones donde el consumo de un metabolito beneficia solo a uno de los integrantes describimos la interacción como **parasitismo**; cuando el beneficio es mutuo lo describimos como **mutualismo** (Wintermute and Silver (2010); Fritts et al. (2020)). Existen también condiciones ambientales en las cuales no hay un beneficio para la comunidad (MacLean et al. (2010); Ratzke et al. (2020)) o donde los integrantes compiten entre ellos por determinados recursos.

Los intercambios metabólicos cambian de acuerdo a las condiciones ambientales favoreciendo que el sistema sea dinámico. Definimos como perfil de interacción al tipo de interacción presente de acuerdo a las condiciones ambientales, por lo tanto los perfiles son contexto dependientes y un sistema puede tener cambios entre un perfil y otro con *trade-offs* vinculados al crecimiento de los integrantes (Freilich et al. (2011); Hammarlund et al. (2019); Gilbert et al. (2012); Enke et al. (2018)).

Trabajos previos han demostrado que en medios ambientes ricos en nutrientes la diversidad se reduce y las interacciones entre los integrantes tienden a ser antagonistas

Simulación del crecimiento en medio con limitación de nutrientes, modelo proteómico

(Hoek et al. (2016); Monaco et al. (2020); Ratzke et al. (2020)). En contraste, aquellos medios ambientes donde la presencia y cantidad de nutrientes es limitante se favorece el intercambio de metabolitos y las interacciones tienden a ser mas cooperativas (Zelezniak et al. (2014); Shou et al. (2007); Hammarlund et al. (2019); Harcombe et al. (2014); Mee et al. (2014); Hoek et al. (2016)). En estos medios ambientes las células regulan su metabolismo global (distribución proteómica) disminuyendo la concentración de recursos utilizados para crecer y aumentando la síntesis de metabolitos (Steinchen et al. (2020); Hauryliuk et al. (2015)). Esta distribución del proteoma es dinámica y es mediada por la alarmona ppGpp, la cual es capaz de modificar la expresión de cientos de genes (Traxler et al. (2008); Sanchez-Vazquez et al. (2019)). Al alterar los niveles normales de ppGpp se producen fenotipos con importantes deficiencias de crecimiento o fenotipos letales (Xiao et al. (1991)), sin embargo la modulación de ppGpp permite distribuciones del proteoma que favorecen el crecimiento a través de ajustar la concentración de ribosomas en la célula, incrementando así la probabilidad de adaptación a medios ambientes fluctuantes (Balakrishnan et al. (2021)).

Diversas situaciones de estrés como la inanición favorecen el incremento de ppGpp (Wu et al. (2021); Schofield et al. (2018)), el cuál permite que una fracción grande del proteoma se destine a la producción de metabolitos a expensas de la síntesis ribosomal (Scott et al. (2010); Liao et al. (2017); Wu et al. (2021); Pacciani-Mori et al. (2021).) Con el fin de evaluar cómo afecta la distribución del proteoma a la dinámica de interacción de una comunidad con interdependencias metabólicas, postulamos dos modelos teóricos: el primero, un **modelo de distribución del proteoma** que nos permite estimar el crecimiento de cada población y la tasa de producción de aminoácidos, estimaciones que son utilizadas por un **modelo de dinámica de poblaciones** con el cuál evaluamos cómo diferentes condiciones ambientales favorecen el establecimiento de los distintos perfiles de interacción.

Utilizando ambos modelos simulamos numéricamente el crecimiento de co-cultivos en diferentes medios ambientes (medios ambientes con limitación de recursos). Posterior a las simulaciones teóricas validamos las predicciones utilizando dos co-cultivos de *E. coli* compuestos por las mutantes $\Delta leuB-\Delta tyrA$ y $\Delta leuB-\Delta pheA$ en medio mínimo con diferentes concentraciones de aminoácidos (Reyes-González et al. (2022)).

La construcción del modelo proteómico se realizó en colaboración con Haydée de Luna Valenciano y el Dr. Rafael Peña Miller del Centro de Ciencias Genómicas y la construcción del modelo de poblaciones en colaboración con el Dr. Michael Sieber del Max Planck Institute.

3.2 Simulación del crecimiento en medio con limitación de nutrientes, modelo proteómico

Algunos modelos asocian la tasa de crecimiento con cómo las bacterias distribuyen sus recursos entre síntesis de proteínas y funciones metabólicas (Liao et al. (2017);

Simulación del crecimiento en medio con limitación de nutrientes, modelo proteómico

Basan et al. (2015); Greulich et al. (2015, 2017); Maitra and Dill (2016)). Basándonos en ellos consideramos que el proteoma total puede ser dividido en diferentes sectores funcionales los cuales son descritos de la siguiente manera: **sector ribosomal** (\mathcal{R}) conformado por ribosomas y moléculas asociadas (factores de iniciación, factores de elongación y tRNA sintetasas); **sector metabólico** (\mathcal{E}) que contiene proteínas expresadas de manera constitutiva, proteínas asociadas al catabolismo y anabolismo y las enzimas necesarias para crecer en medios específicos; y el **sector basal** (\mathcal{Z}) que contiene todos los genes asociados a velocidad de crecimiento y genes *housekeeping* (Figura 3.1)(Scott et al. (2010, 2014)).

Para evaluar el rol de la distribución dinámica del proteoma incorporamos la dinámica de adaptación metabólica a un contexto de consumo de recursos (MacArthur (1970)) y asumimos que el sector \mathcal{Z} se mantiene constante a través del tiempo (Scott et al. (2010); Pacciani-Mori et al. (2020); Liao et al. (2017)). Posteriormente nos enfocamos en evaluar el papel de la disponibilidad de nutrientes en la dinámica temporal de los sectores \mathcal{E} y \mathcal{R} , de manera que el tamaño de estos sectores es regulado por la cantidad de sustrato (glucosa, representada por S) y los metabolitos esenciales (aminoácidos, representados por X)).

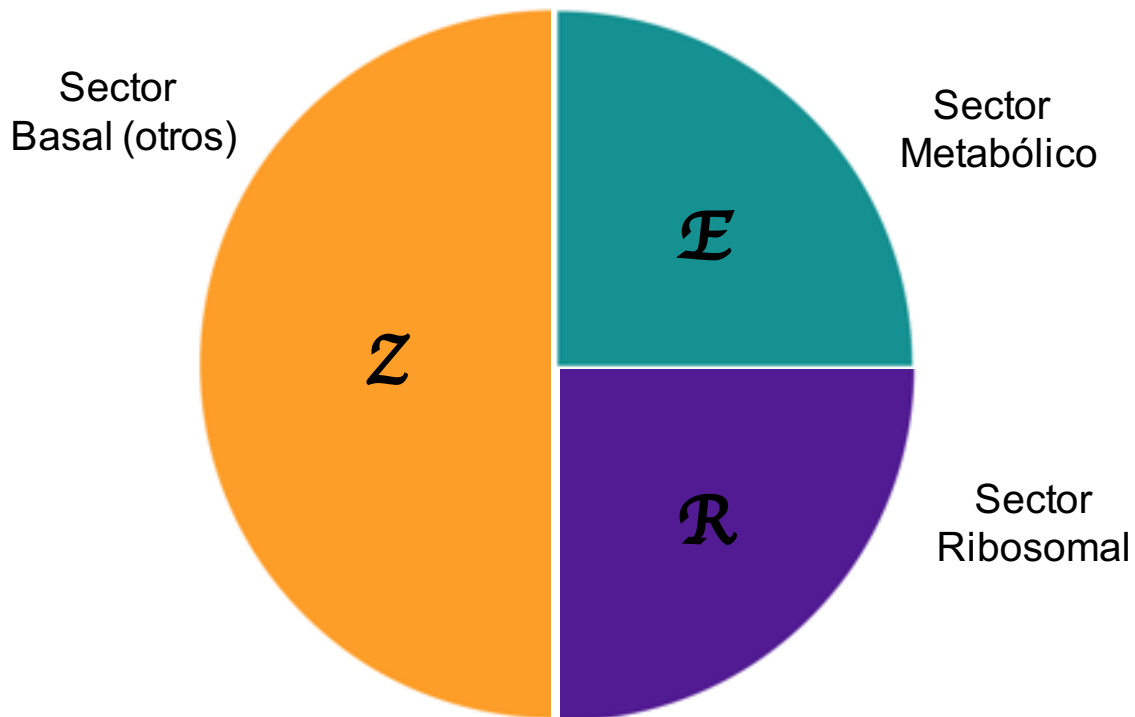


Figura 3.1: Representación visual de la distribución del proteoma. Modificada de Scott et al. (2014)

Simulación del crecimiento en medio con limitación de nutrientes, modelo proteómico

Definimos a la función $u(X, S)$ como la tasa de consumo de recursos como una función de saturación que depende de S y X ,

$$u(S, X) = \frac{\mu(S \cdot X)}{k + (S \cdot X)},$$

donde μ y k son parámetros que representan la tasa máxima de consumo y la constante de semi-saturación, respectivamente.

Para sobrellevar los efectos negativos asociados a la limitación de carbono y aminoácidos las células activan una cascada de señalización conocida como respuesta astringente (Magnusson et al. (2005); Traxler et al. (2008)), el principal componente de esta cascada es la alarmona ppGpp cuya concentración es tiempo-dependiente (representada como $\Gamma(t)$). Crucialmente las concentraciones de síntesis y degradación de ppGpp dependen de la concentración de nutrientes disponibles, si la concentración de recursos es alta, estos serán utilizados para producir proteínas asociadas al crecimiento, en cambio si el factor de transcripción *RelA* detecta tRNAs vacíos favorece la producción de ppGpp y este modifica la distribución del proteoma favoreciendo la síntesis de metabolitos provenientes del sector **E** (Magnusson et al. (2005)).

En nuestro modelo de partición de proteoma consideramos que ppGpp es producido a una tasa $\theta = \theta_b + F(\theta_i, R)$, donde θ_b representa la tasa basal de transcripción de los genes *relA* y *spoT* y $F(\theta_i; R)$ una tasa inducible que aumenta monótonamente con respecto a R , por lo tanto si δ_Γ es una tasa constante de degradación de la alarmona, la dinámica de regulación de ppGpp puede modelarse de la siguiente manera:

$$\frac{d\Gamma}{dt} = \theta_b + \frac{\theta_i R}{1 + R} - \delta_\Gamma \Gamma. \quad (3.2.1)$$

Para modelar el efecto de ppGpp en el tamaño de cada sector del proteoma consideramos que Γ induce la transcripción de genes del sector **E** cuando el sector **R** esta utilizando una alta concentración de nutrientes, por consecuencia el sector ribosomal (**R**) es suprimido por limitación de aminoácidos (Magnusson et al. (2005); Hauryliuk et al. (2015)). Dentro del modelo η_E y η_R representan la tasa de degradación de mRNA que forma parte de ambos sectores (**E** y **R**), así bien la transcripción basal de genes que codifican para proteínas del sector E y R ocurren a una tasa máxima de $\hat{\theta}_E$ y $\hat{\theta}_R$, mientras que la transcripción inducible de ppGpp de los sectores **E** y **R** se representan como θ_E y θ_R , respectivamente.

Si ω y n representan parámetros de Hill que describen la interacción entre ppGpp y los sectores del proteoma, la dinámica temporal de mRNAs de los sectores E y R puede escribirse de la siguiente manera:

$$\frac{dm_E}{dt} = \theta_E \left(\frac{\Gamma^n}{\Gamma^n + \omega^n} \right) + \hat{\theta}_E u(S, X) - \eta_E m_E, \quad (3.2.2)$$

$$\frac{dm_R}{dt} = \theta_R \left(\frac{\omega^n}{\Gamma^n + \omega^n} \right) + \hat{\theta}_R u(S, X) - \eta_R m_R. \quad (3.2.3)$$

Ahora asumimos que la síntesis de cada metabolito se asocia con el costo del mismo en términos de consumo de energía (Liao et al. (2017); Pacciani-Mori et al. (2021)), para modelar la biosíntesis de aminoácidos dividimos el sector **E** en dos sub-sectores: \mathcal{E} y y , donde el sub-sector \mathcal{E} contiene la mayor parte de las reacciones catabólicas de la célula y en el sub-sector y describimos el costo de producción del aminoácido **Y** y la secreción de este al medio ambiente, por lo tanto la tasa de traducción de cada mRNA κ_E y κ_R , depende de J_E y J_R , lo que indica el porcentaje de ribosomas pertenecientes a cada sector en traducción activa. φ representa la fracción del sector **E** utilizado para la síntesis de metabolitos en los sub-sectores: y , δ_E y δ_R que representan la tasa de degradación de proteínas de cada sector, la dinámica del uso de diferentes sectores del proteoma se describe con las siguientes sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias:

$$\frac{d\mathcal{E}}{dt} = (1 - \varphi)(\kappa_E \cdot m_E) \left(\frac{1 - \mathcal{E}}{R \cdot J_E} \right) - \delta_E \mathcal{E}, \quad (3.2.4)$$

$$\frac{dy}{dt} = \varphi(\kappa_E \cdot m_E) \left(\frac{1 - y}{R \cdot J_E} \right) - \delta_E y, \quad (3.2.5)$$

$$\frac{dR}{dt} = \kappa_R \cdot m_R \left(\frac{1 - R}{R \cdot J_R} \right) - \delta_R R. \quad (3.2.6)$$

Resolviendo numéricamente el sistema obtenemos la dinámica temporal de la concentración de mRNA y proteínas en diferentes condiciones ambientales.

3.3 Modelado de la dinámica poblacional de un consocio con auxotrofías, modelo poblaciones

Postulamos un modelo de dinámica de poblaciones con el que evaluamos el cambio en la abundancia de las diferentes cepas de un co-cultivo, representamos la densidad bacteriana de la cepa auxótrofa al aminoácido X como $B_x(t)$ en el tiempo $t \in [0, T]$, y la cepa auxótrofa Y representada como $B_y(t)$.

Nuestro modelos consideran el crecimiento de la cepa B_x como una función de saturación (Monod) $U_x(S, X)$ que dependerá del consumo de recursos, glucosa y aminoácidos, y es definida de la siguiente manera: $U_x(S, X) = \frac{\lambda \cdot S}{(K+S)}$ con una velocidad de

Modelado de la dinámica poblacional de un consocio con auxotrofías, modelo poblaciones

crecimiento $\hat{\lambda}$ y una media de saturación constante representada por K .

Basándonos en estudios previos donde se demuestra que la concentración de proteínas ribosomales es proporcional al crecimiento de las células (Dennis and Bremer (1974)) utilizamos nuestro modelo de partición del proteoma para obtener $\hat{\lambda} = k_1 \cdot \lambda$, donde k_1 es la constante proporcional a λ , por lo tanto el crecimiento de la cepa B_x se modela utilizando la función de crecimiento $G_x(S, X) = cU_x(S, X)$, donde c representa una constante de conversión a biomasa, el crecimiento de la cepa B_y se escribe como: $G_y(S, Y) = cU_y(S, Y)$. Consideramos además que el aminoácido X es producido por la cepa B_y en exceso y exportado a una tasa β_y . De la misma manera B_x produce y secreta Y a una tasa β_x .

Consideramos que la producción del aminoácido Y ocurre a una tasa $\hat{\beta}_y = k_2 \cdot \beta_y$, donde β_y es obtenida a partir del modelo de partición del proteoma, el parámetro k_2 representan la conversión de ATP en moléculas de Y (la producción de X es análoga).

El modelo de dinámica de poblacional de una comunidad con interacciones tipo cross-feeding puede ser descrito utilizando el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dS}{dt} = -(U_x(S, X) \cdot B_x + U_y(S, Y) \cdot B_y) S, \quad (3.3.1)$$

$$\frac{dX}{dt} = \hat{\beta}_x \cdot G_y(S, Y) \cdot B_y - U_x(S, X) \cdot B_x, \quad (3.3.2)$$

$$\frac{dY}{dt} = \hat{\beta}_y \cdot G_x(S, X) \cdot B_x - U_y(S, Y) \cdot B_y, \quad (3.3.3)$$

$$\frac{dB_x}{dt} = G_x(S, X) \cdot B_x, \quad (3.3.4)$$

$$\frac{dB_y}{dt} = G_y(S, Y) \cdot B_y, \quad (3.3.5)$$

con condiciones iniciales: $(S^0, X^0, Y^0, B_x^0, B_y^0)$.

Para integrar ambos modelos primero simulamos computacionalmente λ y β utilizando el modelo de partición del proteoma en un rango de concentraciones de aminoácidos y glucosa, posteriormente dividimos el intervalo $[0, T]$ en sub-intervalos $[t_i, t_i + \Delta t]$ y resolvimos las ecuaciones (3.3.1-3.3.5) para cada tiempo, asumiendo que el crecimiento y la producción de aminoácidos es constante en cada intervalo. A partir de la concentración de cada nutriente al tiempo $t_i + \Delta t$, obtenemos λ_{i+1} y β_{i+1} valores que fueron utilizados en el modelo de de dinámica poblacional, los parámetros utilizados para las simulaciones numéricas están descritos en la Tabla 8.4 en material suplementario.

Posteriormente simulamos el crecimiento de dos monocultivos y del co-cultivo (cepas a la misma frecuencia inicial) bajo las mismas condiciones ambientales, en la Figura 3.2 comparamos el crecimiento de cada cultivo y demostramos que existen condiciones en las cuales el crecimiento en monocultivos es reducido con respecto al

Modelado de la dinámica poblacional de un consocio con auxotrofías, modelo poblaciones

crecimiento alcanzado en co-cultivo donde la limitante del crecimiento es la cantidad de glucosa presente.

En la Figura 3.2 describimos la densidad relativa comparando la densidad bacteriana de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta tyrA$ con respecto a la densidad bacteriana del co-cultivo (al 50/50), en medio con 0.75 de cada aminoácidos. Para definir el perfil de interacción (interacción positiva, negativa o neutra) de cada co-cultivo comparamos las diferencias en crecimiento del co-cultivo contra el promedio del crecimiento de los monocultivos que lo conforman bajo las mismas condiciones ambientales.

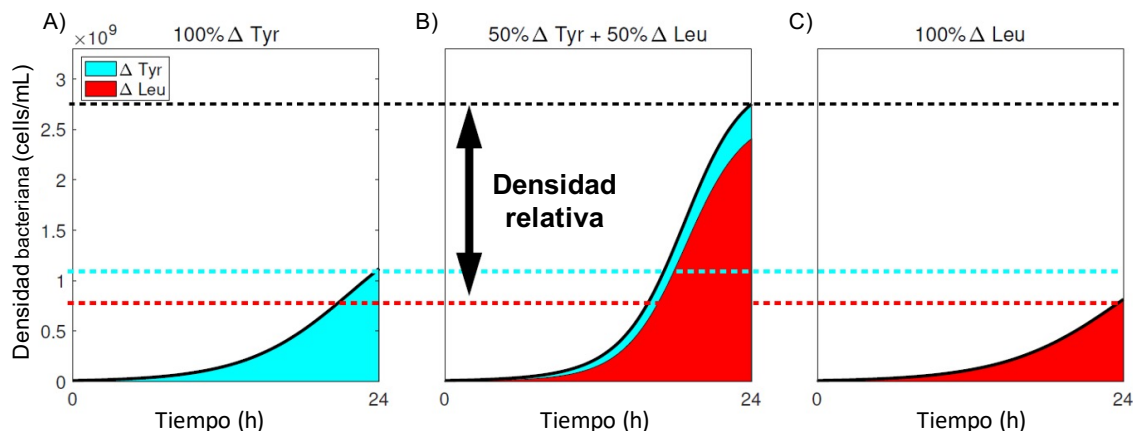


Figura 3.2: *Densidad relativa*: Simulación de las curvas de crecimiento de monocultivos (A y C) y del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$, en un medio de cultivo con 0.75 de los aminoácidos leucina y tirosina a las 24 horas. La líneas punteadas representan la densidad bacteriana para cada cultivo (azul: $\Delta tyrA$, rojo: $\Delta leuB$ y negro: co-cultivo) y la distancia entre el promedio del crecimiento de los monocultivos y el co-cultivo representa la densidad relativa.

Repetimos las simulaciones de los monocultivos y el co-cultivo utilizando diferentes concentraciones de ambos aminoácidos y a partir de la densidad relativa obtenida en cada condición determinamos el perfil de interacción bajo los siguientes criterios (Figura 3.3):

- **Exclusión competitiva:** Aquellas condiciones donde una de las cepas alcanza la misma densidad óptica en monocultivo y en co-cultivo mientras que la segunda cepa no crece (Figura 3.3 A).
- **Mutualismo:** Condiciones en donde el crecimiento de ambas cepas es mejor en co-cultivo que en monocultivo (Figura 3.3 B).
- **Parasitismo:** Condiciones donde una de las cepas alcanza mayor densidad óptica crecimiento en monocultivo que en co-cultivo y de manera contraria la segunda cepa alcanza una mejor densidad óptica al estar en co-cultivo que en monocultivo, pueden existir condiciones que favorezcan a una u otra cepa (Figura 3.3 C).

Validación experimental del crecimiento de co-cultivos en medio mínimo con aminoácidos.

- **Competencia:** Condiciones en donde ambas cepas crecen mejor en monocultivo que en co-cultivo, generalmente la competencia favorece a la cepa con mejor adaptación al medio (Figura 3.3 D).

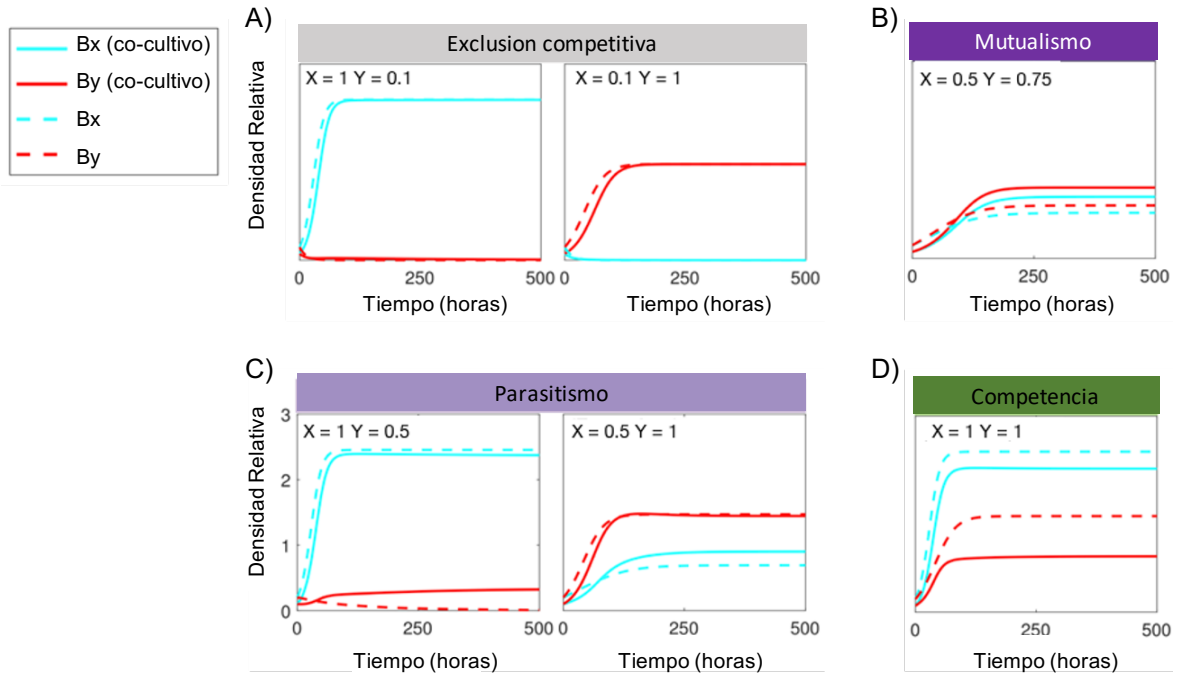


Figura 3.3: *Perfiles de interacción.* Descripción de los tipos de interacción de acuerdo al crecimiento de cada una de las cepas en monocultivo con respecto al crecimiento en co-cultivo. (A) Representación de Exclusión competitiva en un medio con $X=1$ $Y=0.1$ y medio con $X=0.1$ $Y=1$; (B) Representación del mutualismo en un medio con $X=0.5$ $Y=0.75$; (C) Representación de parasitismo para un medio con $X=1$ $Y=0.5$ y medio con $X=0.5$ $Y=1$ y (D) Representación de competencia en un medio con $X=1$ $Y=1$.

3.4 Validación experimental del crecimiento de co-cultivos en medio mínimo con aminoácidos.

A partir de la matriz de 36 co-cultivos (Figura 2.2) elegimos 2 co-cultivos con diferentes dinámicas en los cuales se cumpla con alguno de los siguientes criterios: 1) diferente dinámica de crecimiento (plana o cóncava); 2) diferente costo de producción de los aminoácidos que compensan las auxotrofías del co-cultivos y 3) diferente tasa de requerimiento de aminoácidos (detalles en la Tabla 8.2).

Los co-cultivos elegidos fueron $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ con una dinámica cóncava y aminoácidos costosos (Kaleta et al. (2013)), $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ con una dinámica cóncava

Validación experimental del crecimiento de co-cultivos en medio mínimo con aminoácidos.

y costos en la producción de aminoácidos lejanos, siendo leucina el aminoácido más costosa en cuanto al número de moléculas de glucosa necesarias para producir la concentración total de aminoácidos presentes en una célula de *E. coli* (Kaleta et al. (2013)). Para cada co-cultivo se evaluó el crecimiento de monocultivos y co-cultivos en proporciones iniciales iguales bajo diferentes condiciones ambientales, medio mínimo sin aminoácidos y medio mínimo con aminoácidos en un gradiente de concentraciones desde 0 hasta 4 veces la concentración mínima descrita para cada aminoácido (Métodos: [7.5](#)).

Validación experimental del crecimiento de co-cultivos en medio mínimo con aminoácidos.

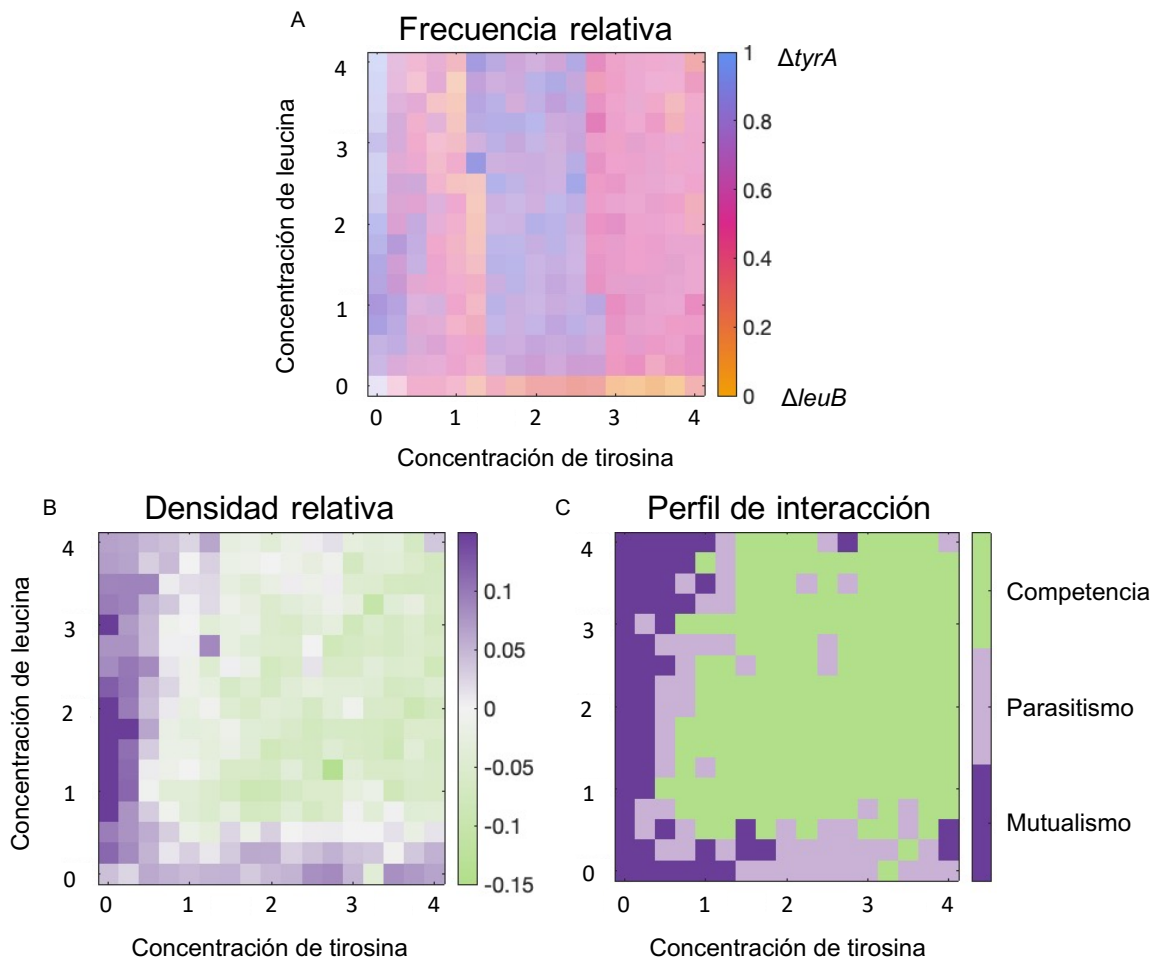


Figura 3.4: *Checker boards* co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$. **A)** Matriz de abundancia relativa final estimada utilizando la intensidad de fluorescencia de cada condición, el gradiente va de amarillo cuando el mayor porcentaje de la población es $\Delta tyrA$ hasta azul cuando el mayor porcentaje de la población es $\Delta leuB$. **B)** Matriz de densidad relativa, los cuadros morados representan valores de densidad relativa alta, los verdes aquellas condiciones donde el co-cultivo creció menos que los monocultivos y en blanco se representan las condiciones donde la interacción es aditiva, no hay beneficio al crecer en co-cultivo. **C)** Perfiles de interacción en diferentes concentraciones de aminoácidos (verde: cooperación, morado claro: parasitismo y morado oscuro: mutualismo).

Validación experimental del crecimiento de co-cultivos en medio mínimo con aminoácidos.

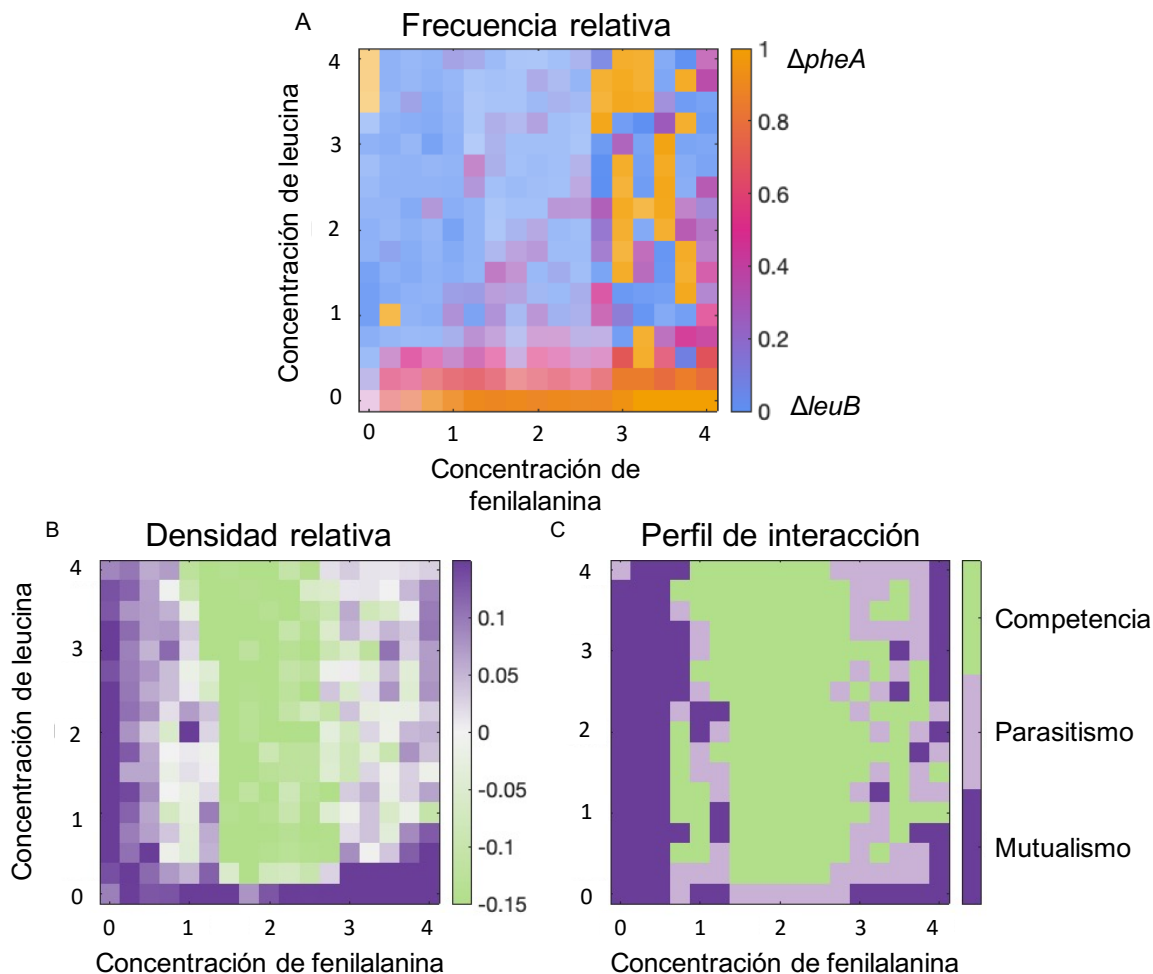


Figura 3.5: *Checker boards* co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$. **A)** Matriz de abundancia relativa final estimada utilizando la intensidad de fluorescencia de cada condición, el gradiente va de amarillo cuando el mayor porcentaje de la población es $\Delta pheA$ hasta azul cuando el mayor porcentaje de la población es $\Delta leuB$. **B)** Matriz de densidad relativa, los cuadros morados representan valores de densidad relativa alta, los verdes aquellas condiciones donde el co-cultivo creció menos que los monocultivos y en blanco se representan las condiciones donde la interacción es aditiva, no hay beneficio al crecer en co-cultivo. **C)** Perfiles de interacción en diferentes concentraciones de aminoácidos (verde: cooperación, morado claro: parasitismo y morado oscuro: mutualismo).

En las Figuras 3.4 B y 3.5 B observamos que el crecimiento de los co-cultivos cambia de acuerdo a la concentración de aminoácidos presentes en el medio los cuales no son iguales a la sumatoria del crecimiento de sus monocultivos (Figuras suplementarias: 8.1, 8.2, 8.3 y 8.4), por lo tanto la presencia de ambas cepas en el mismo espacio tiene un efecto en el crecimiento de las mismas, teniendo como consecuencia un perfil de interacción dinámico que cambia con el medio ambiente.

Abundancia final de cada fenotipo en medio con gradiente de aminoácidos

De acuerdo a los criterios descritos para cada perfil de interacción es posible encontrar en zonas con altas concentraciones de aminoácidos perfiles de competencia, y en zonas con baja concentraciones perfiles de mutualismo o parasitismo, el resultado de ambos co-cultivos es cualitativamente congruentes con los criterios descritos para cada tipo de interacción.

Según la literatura (Hammarlund et al. (2019); Hoek et al. (2016); Grilli (2020); Shoemaker et al. (2021)) los medios con pocos recursos permiten cambios en el flujo de energía que modifican la tasa de división celular entre otros factores, favoreciendo así las interacciones positivas entre los miembros de una comunidad al potenciar el intercambio metabólico entre de los mismos (zonas moradas Figura 3.4 y 3.5) y en medios ricos o adicionados con los recursos limitantes del sistema es posible la formación de nichos específicos para cada fenotipo (Cavaliere et al. (2017)), además de la acumulación de metabolitos secundarios que pueden ser tóxicos para uno o ambos de los fenotipos (Quay et al. (1977)).

Cuantificando mediante citometría de flujo la abundancia final de cada uno de nuestros fenotipos podemos recrear una matriz de condiciones ambientales que favorezcan a cada uno de los perfiles así como la abundancia de cada fenotipo que permite dicha interacción.

3.5 Abundancia final de cada fenotipo en medio con gradiente de aminoácidos

En las Figuras 3.6 y 3.7 observamos la relación de abundancia final de nuestros co-cultivos a las 48 horas de crecimiento en las matrices de medio mínimo con aminoácidos. En el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ (Figura 3.6) no se observan condiciones en las cuales solo se recupere a uno de los fenotipos, sin embargo en todas las condiciones de leucina con poca tirosina (de 0 a 1) hay una mayor abundancia de la cepa auxótrofa a leucina ($\Delta leuB$), mientras que de 1.25 a 3 de tirosina sin leucina se favorece la presencia de la cepa $\Delta tyrA$.

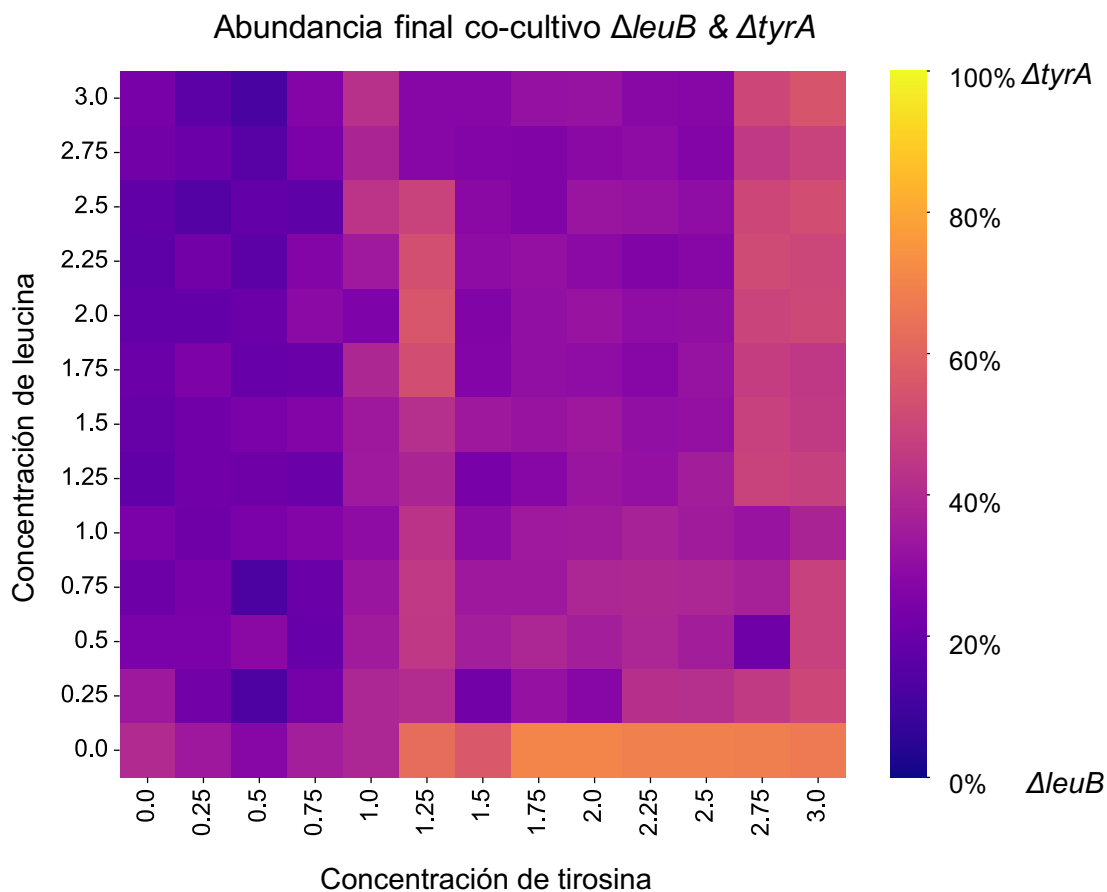


Figura 3.6: *Matriz de abundancia final*. Abundancia final de cada fenotipo del co-cultivo $\Delta leuB$ -mCherry & $\Delta tyrA$ -eCyan a las 48 horas de crecimiento. Porcentaje calculado con 20,000 eventos de cada condición (Métodos 7.10).

En la Figura 3.7 observamos que en la mayoría de las concentraciones de fenilalanina la abundancia de la cepa $\Delta pheA$ va disminuyendo de un porcentaje cercano al 100% a porcentajes cercanos al 50%, dicho cambio se ve con respecto al aumento en la concentración de leucina y se mantiene en frecuencias cercanas al 50-50 en concentraciones de 1 a 3 de leucina. En aquellos puntos donde la abundancia es cercana al 100% se pueden esperar interacciones de exclusión si se mantienen los cultivos por más tiempo.

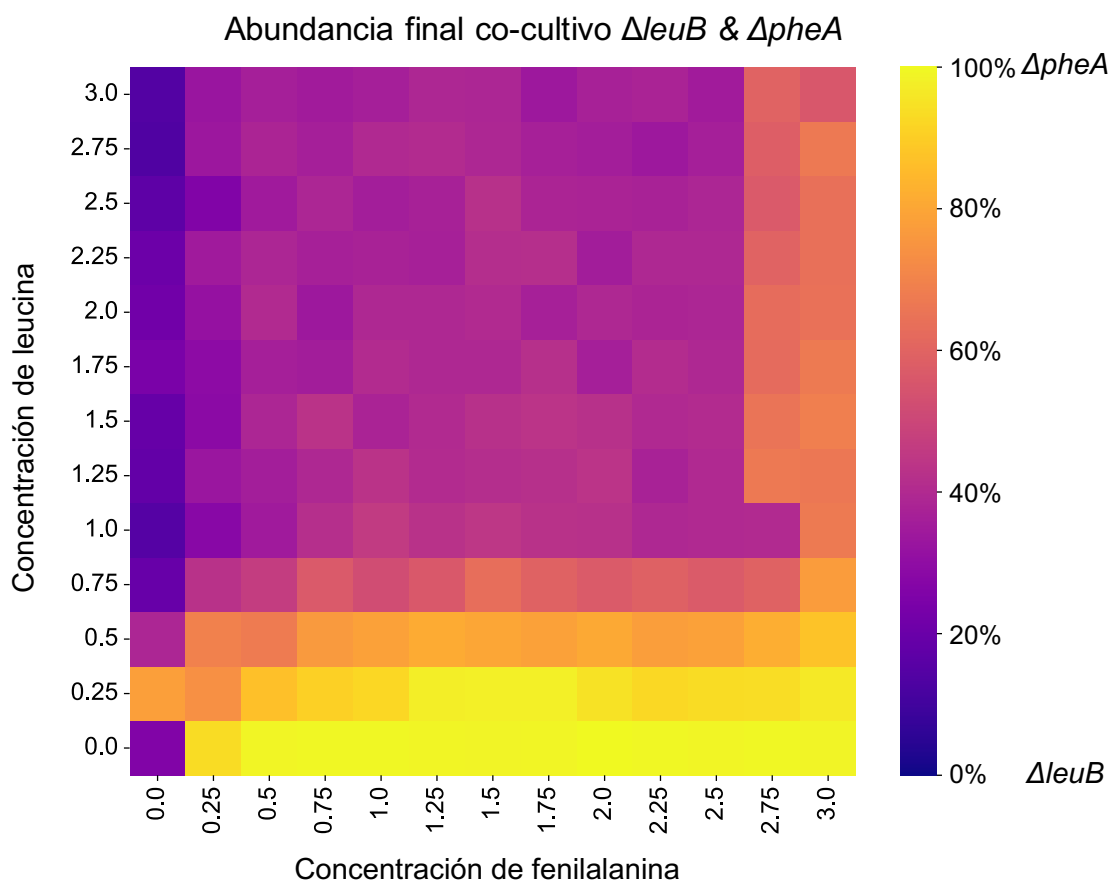


Figura 3.7: *Matriz de abundancia final*. Abundancia final de cada fenotipo del co-cultivo $\Delta leuB$ -mCherry & $\Delta pheA$ -eCyan a las 48 horas de crecimiento. Porcentaje calculado con 20,000 eventos de cada condición (Métodos 7.10).

Los datos de citometría utilizados para realizar las Figuras 3.6 y 3.7 se encuentran en el repositorio GitHub: https://github.com/DanielaReyesGonzalez/Tesis_doctorado.git.

3.6 Discusión

Las condiciones ambientales juegan un papel muy importante en el establecimiento de las comunidades microbianas, por lo tanto si los fenotipos que las conforman requieren de recursos específicos estas necesidades serán de suma importancia para la dinámica de las mismas, siendo potencialmente los moduladores del perfil de interacción de cada comunidad.

En este capítulo demostramos de manera teórica y experimental que es posible

Discusión

predecir el tipo de interacción entre dos bacterias si conocemos aquellas condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de las mismas. La implementación de ambos modelos matemáticos nos permitió vincular procesos celulares como la distribución de proteoma, la modulación y efectos del mismo con comportamientos a nivel poblacional.

Los experimentos con diferentes concentraciones de aminoácidos nos permitieron encontrar los puntos críticos en los cuales los co-cultivos utilizados son capaces de cambiar de un perfil de interacción a otro, es relevante además que utilizando co-cultivos con diferentes necesidades y dinámicas obtenemos resultados cualitativamente similares, lo que indica que el establecimiento de las interacciones no es dependiente del contexto fenotípico de las cepas, es dependiente del contexto ambiental, como ha sido reportado previamente y que independientemente del costo de producción de los aminoácidos la presencia de los mismos en el medio ambiente favorece el crecimiento de ambas cepas.

El uso de sistemas sintéticos con este tipo de interacciones nos permitió monitorear a diferentes escalas la dinámica del consorcio, demostrando que la abundancia de cada fenotipo cambia a lo largo de los experimentos y que la abundancia inicial propuesta (50/50) no es necesariamente la abundancia ideal para establecer determinada interacción.

Capítulo 4

Susceptibilidad a antibióticos dependiente de los perfiles de interacción

4.1 Introducción

En sistemas naturales se ha descrito una gran diversidad de metabolitos presentes en el ambiente (Cycoń et al. (2019)) para los cuales se desconoce una función ecológica dentro de la comunidad, algunos de estos metabolitos (antibióticos) han sido ampliamente estudiados por la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano a determinadas concentraciones (Thomashow (2002)), sin embargo la función de los mismos a bajas concentraciones es incierta.

Se sabe que a dosis sub-letales del antibiótico cloranfenicol, hay un efecto de modulación en el proteoma lo que permite un reajuste en la distribución de recursos a nivel celular que puede favorecer el crecimiento de una población (Scott et al. (2010)). Se ha observado que en una amplia diversidad de antibióticos entre los cuales se encuentran penicilina, ciprofloxacino y rifampicina las dosis por debajo de la concentración mínima inhibitoria potencian el crecimiento de diferentes especies bacterianas. A este efecto se le conoce como *Eagle effect* y se ha estudiado en conjunto con fenotipos de tolerancia o persistencia a los antibióticos (Prasetyoputri et al. (2019)).

Estudios con comunidades sintéticas han encontrado un *trade-off* entre la susceptibilidad a antibióticos y las interacciones entre sus integrantes, observando que bajo condiciones de cooperación la susceptibilidad del sistema se ve regulada por la cepa más susceptible, en cambio en aquellas condiciones con todos los recursos limitantes, se favorecen interacciones tipo competencia donde las cepas más susceptibles son excluidas (Adamowicz et al. (2018)).

En este capítulo nos enfocamos en estudiar el efecto que tienen dosis sub-letales de dos antibióticos en la dinámica de crecimiento de dos co-cultivos, observando posibles mecanismos de tolerancia vinculados a los perfiles de interacción de ambos co-cultivos.

4.2 Susceptibilidad a antibióticos

Con los resultados del capítulo anterior describimos para cada co-cultivo los cambios en el perfil de interacción producidos por las modificaciones en la concentración de aminoácidos presentes en el ambiente. En este capítulo proponemos el uso de dos antibióticos como metabolitos capaces de modificar la dinámica de una comunidad a partir de modificar las interacciones internas de la misma. Para ello evaluamos la respues-

ta colectiva ante este estrés bajo diferentes concentraciones de los recursos limitantes (aminoácidos).

Utilizando los co-cultivos $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ y $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ medimos en medio mínimo las diferencias en el porcentaje de inhibición de dos antibióticos con diferentes efectos y mecanismos de acción. El primer antibiótico elegido fue cloranfenicol (CHL) con un efecto bacteriostático y un mecanismo de acción dirigido a la sub-unidad ribosomal 50S que impide la formación de enlaces proteicos. El segundo antibiótico utilizado fue ciprofloxacino (CPR) con un efecto bactericida y mecanismo de acción dirigido a la DNA girasa que impide el desdoblamiento del ADN durante de transcripción. Utilizamos ambos antibióticos en dosis sub-letales con el fin de observar cambios en la composición del consorcio sin comprometer la presencia de uno o ambos integrantes. Basándonos en los perfiles descritos para cada co-cultivo (Checker Boards, Figuras 3.4 y 3.5) elegimos medio mínimo M9 con 4 diferentes concentraciones de aminoácidos.

Las concentración de aminoácidos utilizada fueron:

1. **Nula:** Medio mínimo sin aminoácidos, en esta condición el crecimiento del co-cultivo depende exclusivamente de la cantidad de aminoácidos producida y secretada por los miembros del co-cultivo.
2. **Baja:** Medio mínimo M9 con la concentración mínima requerida de cada aminoácido (L= 16.909, Y= 7.15 y F= 8.757 mg/l), en esta condición la concentración de aminoácidos es la suficiente para compensar el crecimiento de una cepa de *E. coli*, sin embargo no se considera suficiente para ambas poblaciones.
3. **Media:** Medio mínimo con 2 veces la concentración mínima necesaria de cada aminoácido (L= 33.818, Y= 14.3 y F= 17.514 mg/l), esta concentración se considera suficiente para ambas poblaciones, es posible que exista una disminución en la producción de los aminoácidos por parte de ambas cepas ya que se pueden obtener ambos del ambiente, esta concentración favorece la presencia de perfiles como el parasitismo o competencia por recursos.
4. **Alta:** Medio mínimo con 3 veces la concentración mínima necesaria de cada aminoácido (L= 50.727, Y= 21.45 y F= 26.271 mg/l), condición en la cuál ambas cepas son capaces de crecer sin la presencia de la otra; en esta condición se esperan interacciones de competencia por aminoácidos y carbono (glucosa), es posible que la glucosa se se convierta en el recurso limitante al superar la concentración requerida de aminoácidos, la ventaja ante esta competencia sería para la cepa con mejor crecimiento bajo dichas condiciones de nutrientes.

Debido a la insuficiencia para crecer en medio sin aminoácidos en esta condición no se evaluaron monocultivos, para las condiciones con baja, media y alta concentración de aminoácidos se comparó el crecimiento de ambos monocultivos bajo las mismas condiciones que sus respectivos co-cultivos (Métodos: 7.6).

4.3 Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio con Cloranfenicol

En esta sección evaluamos el efecto del cloranfenicol en la susceptibilidad de ambos co-cultivos. Diversos estudios han demostrado que dosis sub-letales de este antibiótico son capaces de modificar la distribución del proteoma (Harvey and Koch (1980); Scott et al. (2010)). Por lo tanto dichas concentraciones pueden favorecer una distribución proteómica donde exista un aumento en la producción de aminoácidos como consecuencia de modificar el tamaño del sector metabólico.

4.3.1 Porcentajes de inhibición en medio mínimo con cloranfenicol

Después de 24 horas de crecimiento en medio con cloranfenicol se calculó el porcentaje de inhibición de co-cultivos y monocultivos. En las Figuras 4.1 y 4.2 observamos el porcentaje de inhibición alcanzado en medio sin aminoácidos. En ambos co-cultivos el porcentaje de inhibición aumentó en aquellas condiciones con aminoácidos en el medio. En el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ se observa un aumento gradual cercano al 80 % en condiciones con media y alta concentración de aminoácidos (Tabla: 8.5), de manera semejante se alcanzó un porcentaje de inhibición cercano al 70 % en el co-cultivo LF (Tabla: 8.11). Sin embargo ninguno de los co-cultivos presento inhibición en medio sin aminoácidos, el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ alcanzo una inhibición negativa (promedio) cercana a -180 % en algunas concentraciones de antibiótico (Figura 8.8, A) mientras que el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ una inhibición promedio de -40 %.

Estos resultados nos indican que la presencia del antibiótico favorece el crecimiento del co-cultivo, es decir en dosis sub-letales se favorece las interacciones tipo cooperación en aquellos medios sin los recursos limitantes del sistema, en cambio en aquellos donde se favorecen la competencia o segregación en nichos si hay inhibición. En las Tablas: 8.17, 8.18, 8.19 y 8.20, se resumen los p-value de la comparación de densidad óptica entre cada co-cultivo en diferentes concentración de aminoácidos donde se observa que para ambos co-cultivos hay diferencia significativa entre crecer en medio sin aminoácidos y crecer en medio con diferentes concentraciones de ambos aminoácidos.

Los monocultivos alcanzaron porcentajes de inhibición que van del 50 % hasta el 90 % dependiendo de la concentración de aminoácidos (Figuras: 8.10, 8.9, 8.22 y 8.21 y Tablas 8.6, 8.7, 8.12 y 8.13, sección suplementaria 8.4), siendo los monocultivos de las cepas $\Delta tyrA$ (Figura 8.10) y $\Delta pheA$ (Figura 8.22) los más susceptibles con un aumento gradual entre los tratamientos de aminoácidos. La diferencia entre el porcentaje de inhibición de los monocultivos versus el porcentaje alcanzado por los co-cultivos no es la sumatoria del porcentaje de ambos monocultivos, por lo tanto el establecimiento de interacciones entre las cepas tiene un efecto en la respuesta colectiva a la presencia del antibiótico.

Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio con Cloranfenicol

Porcentaje de inhibición de monocultivos y co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en M9 con Cloranfenicol

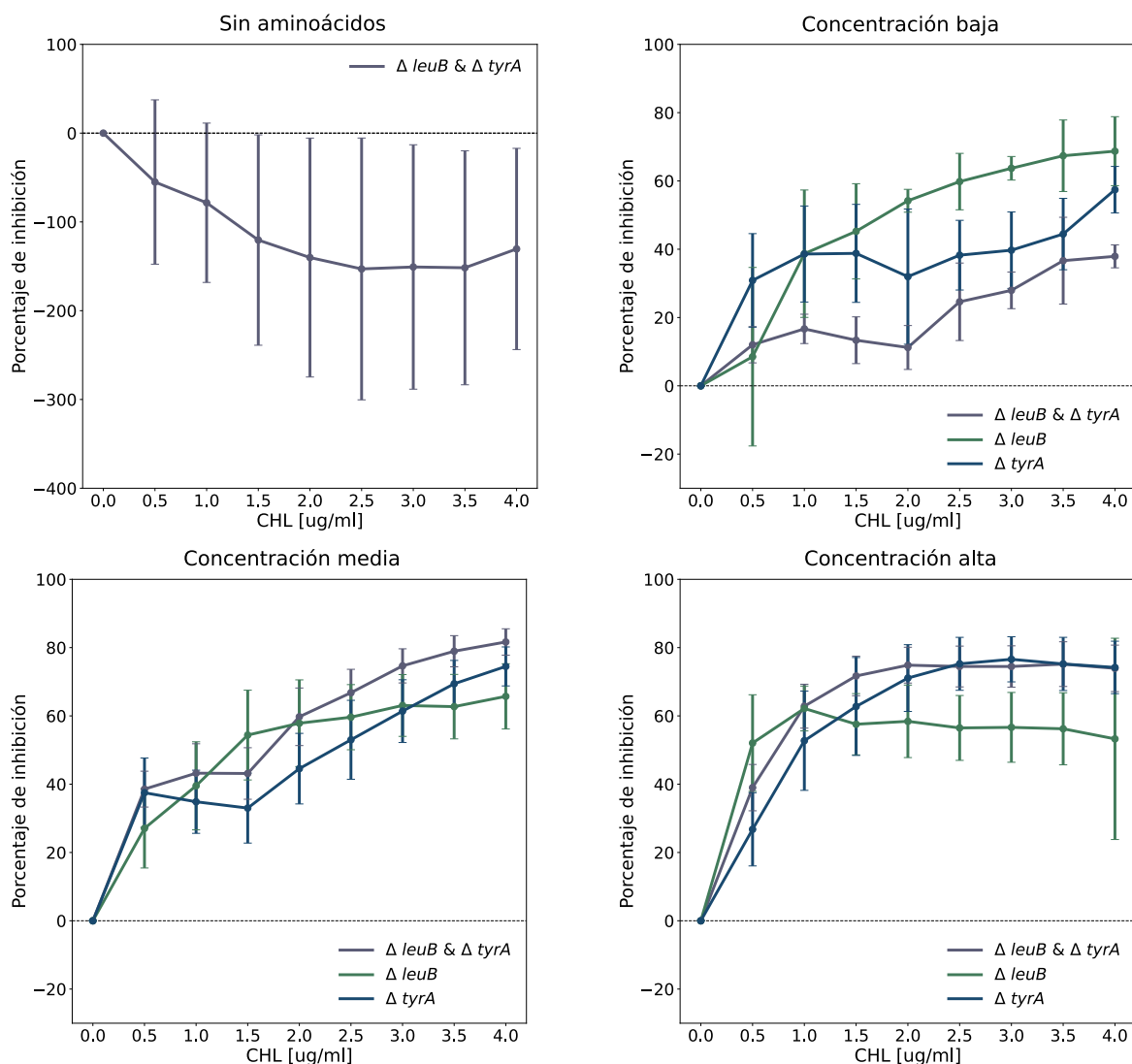


Figura 4.1: *Porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio con cloranfenicol.* Cada línea representa el promedio de las réplicas y desviación estándar del porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ y sus monocultivos en medio mínimo M9 con glucosa y cloranfenicol, las líneas moradas representan el promedio del co-cultivo, las líneas verdes al monocultivo $\Delta leuB$ y las líneas azules al monocultivo $\Delta tyrA$ (N=8). Nota: El intervalo del eje Y de la condición sin aminoácidos fue ajustado para mejor apreciación del resultado.

Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio con Cloranfenicol

Porcentaje de inhibición de monocultivos y co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en M9 con Cloranfenicol

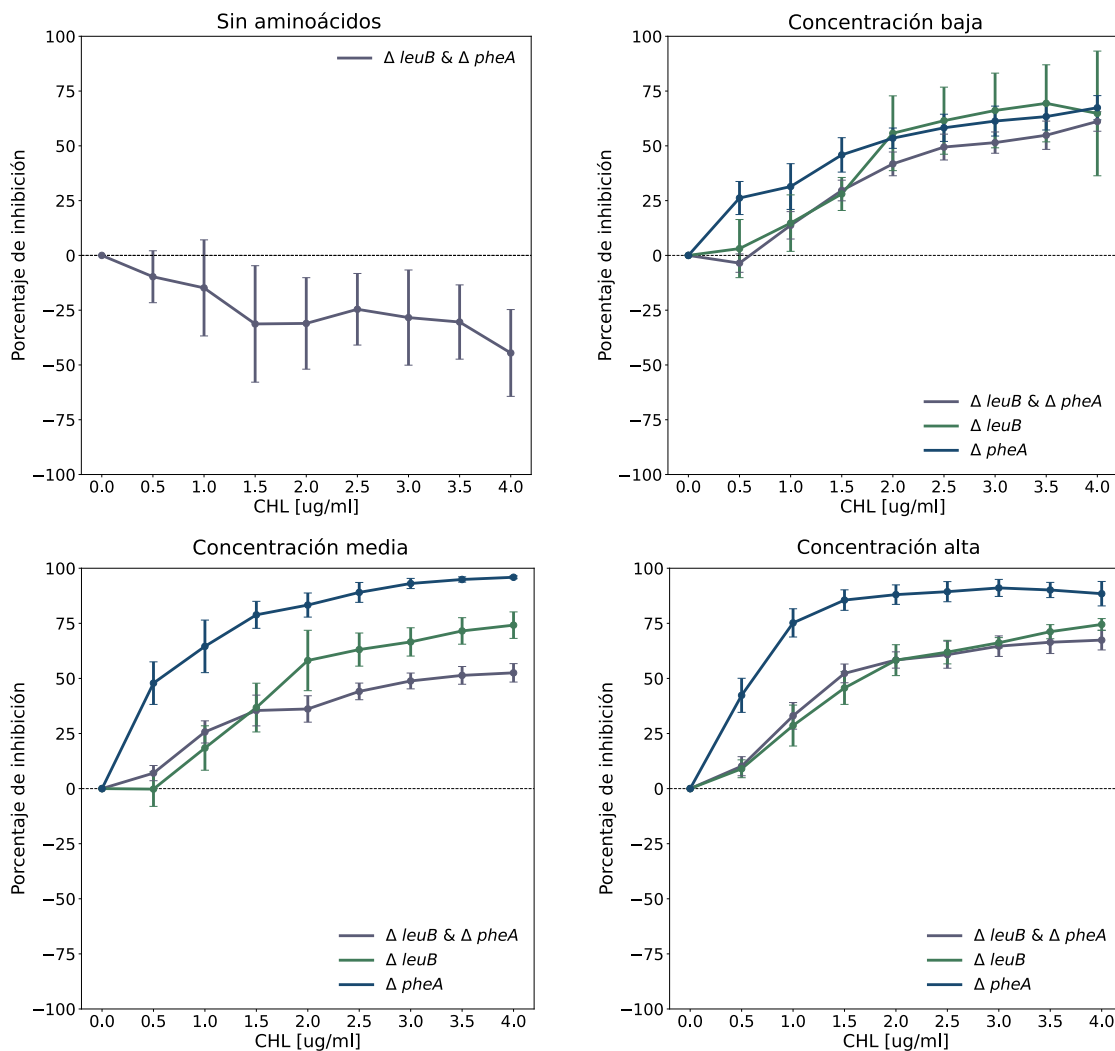


Figura 4.2: Porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio con cloranfenicol. Cada línea representa el promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ y sus monocultivos en medio mínimo M9 con glucosa y cloranfenicol, las líneas moradas representan el promedio del co-cultivo, las líneas verdes al monocultivo $\Delta leuB$ y las líneas azules al monocultivo $\Delta pheA$ (N=8).

4.3.2 Cambios en la abundancia relativa a las 24 horas de crecimiento en medio mínimo con Cloranfenicol

Al finalizar el tratamiento con antibiótico cuantificamos el porcentaje final de cada uno de los fenotipos de nuestros consorcios, en la Figura 4.3 observamos que la proporción entre las cepas $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ se mantuvo cercana al 1:1 en todas las condiciones

Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio con Cloranfenicol

de antibiótico en medio sin aminoácidos, en cambio en aquellos medios con aminoácidos la proporción de la cepa auxótrofa a leucina ($\Delta leuB$) aumentó, llegando a proporciones cercanas al 99:1, este cambio en abundancia final se observó principalmente en medios con baja y media concentración de aminoácidos, recuperando proporciones cercanas al 1:1 en algunas condiciones en medio con alta concentración de aminoácidos.

Abundancia de las cepas $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ posterior al tratamiento en M9 con Cloranfenicol

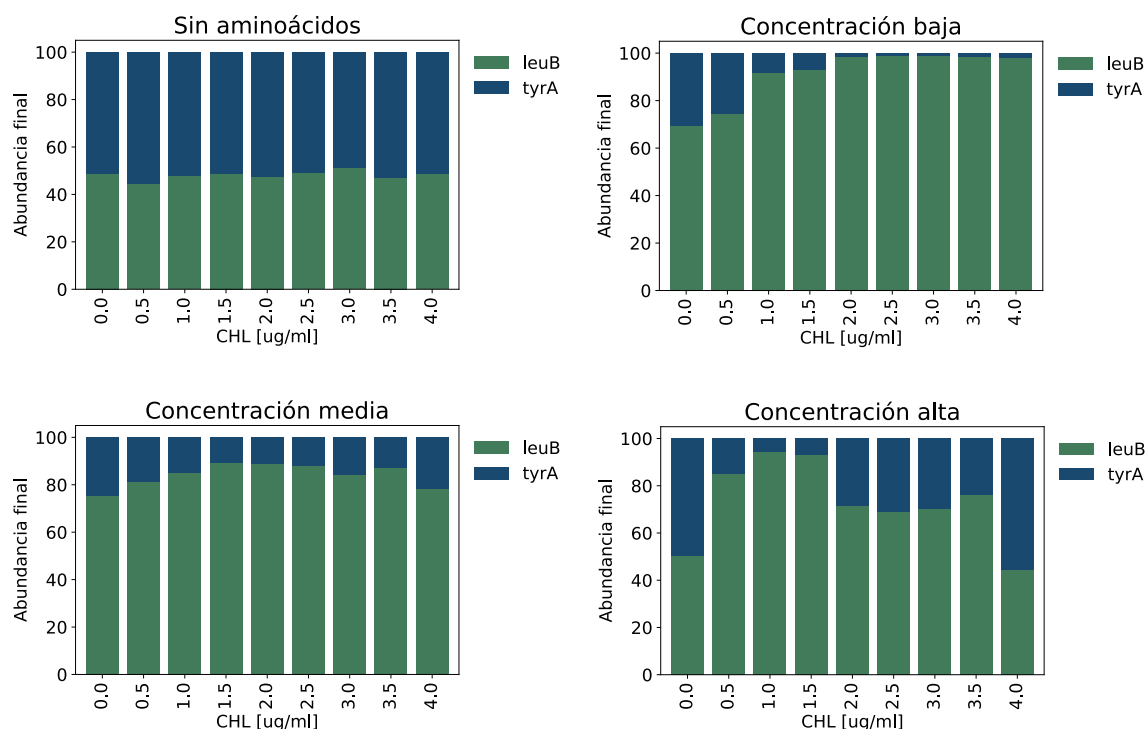


Figura 4.3: *Porcentaje final de las cepas $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$. Cuantificación posterior al tratamiento en medio mínimo M9 con glucosa y cloranfenicol, el monocultivo $\Delta leuB$ representado en verde y el monocultivo $\Delta tyrA$ en azul (Citometría 20,000 eventos por muestra).*

En el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ observamos que la proporción final de la cepa $\Delta leuB$ fue superior al 80% en todas las condiciones, teniendo intervalos de entre 90 y 99% en medio con las diferentes concentraciones de aminoácidos, sin embargo no vemos extinción de la cepa $\Delta pheA$. Para este co-cultivo es importante considerar que el costo de producción de ambos aminoácidos es más cercana por lo tanto es posible que el intercambio de metabolitos sea más limitado y la estabilidad del consorcio sea mediada por la eficiencia para consumir el segundo recurso limitante del sistema, la glucosa.

Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio mínimo con Ciprofloxacino

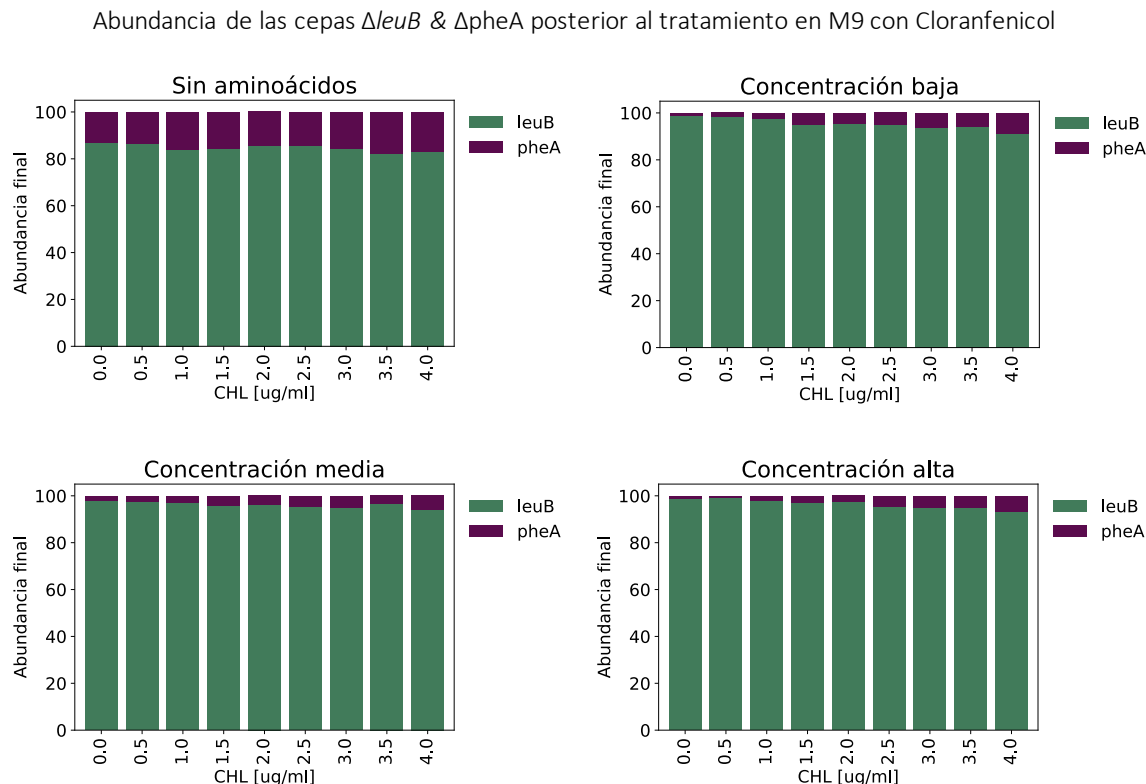


Figura 4.4: Porcentaje final de las cepas $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$. Cuantificación posterior al tratamiento en medio mínimo M9 con glucosa y cloranfenicol, el monocultivo $\Delta leuB$ representado en verde y el monocultivo $\Delta tyrA$ en azul (Citometría 20,000 eventos por muestra).

4.4 Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio mínimo con Ciprofloxacino

Con el objetivo de evaluar si ambos antibióticos tienen un efecto a nivel ecológico no vinculado al efecto y mecanismo de los mismos, a diferencia con cloranfenicol, ciprofloxacino tiene un efecto bactericida por lo tanto se espera que el porcentaje de la población inhibida secrete nutrientes al medio que pueden ser utilizados por el resto de la población.

4.4.1 Porcentajes de inhibición en medio mínimo con Ciprofloxacino

Después de 24 horas de crecimiento en una dosis respuesta a ciprofloxacino en medio mínimo con aminoácidos; en concentraciones nula, baja, media y alta, ambos co-cultivos alcanzaron un promedio de inhibición en un rango de 0 a -10% ($\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$) y de 0 a -20% ($\Delta leuB$ & $\Delta pheA$) en medio sin aminoácidos (Tablas: 8.8 y

Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio mínimo con Ciprofloxacino

8.14). Estos resultados son consistentes con los observados en cloranfenicol, lo cual es consistente con nuestra hipótesis, la susceptibilidad de los co-cultivos a ambos antibióticos es un proceso ecológico no dependiente del antibiótico. En las Figuras 4.5 y 4.6 observamos que la inhibición aumenta en presencia de aminoácidos en el medio a rangos entre 40 y 50 % en el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ y del 60 al 70 % en el co-cultivos $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$.

Las diferencias entre el efecto de ambos antibióticos (cloranfenicol como bactericida y ciprofloxacino como bacteriostático) permiten un posible aumento en la cantidad de recursos en las dosis respuesta con ciprofloxacino en respuesta al porcentaje de la población inhibida por el antibiótico, es decir, aquel porcentaje de la población que muere por efecto del antibiótico es capaz de liberar sus recursos al medio y a su vez estos ser utilizados por las células presentes, una aproximación a esta hipótesis es evaluar el crecimiento del co-cultivo en un medio rico.

En las Figuras 4.5 y 4.6 podemos observar que existe una diferencia en el porcentaje de inhibición que alcanzan los monocultivos con respecto al de los co-cultivos, siendo más susceptibles los monocultivos de $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$, en cambio para los monocultivos $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ no en todas las condiciones es significativa la diferencia (Tablas: 8.21 8.22, 8.23 y 8.24).

Los datos de porcentaje de inhibición para co-cultivos y monocultivos se describen en las Tablas: 8.6, 8.7, 8.12 y 8.13 del material suplementario 8.4.

Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio mínimo con Ciprofloxacino

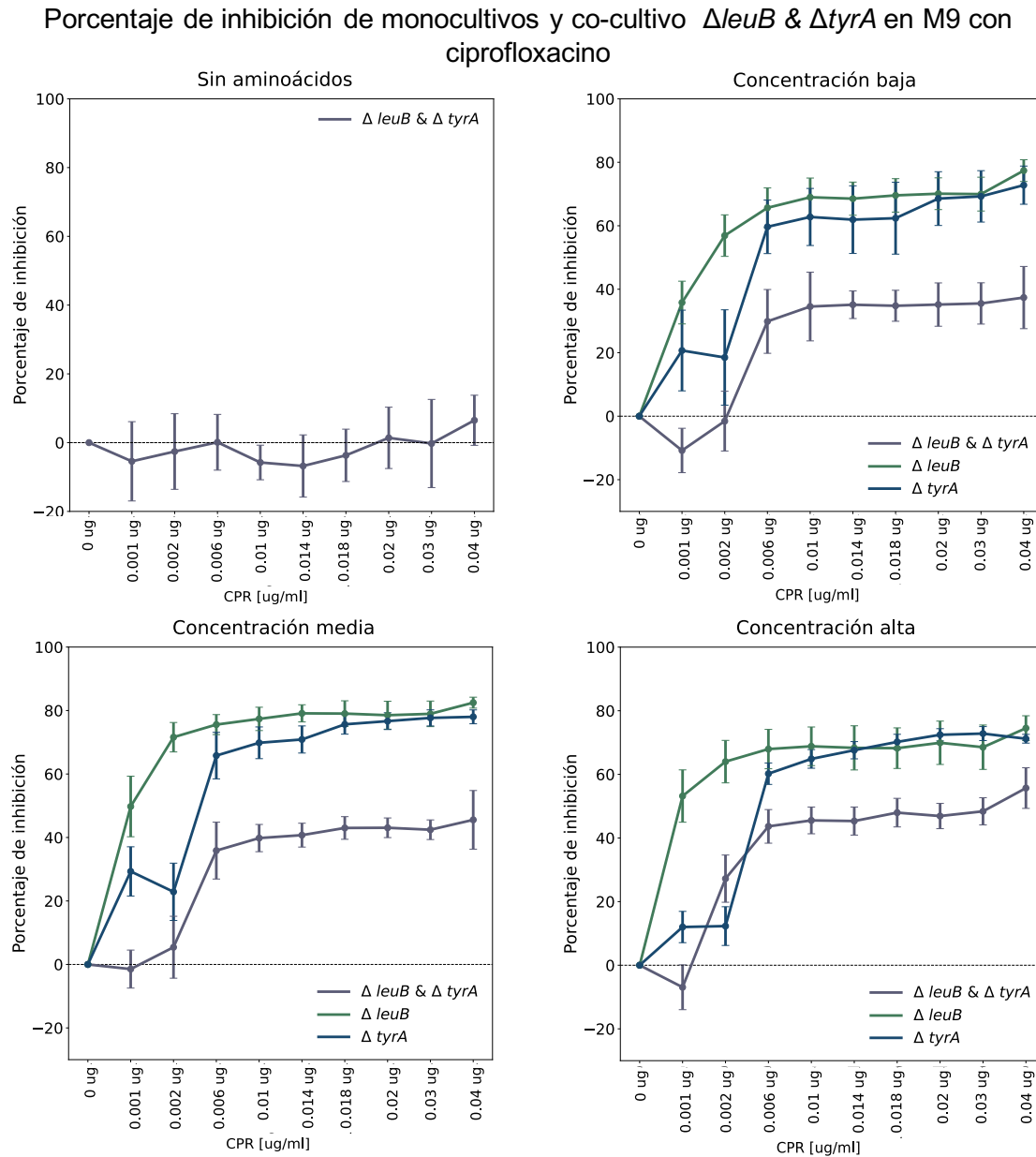


Figura 4.5: *Porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio con ciprofloxacino.* Cada línea representa el promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ y sus monocultivos en medio mínimo M9 con glucosa y ciprofloxacino, las líneas moradas representan el promedio del co-cultivo, las líneas verdes al monocultivo $\Delta leuB$ y las líneas azules al monocultivo $\Delta tyrA$ (N=8).

Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio mínimo con Ciprofloxacino

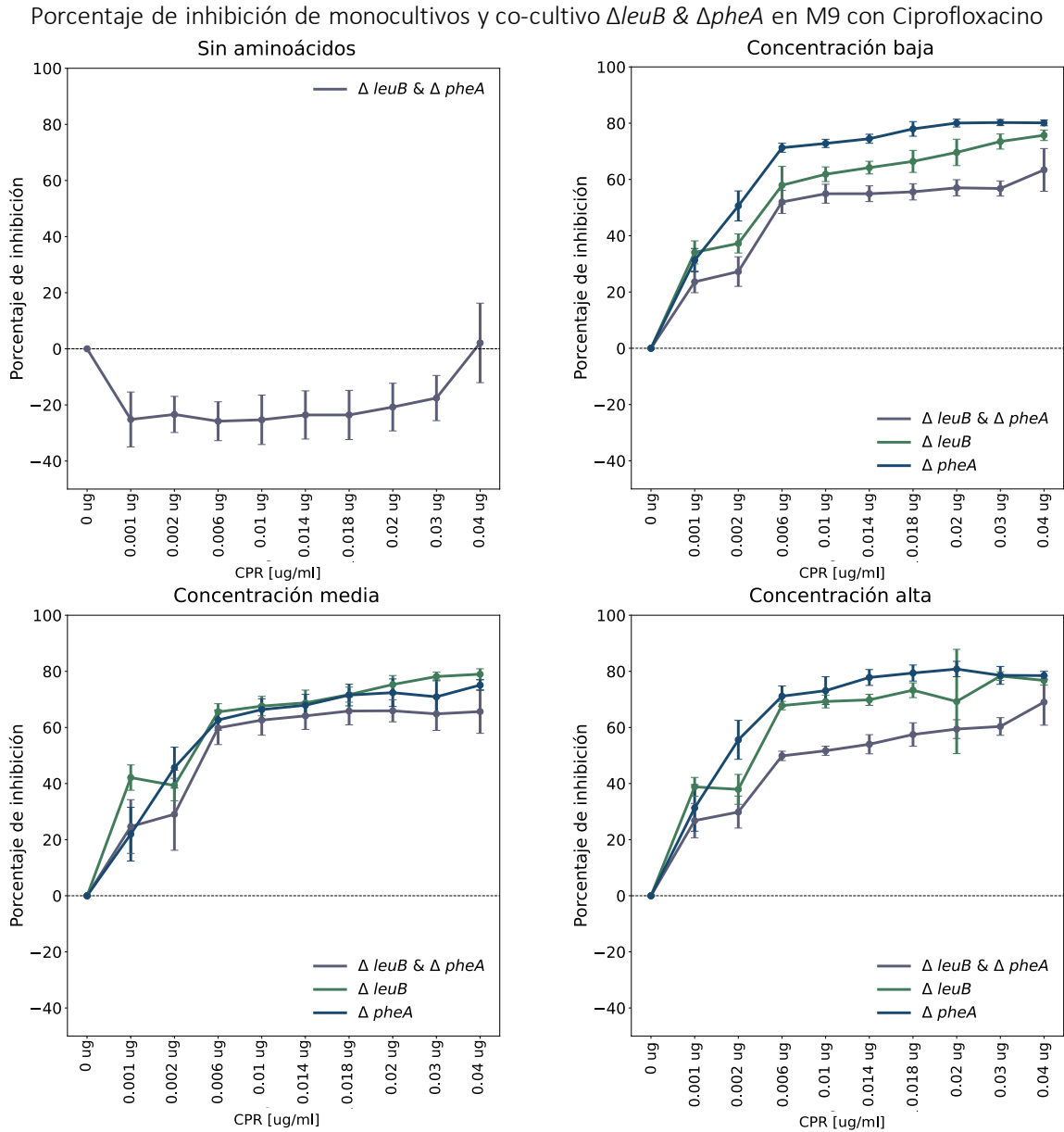


Figura 4.6: Porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio con ciprofloxacino. Las líneas punteadas representan el promedio del porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ y sus monocultivos en medio mínimo M9 con glucosa y ciprofloxacino, las líneas moradas representan el promedio del co-cultivo, las líneas verdes al monocultivo $\Delta leuB$ y las líneas azules al monocultivo $\Delta pheA$ (N=8).

Inhibición y cambios en abundancia relativa en medio mínimo con Ciprofloxacino

4.4.2 Cambios en la abundancia relativa a las 24 horas de crecimiento en medio M9 con Ciprofloxacino

Nuevamente cuantificamos la abundancia final de ambos fenotipos al final del crecimiento en medio con ciprofloxacino y observamos que el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ se mantuvo en proporciones entre el 50-50 y 70-30 en medio sin aminoácidos con una mayor abundancia del fenotipo auxótrofo a tirosina, mientras que en los tratamientos con aminoácidos la proporción se mantuvo en un rango entre 30-70 y 70-30 siendo semejante cualitativamente entre concentraciones de aminoácidos (Figura 4.7).

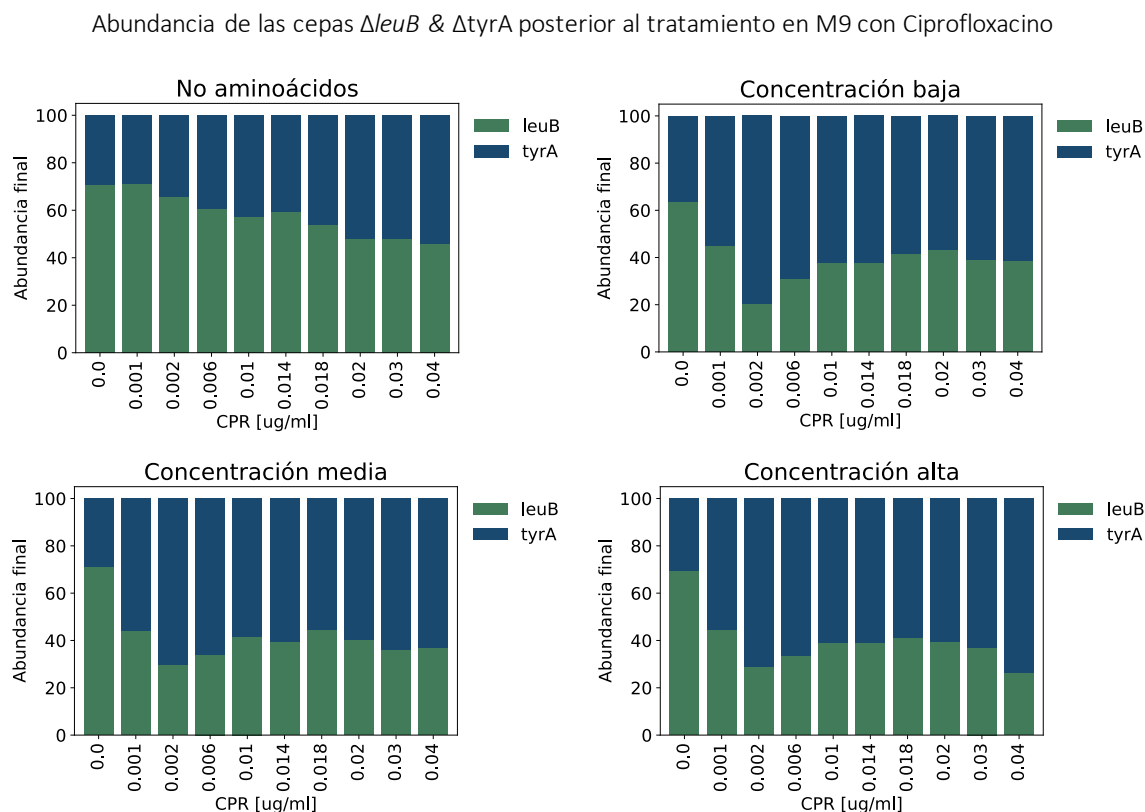


Figura 4.7: Porcentaje final de las cepas $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$. Cuantificación posterior al tratamiento en medio mínimo M9 con glucosa y ciprofloxacino, el monocultivo $\Delta leuB$ representado en verde y el monocultivo $\Delta tyrA$ en azul (Citometría 20,000 eventos por muestra).

El co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ tuvo un comportamiento semejante con respecto a cloranfenicol en medio sin aminoácidos, donde la abundancia final del fenotipo auxótrofo a leucina alcanzo proporciones desde el 80 hasta el 90%, en cambio en aquellos tratamientos con aminoácidos la abundancia final se mantuvo en un rango de 40-60 a 60-40 de cada fenotipo, a excepción de la primera concentración de ciprofloxacino ([0.0005 $\mu\text{g/ml}$]) en donde la abundancia de la cepa $\Delta leuB$ alcanzo una abundancia promedio del 95% (Figura 4.8).

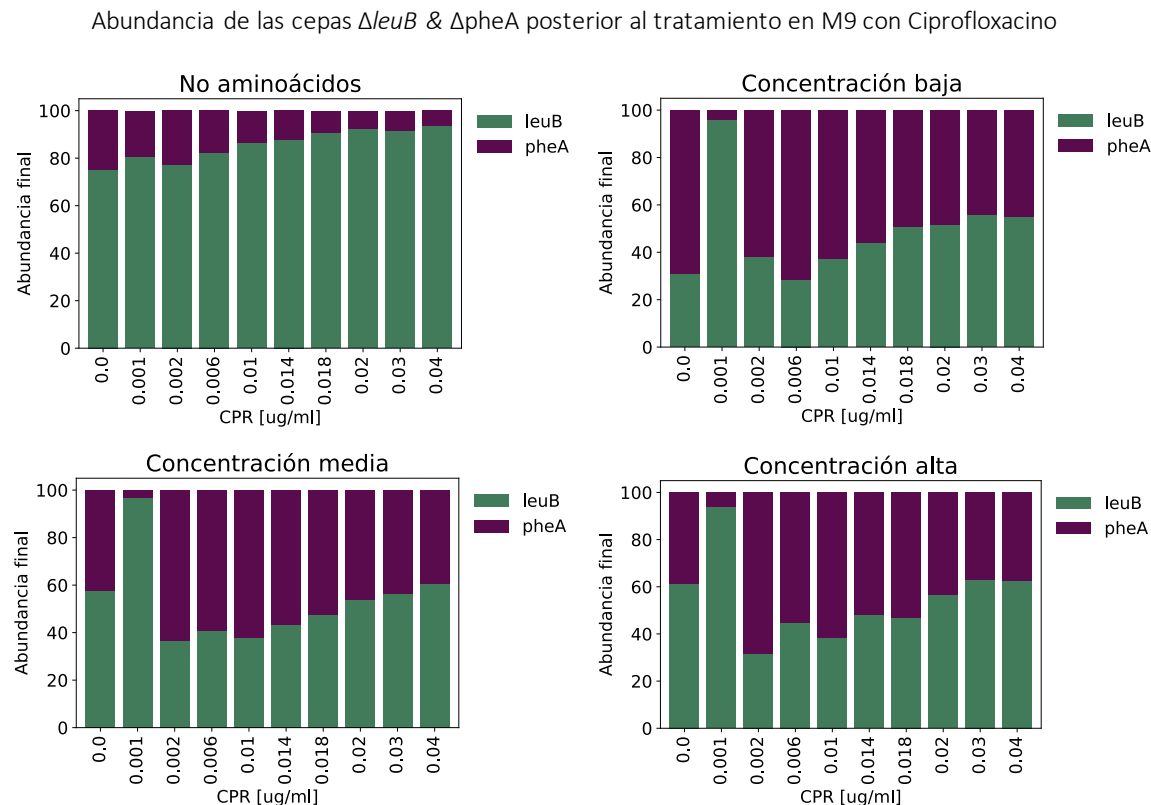


Figura 4.8: *Porcentaje final de las cepas $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$. Cuantificación posterior al tratamiento en medio mínimo M9 con glucosa y ciprofloxacino, el monocultivo $\Delta leuB$ representado en verde y el monocultivo $\Delta tyrA$ en azul (Citometría 20,000 eventos por muestra).*

4.5 Discusión

La resistencia a antibióticos es un problema ampliamente estudiado desde diversos enfoques, sin embargo el efecto que tiene a nivel de comunidades y los alcances que estas pueden tener en conjunto es una área que sigue en desarrollo. Los resultados presentados en esta sección demuestran que las interacciones entre integrantes de una comunidad tienen un efecto en la respuesta de las mismas ante medios ambientes con antibióticos.

El uso de diferentes antibióticos y co-cultivos nos permite ver que la respuesta es mediada a nivel ecológico, es decir, el medio ambiente y sus concentraciones de recursos son más relevantes que las diferencias fenotípicas de las cepas utilizadas, por lo tanto la susceptibilidad a dichos antibióticos esta ligada a la presencia de metabolitos que favorecen interacciones tipo competencia, en cambio en aquellos medios ambientes con limitación de recursos el efecto de cooperación favorece la ausencia de susceptibilidad.

Los resultados de crecimiento de los co-cultivos $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ y $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$

sustentan que de acuerdo a la concentración de aminoácidos presente en el medio ambiente las dinámicas de crecimiento cambian y por consecuencia los perfiles de interacción. Después de comparar la densidad óptica alcanzada a final de los experimentos con antibióticos observamos que para cada tratamiento se alcanza un máximo de crecimiento vinculado a la cantidad de recursos en el medio el cual se ve modificado también por las concentraciones de antibiótico utilizadas (Figuras: 8.5, 8.17, 8.11 y 8.23).

Con los resultados de crecimiento e inhibición de ambos co-cultivos en ambos antibióticos podemos concluir que la susceptibilidad a los antibióticos es diferente dependiendo del perfil de interacción entre los integrantes (Figuras: 4.1, 4.2, 4.5 y 4.6), es decir, la susceptibilidad esta ligada al perfil de interacción favorecido por las condiciones ambientales.

Por lo tanto ya que la susceptibilidad a antibióticos en nuestro sistema esta relacionada con la presencia de aminoácidos en el medio, es importante observar el comportamiento de cada perfil de interacción, aquellos experimentos con medio sin aminoácidos han sido definidos como tratamientos en donde se favorecen interacciones tipo cooperación, en estos resultados observamos que los co-cultivos creciendo en medio sin aminoácidos no presentan susceptibilidad a ninguno de los antibióticos utilizados (Figuras: 4.1, 4.2, 4.5 y 4.6, inciso **A**), mientras que aquellos creciendo en medio con aminoácidos presentan porcentajes de inhibición por arriba del 50% tanto para co-cultivos como monocultivos (Figuras: 4.1, 4.2, 4.5 y 4.6, incisos **B**, **C** y **D**).

Otro factor importante a considerar al terminar los experimentos con antibióticos fue la abundancia de cada fenotipo, el porcentaje final nos puede indicar si al finalizar los tratamientos hay exclusión entre las cepas, es decir si las condiciones fueron tales que favorecen solo la presencia de una de las cepas lo que rompe la interacción previamente descrita. En ambos co-cultivos observamos que en medio con aminoácidos y cloranfenicol el fenotipo auxótrofo a leucina ($\Delta leuB$) alcanzo un porcentaje de abundancia entre el 80 y 99% (Figuras 4.3 y 4.4), sin embargo en ninguno de los tratamientos alcanzamos la extinción de un fenotipo, mientras que en al final de los tratamientos con ciprofloxacino la proporción entre fenotipos se mantuvo con mayores fluctuaciones (Figuras 4.7 y 4.8), lo cual puede relacionarse con las diferencias en efecto de los antibióticos.

Capítulo 5

Cambios en la velocidad de crecimiento que modifican los perfiles de interacción

5.1 Introducción

Para estudiar con mayor detalle el efecto de los antibióticos en diferentes perfiles de interacción medimos la cinética de crecimiento de nuestros co-cultivos en las 4 condiciones de medio previamente utilizadas y calculamos la velocidad máxima de crecimiento alcanzada bajo cada condición, la abundancia de cada fenotipo y de manera cualitativa la presencia de ambos fenotipos al final de los tratamientos.

En los resultados presentados en el capítulo anterior (Capítulo 4) observamos que aquellos co-cultivos creciendo en nulas concentraciones de aminoácidos alcanzan menor densidad óptica que aquellos creciendo en medio con aminoácidos, sin embargo la diferencia en el porcentaje de inhibición entre medio sin aminoácidos y medio con aminoácidos es significativa en muchas de las concentraciones de antibióticos utilizadas (Tablas: 8.17, 8.18, 8.19, 8.20, 8.21 8.22, 8.23 y 8.24).

Se conoce además que algunos antibióticos en dosis bajas pueden tener efecto en la velocidad de crecimiento de una población bacteriana (Goh et al. (2002); Greulich et al. (2015, 2017); Harvey and Koch (1980)), sin embargo poco se sabe del efecto que tienen en el contexto de una comunidad, nuestra hipótesis es que la velocidad de crecimiento disminuye en perfiles cooperativos favoreciendo así la tolerancia al antibiótico, siendo esta una de las tres estrategias previamente reportadas que favorecen la resistencia a antibióticos en comunidades (Vega and Gore (2014); Meredith et al. (2015)).

5.2 Cinéticas de crecimiento

Utilizando medio mínimo sin aminoácidos medimos por 24 horas el crecimiento de los co-cultivos $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ y $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en dosis respuesta con 9 concentraciones de cloranfenicol, 9 concentraciones de ciprofloxacino y en medio mínimo M9 con concentraciones bajas, medias y altas de aminoácidos (los aminoácidos correspondientes para cada co-cultivo) utilizando 4 concentraciones de cloranfenicol y 4 concentraciones de ciprofloxacino (Métodos 7.6).

5.2.1 Cinética de crecimiento en medio mínimo con cloranfenicol

En las Figuras 5.1 y 5.2 (A) observamos bajas densidades ópticas en ambos co-cultivos, al final de las 24 horas no alcanzaron una fase estacionaria en comparación con la observada en las condiciones de medio con aminoácidos sin antibiótico en donde ambos co-cultivos alcanzan una densidad óptica máxima de crecimiento aproximadamente a las 14 horas y una fase estacionaria hasta el final del experimento (B, C & D).

Observamos además que las cinéticas en medio con aminoácidos y cloranfenicol en concentración a 3 y 4 μg por ml tienen un comportamiento muy semejante a las cinéticas de medio sin aminoácidos, esta similitud es importante puesto que en experimentos previos observamos en las mismas condiciones altos porcentajes de inhibición al final del experimento (Figuras 8.8 y 8.20, Capítulo 4), esto puede indicar que en presencia de aminoácidos hay un porcentaje de la población que es inhibida y el porcentaje restante es capaz de tolerar la presencia del antibiótico.

Cinéticas de crecimiento

Cinéticas de crecimiento co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio con cloranfenicol

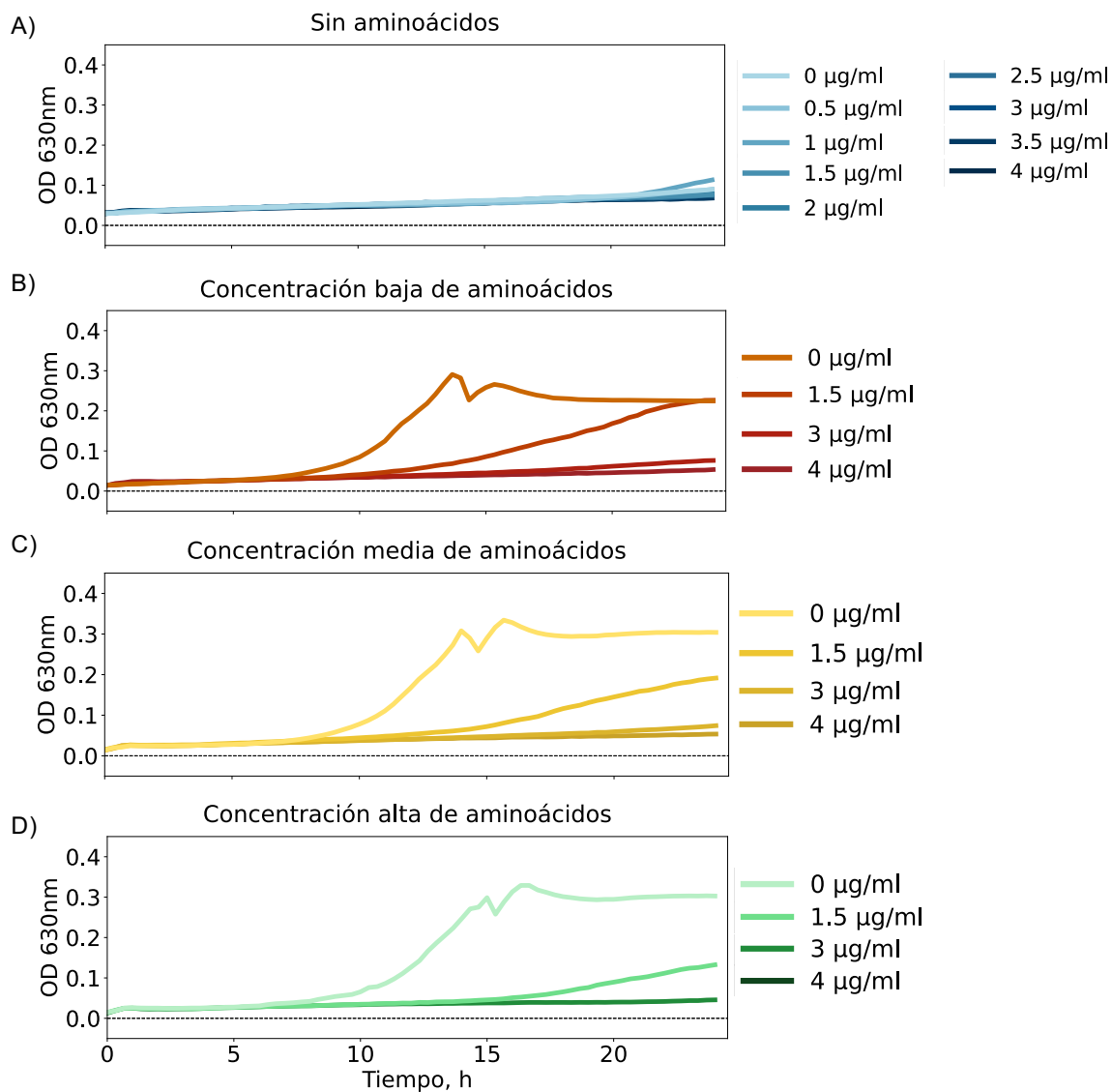


Figura 5.1: *Cinética de crecimiento del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$. Dosis respuesta a cloranfenicol en medio mínimo M9 con concentraciones nula (A), baja (B), media (C) y alta (D) de aminoácidos, cada línea representa el promedio de las réplicas (N=4).*

Cinéticas de crecimiento co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio con cloranfenicol

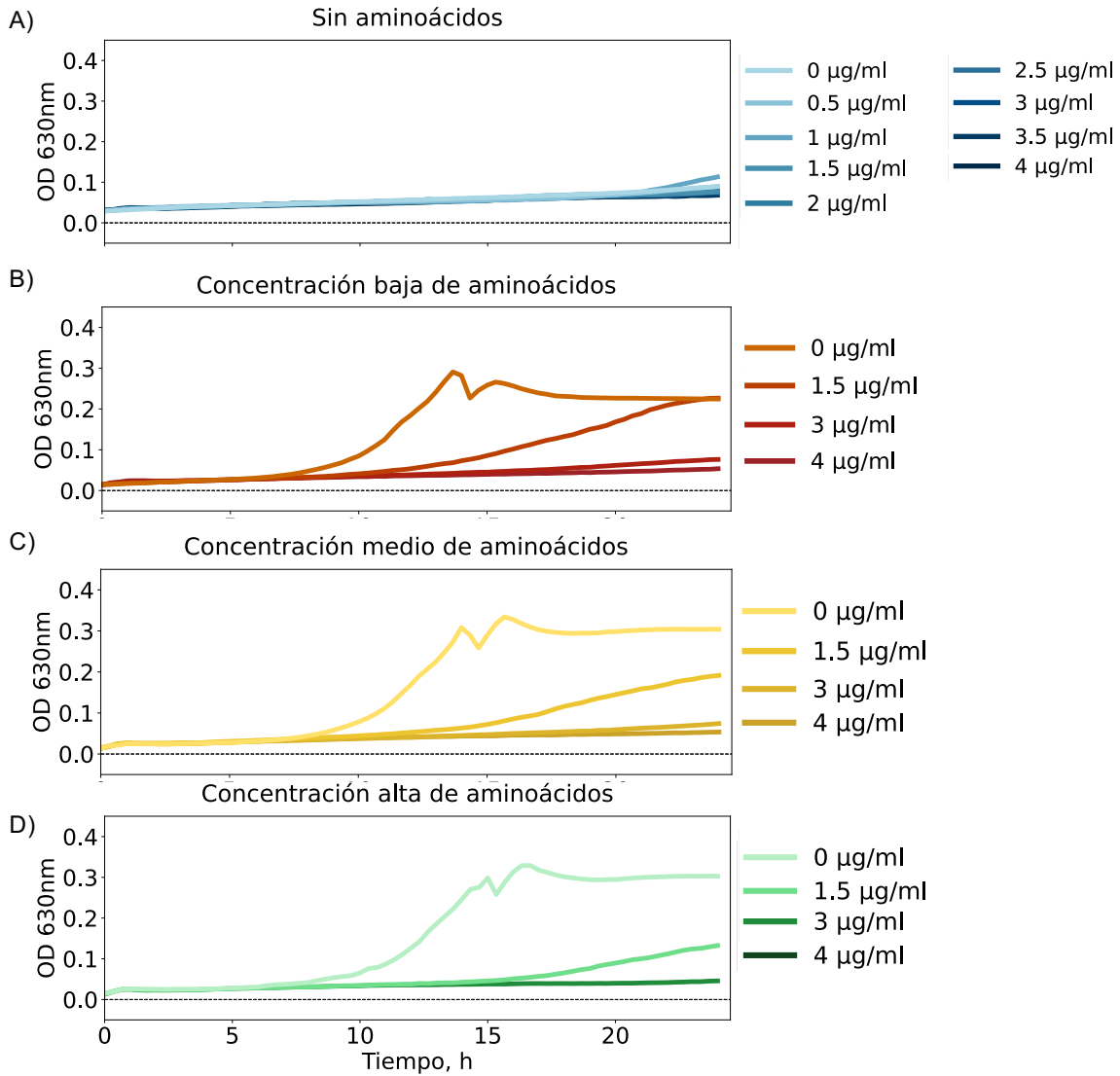


Figura 5.2: Cinética de crecimiento del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$. Dosis respuesta a cloranfenicol en medio mínimo M9 con concentraciones nula (A), baja (B), media (C) y alta (D) de aminoácidos, cada línea representa el promedio de las réplicas (N=4).

5.2.2 Cinética de crecimiento en medio mínimo con ciprofloxacino

En las Figuras 5.3 y 5.4 observamos que en condiciones sin aminoácidos ambos co-cultivos alcanzan muy baja densidad óptica siendo el punto final de la curva el más alto de crecimiento (incisos A), sin embargo el crecimiento de ambos co-cultivos en medios con aminoácidos en todas las concentraciones de antibiótico utilizadas el crecimiento fue muy cercano (incisos B, C & D). Bajo las mismas concentraciones de antibiótico ambos co-cultivos alcanzaron porcentajes de inhibición desde el 40 hasta el 70 %.

Cinéticas de crecimiento

Cinéticas de crecimiento co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio con ciprofloxacino

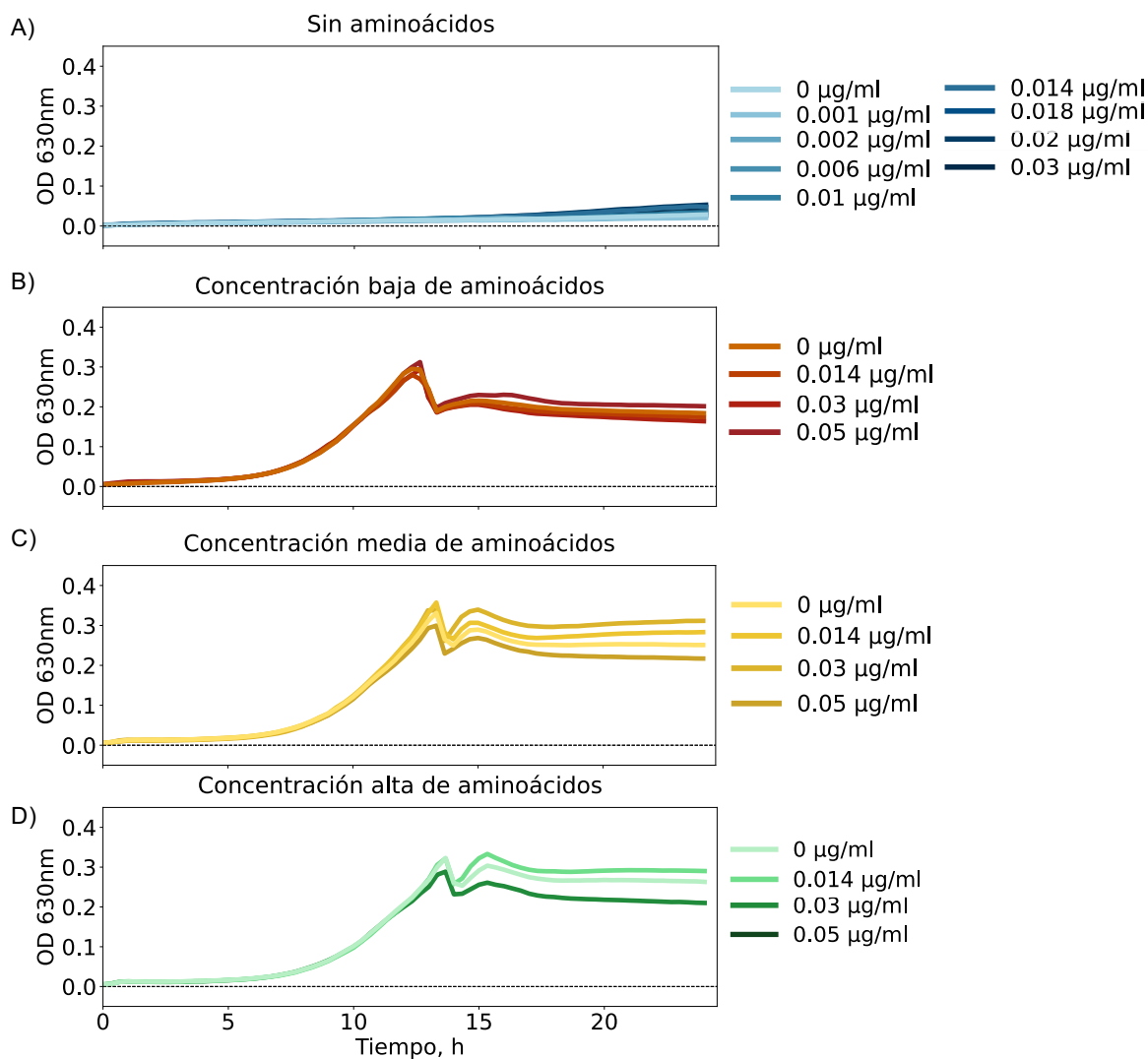


Figura 5.3: *Cinética de crecimiento del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$. Dosis respuesta a ciprofloxacino en medio mínimo M9 con concentraciones nula (A), baja (B), media (C) y alta (D) de aminoácidos, cada línea representa el promedio de las réplicas (N=4).*

Cambios en la velocidad de crecimiento asociados a los diferentes tratamientos de aminoácidos y antibióticos

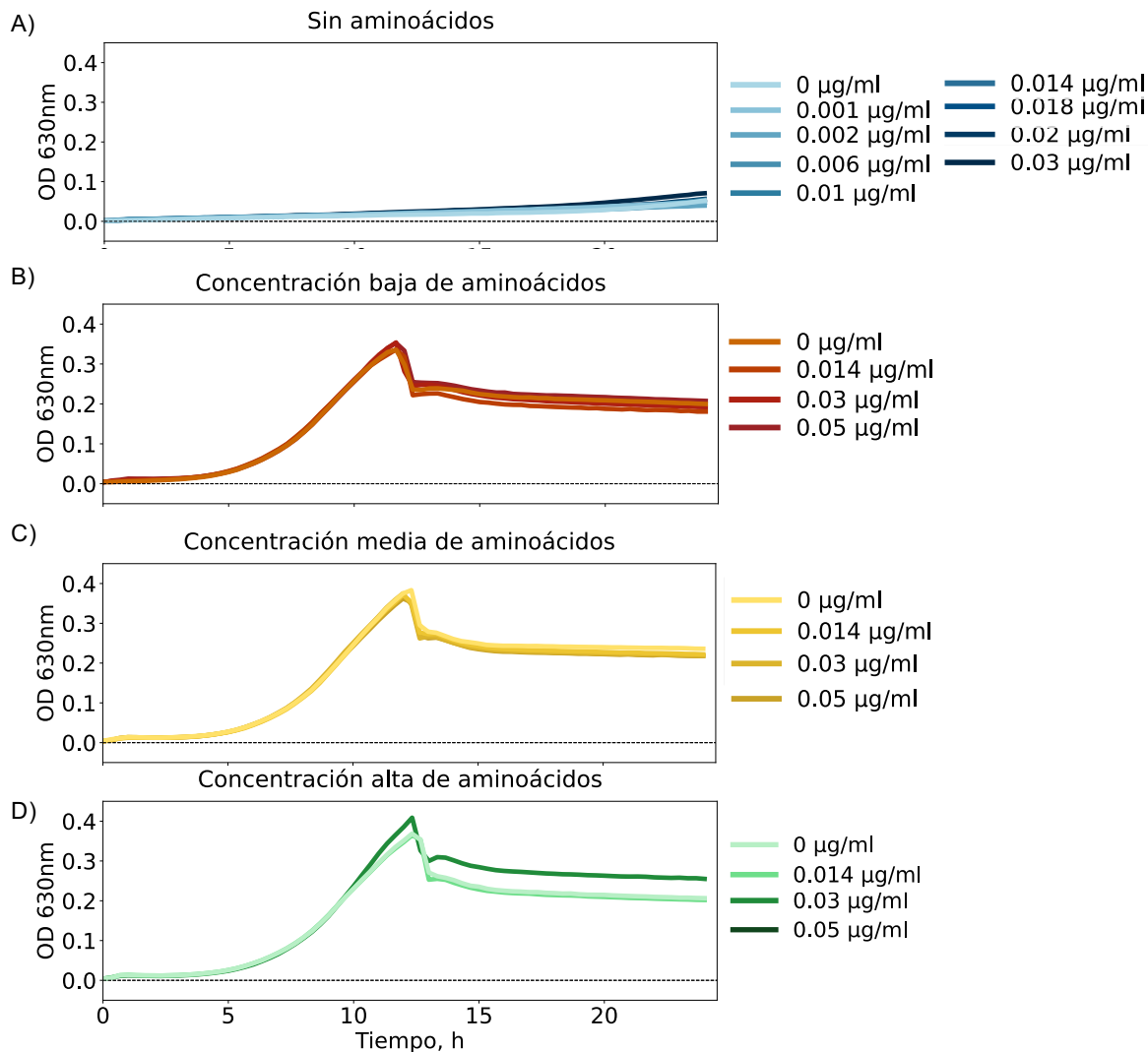


Figura 5.4: *Cinética de crecimiento del co-cultivo ΔleuB & ΔpheA . Dosis respuesta a ciprofloxacino en medio mínimo M9 con concentraciones nula (A), baja (B), media (C) y alta (D) de aminoácidos, cada línea representa el promedio de las réplicas (N=4).*

5.3 Cambios en la velocidad de crecimiento asociados a los diferentes tratamientos de aminoácidos y antibióticos

5.3.1 Velocidad de crecimiento en medio mínimo con cloranfenicol

Utilizando los datos obtenidos de cada cinética medimos la velocidad de crecimiento utilizando un algoritmo basado en procesos Gaussianos (Métodos: 7.7) (Swain et al. (2016)). En las Figuras 5.5 y 5.6 se observa la velocidad máxima de crecimiento

Cambios en la velocidad de crecimiento asociados a los diferentes tratamientos de aminoácidos y antibióticos

(V_{max}) de los co-cultivos creciendo en medio sin aminoácidos y con aminoácidos y cloranfenicol, en el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ observamos que la velocidad de crecimiento en aquellas condiciones con aminoácidos disminuye una vez que hay antibiótico en el medio, lo cual es consistente con los resultados observados en las cinéticas de crecimiento (Figuras 5.1), en la Figura 5.6 observamos una disminución en la velocidad de crecimiento en aquellas condiciones con aminoácidos y antibiótico que se acerca a la velocidad alcanzada medio sin aminoácidos, la cual se mantiene constante y baja.

V_{max} del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio con cloranfenicol

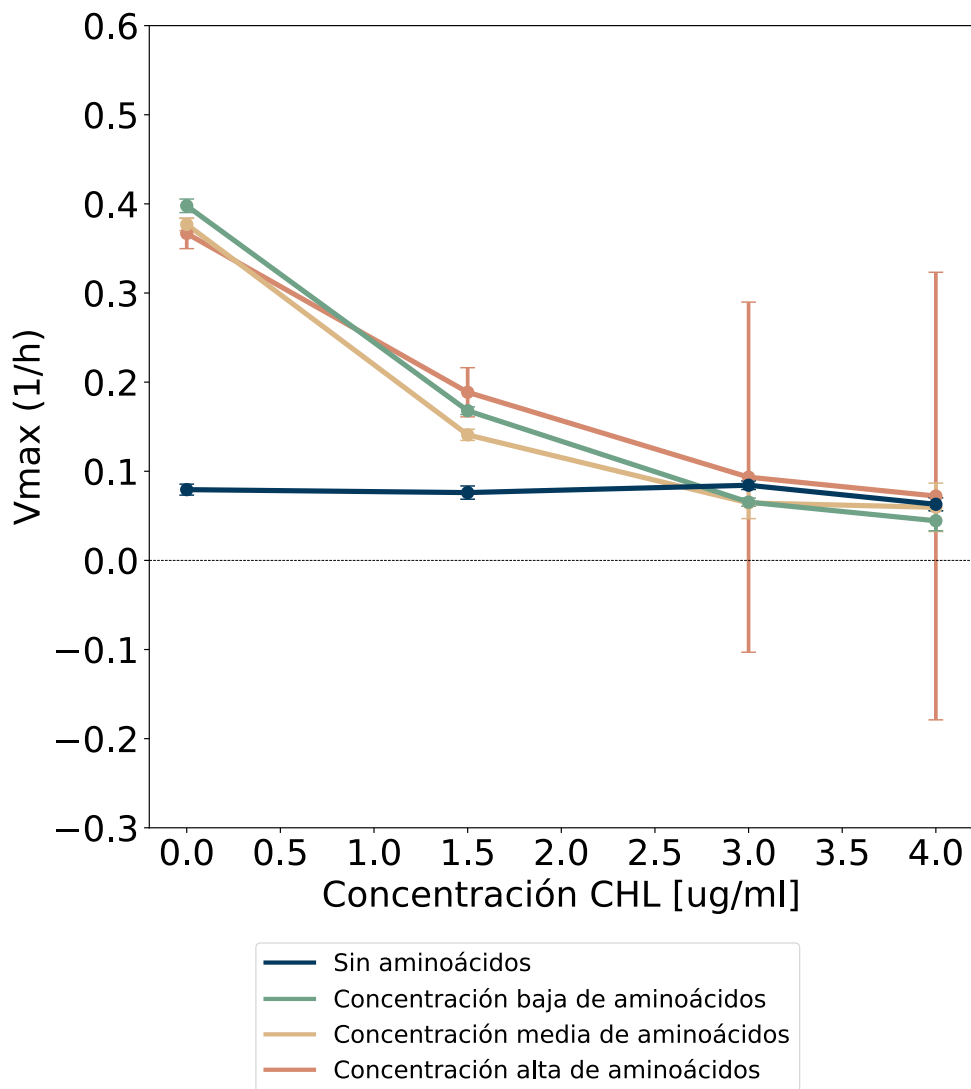


Figura 5.5: *Velocidad máxima de crecimiento del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio con cloranfenicol.* Se presenta al medio con concentraciones de aminoácidos, nula en azul, baja en verde, media en amarillo y alta en naranja, cada punto representa la velocidad máxima calculada para todas las réplicas del experimento y las barras la desviación estándar (N=8 medio sin aminoácidos, N=4 medios con aminoácidos).

Vmax del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio con cloranfenicol

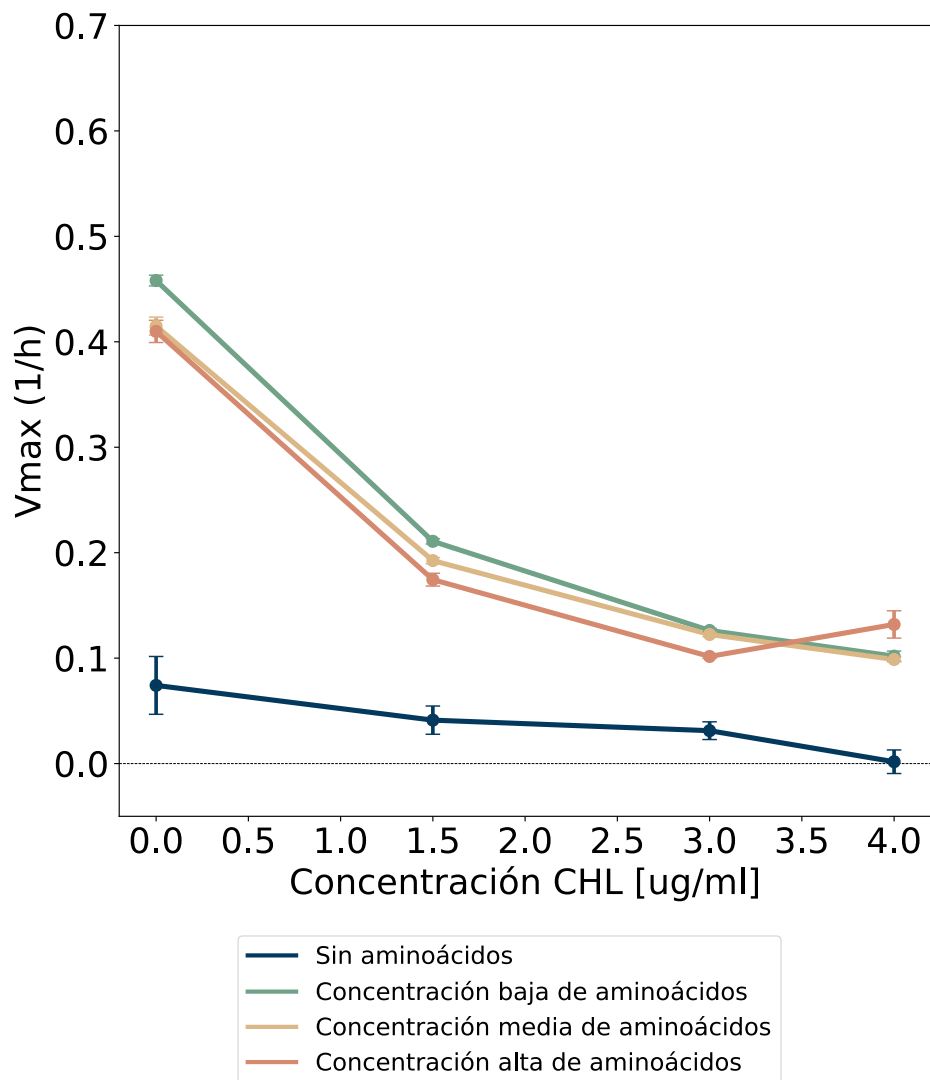


Figura 5.6: *Velocidad máxima de crecimiento del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio con cloranfenicol.* Se presenta al medio con concentraciones de aminoácidos, nula en azul, baja en verde, media en amarillo y alta en naranja, cada punto representa la velocidad máxima calculada para todas las réplicas del experimento y las barras la desviación estándar (N=8 medio sin aminoácidos, N=4 medios con aminoácidos).

5.3.2 Velocidad de crecimiento en medio mínimo con ciprofloxacino

Siguiendo el mismo protocolo de la sección anterior calculamos la velocidad de crecimiento en 4 condiciones de medio mínimo y 4 concentraciones de antibiótico. En las Figuras 5.7 y 5.8 observamos que para ambos co-cultivos la velocidad máxima de

Cambios en la velocidad de crecimiento asociados a los diferentes tratamientos de aminoácidos y antibióticos

crecimiento en medio sin aminoácidos se mantiene baja y constante, si embargo en condiciones con aminoácidos la velocidad se mantiene constante entre medio con y sin antibiótico lo cual puede estar indicando que la población inhibida libera más recursos al medio, los cuales pueden ser utilizados por el resto de la población no inhibida.

Para evaluar esta hipótesis comparamos el crecimiento de ambos co-cultivos en medio rico LB y calculamos la velocidad de crecimiento (Sección 5.3.3).

Vmax del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio con ciprofloxacino

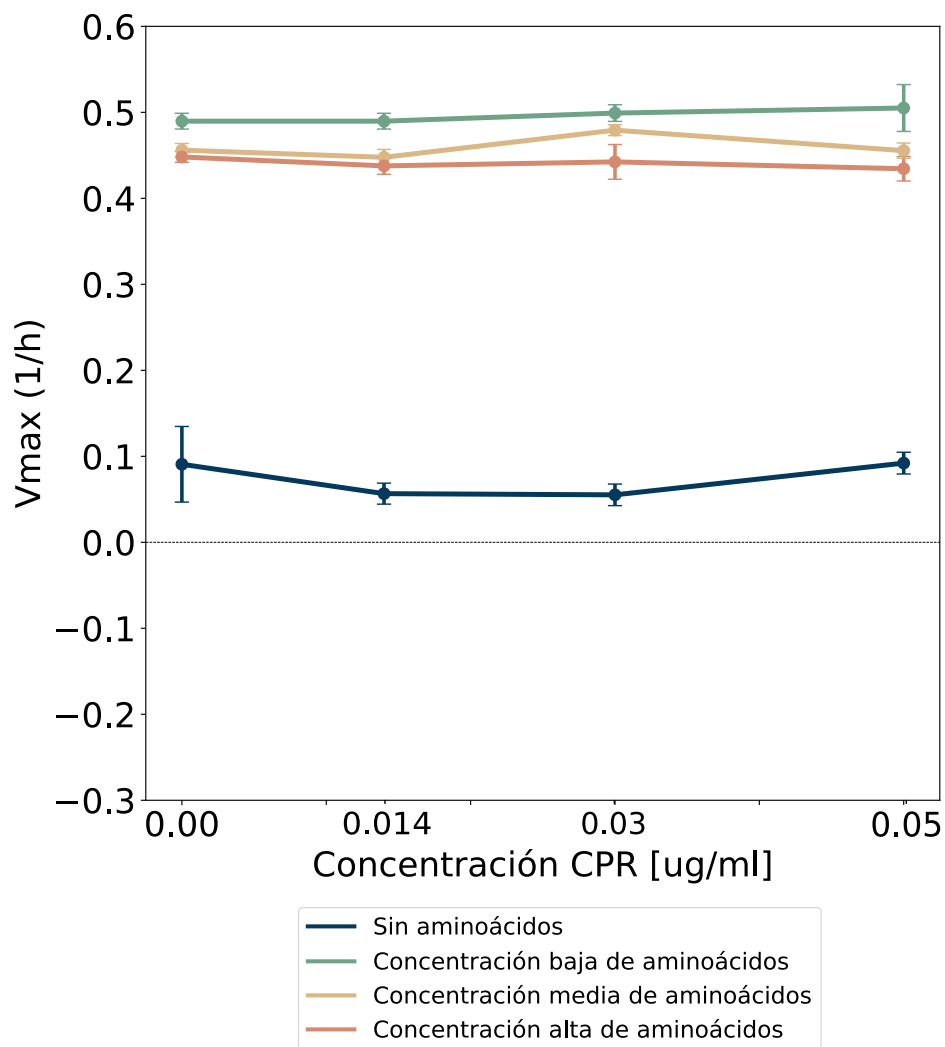


Figura 5.7: Velocidad máxima de crecimiento del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio con ciprofloxacino. Se presenta al medio con concentraciones de aminoácidos, nula en azul, baja en verde, media en amarillo y alta en naranja, cada punto representa la velocidad máxima calculada para todas las réplicas del experimento y las barras la desviación estándar (N=8 medio sin aminoácidos, N=4 medios con aminoácidos).

Vmax del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio con ciprofloxacino

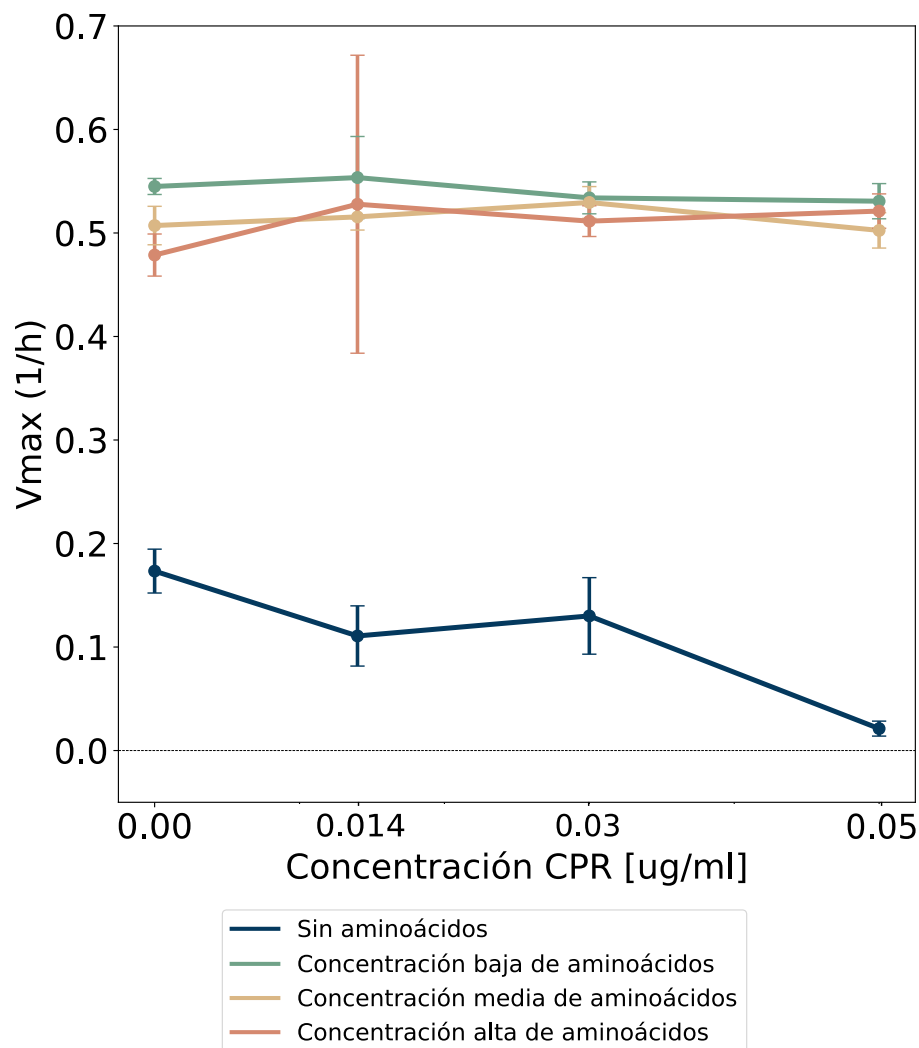


Figura 5.8: Velocidad máxima de crecimiento del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio con ciprofloxacino. Se presenta al medio con concentraciones de aminoácidos, nula en azul, baja en verde, media en amarillo y alta en naranja, cada punto representa la velocidad máxima calculada para todas las réplicas del experimento y las barras la desviación estándar (N=8 medio sin aminoácidos, N=4 medios con aminoácidos).

5.3.3 Curvas de crecimiento y velocidad de crecimiento en medio rico con ciprofloxacino

Utilizando las mismas concentraciones de ciprofloxacino evaluamos el crecimiento de ambos co-cultivos en medio rico LB, utilizar este medio nos permite observar el crecimiento en un medio ambiente sin limitación de recursos, en la Figura 5.9 observa-

Cambios en la velocidad de crecimiento asociados a los diferentes tratamientos de aminoácidos y antibióticos

mos que el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ alcanza puntos con alta densidad óptica (aprox. 1.2) sin antibiótico, sin embargo en medio con antibiótico la densidad óptica disminuye a 0.4, densidad óptica cercana a la observada en medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (Figura 8.11).

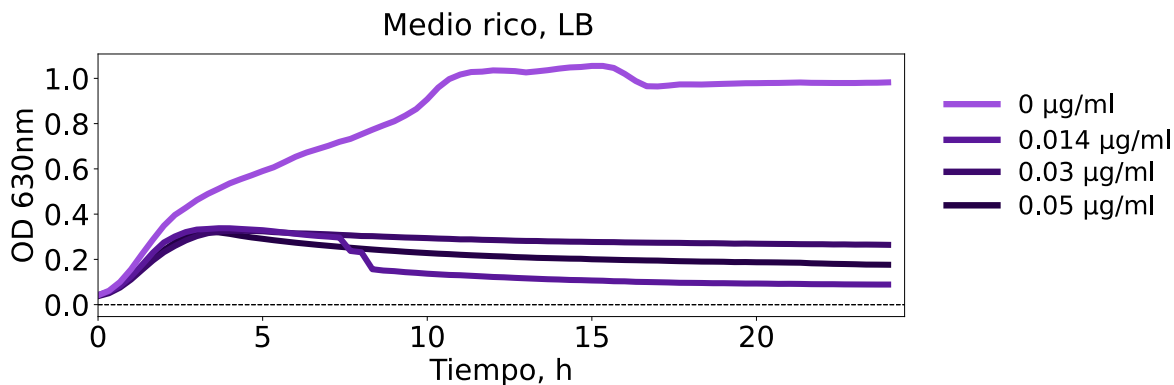


Figura 5.9: Cinética de crecimiento del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio rico, LB con ciprofloxacino (N=4).

De manera semejante en la Figura 5.10 observamos un decremento en el crecimiento del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio LB con antibiótico siendo la densidad óptica cerca a la alcanzada en medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (Figura 8.23).

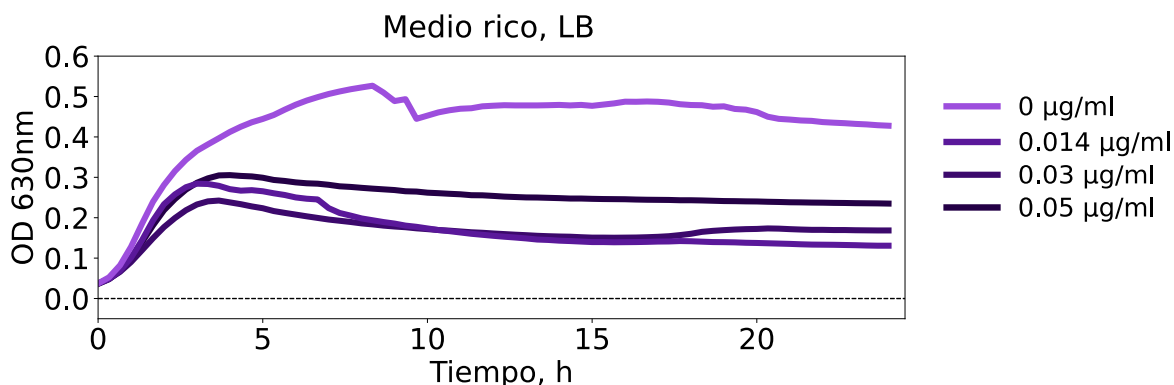


Figura 5.10: Cinética de crecimiento del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio rico, LB con ciprofloxacino (N=4).

Utilizando los datos de densidad óptica de ambos co-cultivos calculamos la velocidad de crecimiento (Métodos 7.7 y observamos (Figura 5.11 y 5.12) que la velocidad de crecimiento disminuye en medio ambiente con antibiótico, sin embargo la velocidad máxima en este medio se mantiene más baja a la observada en medio con aminoácidos.

Cambios en la velocidad de crecimiento asociados a los diferentes tratamientos de aminoácidos y antibióticos

V_{max} del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio LB con ciprofloxacino

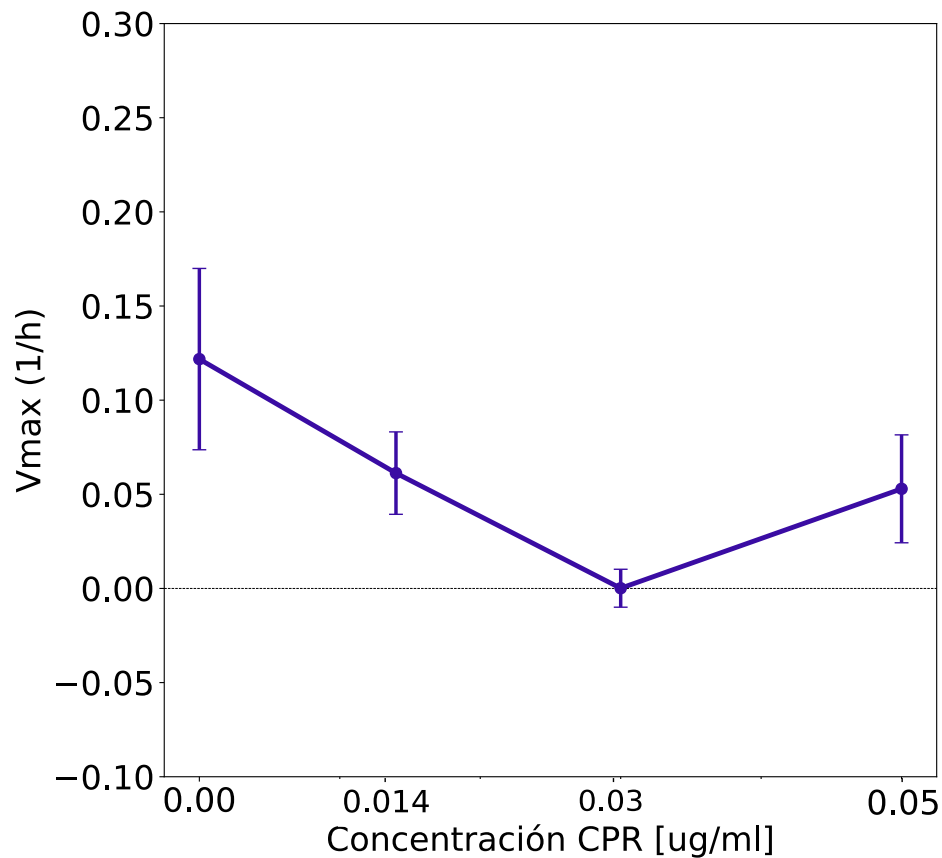


Figura 5.11: V_{max} del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio rico, LB con ciprofloxacino (N=4).

Vmax del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio LB con ciprofloxacino

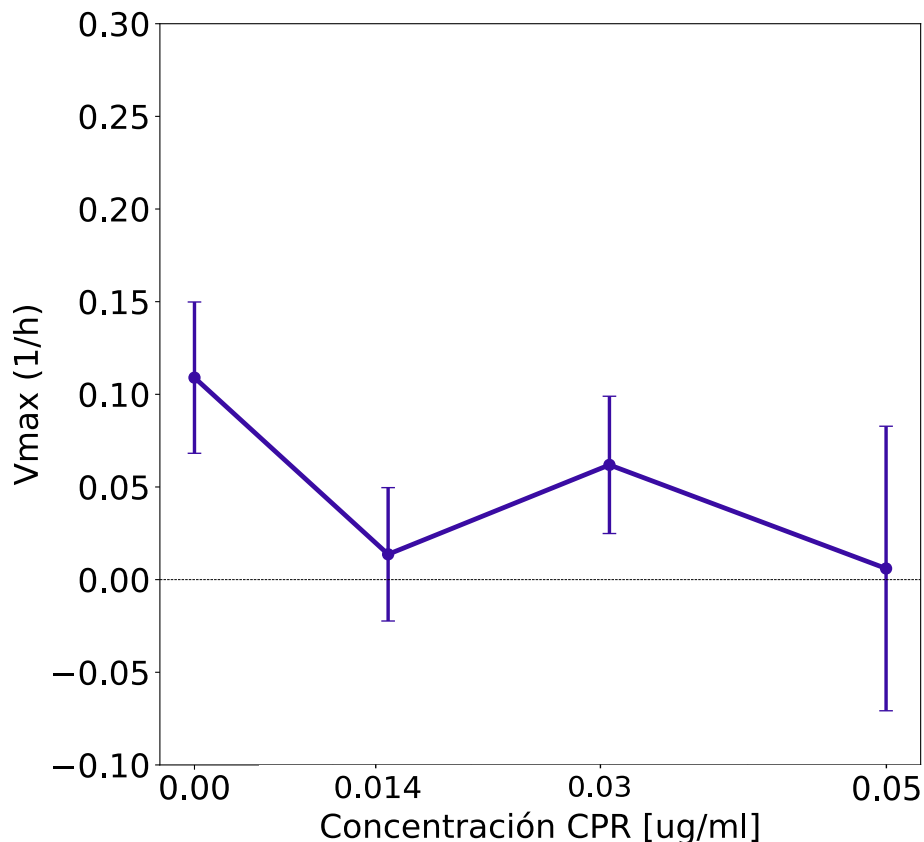


Figura 5.12: V_{max} del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ (LF) en medio rico, LB con ciprofloxacino (N=4).

Posterior a las cinéticas de crecimiento recuperamos $1 \mu\text{l}$ de muestra y confirmamos la presencia de células viables en la mayoría de las condiciones, algunas de las cuales presentaron saturación en la placa (Material suplementario, Tablas: 8.31, 8.32, 8.33 y 8.34), el resto de las muestras fueron utilizadas para cuantificar la abundancia de cada fenotipo (Material suplementario 8.5.2).

5.4 Discusión

Como observamos en el capítulo anterior (Capítulo 4) la presencia de antibióticos a dosis sub-letales favorece el crecimiento de ambos co-cultivos en condiciones sin aminoácidos, con un aumento en el porcentaje de inhibición en presencia de aminoácidos. Analizando el crecimiento en cinética confirmamos que la velocidad de crecimiento de los co-cultivos varía de acuerdo a las condiciones del ambiente y el comportamiento entre los antibióticos utilizados es diferente.

Discusión

En tratamientos con cloranfenicol, la velocidad de crecimiento disminuye en combinaciones de medio con aminoácidos y antibiótico, en ambos co-cultivos alcanzando velocidades máximas muy cercanas a la velocidad de los co-cultivos sin aminoácidos (Figuras: 5.5 y 5.6), en conjunto con la presencia de ambos fenotipos en las pruebas de viabilidad estos resultados refuerzan nuestra hipótesis: *el porcentaje de la población que no es inhibida tiene un comportamiento tipo cooperación que le permite tolerar la presencia del antibiótico*. En cambio, es importante resaltar que las cinéticas con aminoácidos y ciprofloxacino no siguen el comportamiento de las cinéticas en medio sin aminoácidos y ciprofloxacino (ni a las de cloranfenicol), dicha diferencia es relevante si consideramos el mecanismo de acción de cada antibiótico.

Por lo tanto, consideramos que el efecto observado en cloranfenicol es relacionado a una modificación en el metabolismo que favorece dicha tolerancia, como una redistribución del proteoma (Scott et al. (2010)) y que en el caso de ciprofloxacino la dinámica se vea regulada por la cantidad de recursos liberados al ambiente por el porcentaje de la población inhibida.

Comparando los resultados obtenidos entre las cinéticas con medio mínimo más aminoácidos versus las cinéticas en medio rico (LB), observamos que la cantidad de recursos en el ambiente juega un papel importante en el establecimiento de la dinámica de crecimiento de la comunidad, siendo importante resaltar que en medio rico las concentraciones de recurso pueden ser excesivas favoreciendo así la exclusión de la cepa con una menor velocidad de crecimiento, en cambio en medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino la cantidad de recursos puede ser mayor en contraste al medio sin ciprofloxacino o con cloranfenicol donde las concentraciones de recursos liberadas al medio son más controladas que las presentes en LB.

Si bien los mecanismos por los cuales se llegan a porcentajes de inhibición y densidades ópticas semejantes en ambos co-cultivos bajo ambos tratamientos pueden ser distintos, el resultado ecológico es cualitativamente similar, con dichos resultados podemos afirmar que los mecanismos de acción son poco relevantes al resultado final de los co-cultivos, los cuales presentan dinámicas semejantes a sistemas con tolerancia a antibióticos, cuyas características indican un cambio de interacción de competencia a cooperación, teniendo como costo una velocidad de crecimiento baja en el caso de cloranfenicol y un gran porcentaje de la población perdida por inhibición.

Capítulo 6

Susceptibilidad a antibióticos en un sistema con bienes públicos

6.1 Introducción

Dentro de las comunidades microbianas la presencia de cepas con mecanismos de resistencia a antibióticos puede tener diferentes efectos en la dinámica de la comunidad, diversos estudios han encontrado mecanismos para contender con el estrés ambiental a partir de una respuesta colectiva. En 2018 Adamowicz *et al* presentan la hipótesis del miembro más débil ("*the weakest-link hypothesis*"), en la cuál se expresa que cuando las especies dependen metabólicamente entre ellas la concentración mínima inhibitoria (MIC) de todas las especies bajará a la MIC de la especie más susceptible, y demostraron que la susceptibilidad a los antibióticos tetraciclina y ampicilina cambia si los miembros de la comunidad se encuentran en un ambiente que favorece interacciones cooperativas (Adamowicz *et al.* (2018)).

Los bienes públicos han sido descritos en diversos sistemas como aquellas moléculas o enzimas producidas por una parte de la comunidad que son exportadas al medio ambiente y pueden ser utilizadas por el resto de los integrantes (Cavaliere *et al.* (2017)), algunas de estas moléculas pueden jugar papeles importantes en la dinámica de la comunidad puesto que pueden ser utilizadas como nutrientes para ciertos miembros de la misma o moléculas degradadoras de compuestos complejos (Niehaus *et al.* (2019)) o que generan estrés a la comunidad tales como los antibióticos. Los bienes públicos puede favorecer la presencia de fenotipos tramposos (*cheaters*), los cuales se caracterizan por consumir bienes del ambiente sin producir nada a cambio, es decir, viven a expensas de los fenotipos productores.

La presencia de antibióticos en sistemas naturales ha sido estudiada desde diversos ángulos, sin embargo poco se sabe del papel de estos a nivel ecológico y del efecto que tiene la presencia de fenotipos resistentes en la dinámica de una comunidad, en esta sección evaluamos si enzimas como las beta-lactamasas pueden actuar como bienes públicos favoreciendo la degradación de ampicilina en un sistema con interdependencias metabólicas obligadas,

6.2 Susceptibilidad a ampicilina

Transformamos con el plásmido pBGT TEM-1 a cuatro cepas con diferente auxotrofia ($\Delta ilvA$, $\Delta tyrA$, $\Delta pheA$ y $\Delta leuB$), posteriormente comparamos el crecimiento

Susceptibilidad a ampicilina

y el porcentaje de inhibición en ampicilina de las cepas con y sin plásmido. Aquellas cepas con plásmido tienen resistencia a altas concentraciones de ampicilina (Figuras: 6.1, 6.2, 6.3 y 6.4 A), la cepa $\Delta ilvA$ presenta resistencia a algunas concentraciones a lo largo de la curva de crecimiento (6.1 B), mientras que las cepas $\Delta leuB$ y $\Delta tyrA$ (Figura 6.2 y 6.4 B) tienen un crecimiento al final de la cinética. Tal crecimiento puede relacionarse al porcentaje de la población que tolera el antibiótico y es capaz de crecer una vez que hay degradación del mismo.

Calculamos el porcentaje de inhibición de cada monocultivo utilizando la densidad óptica a las 17 horas, tiempo previo al tiempo donde la mayoría de las cepas comenzó a decrecer (Tablas 8.35, 8.36, 8.37 y 8.38).

Susceptibilidad a ampicilina

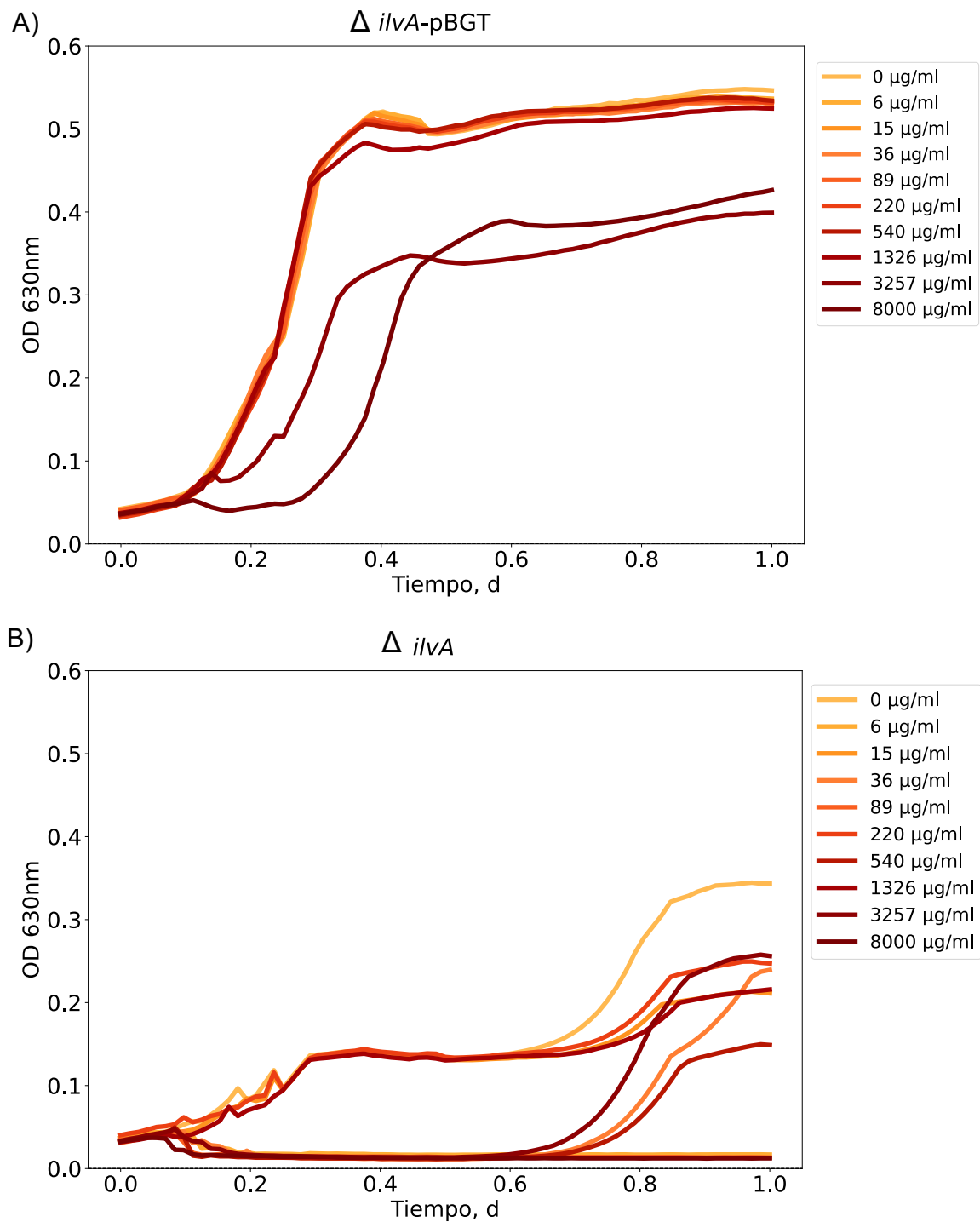


Figura 6.1: Cinéticas de crecimiento de monocultivos **A)** $\Delta ilvA$ -pBGT y **B)** $\Delta ilvA$ en medio rico (LB) con ampicilina, cada línea representa el promedio del crecimiento en cada concentración N=4)

Susceptibilidad a ampicilina

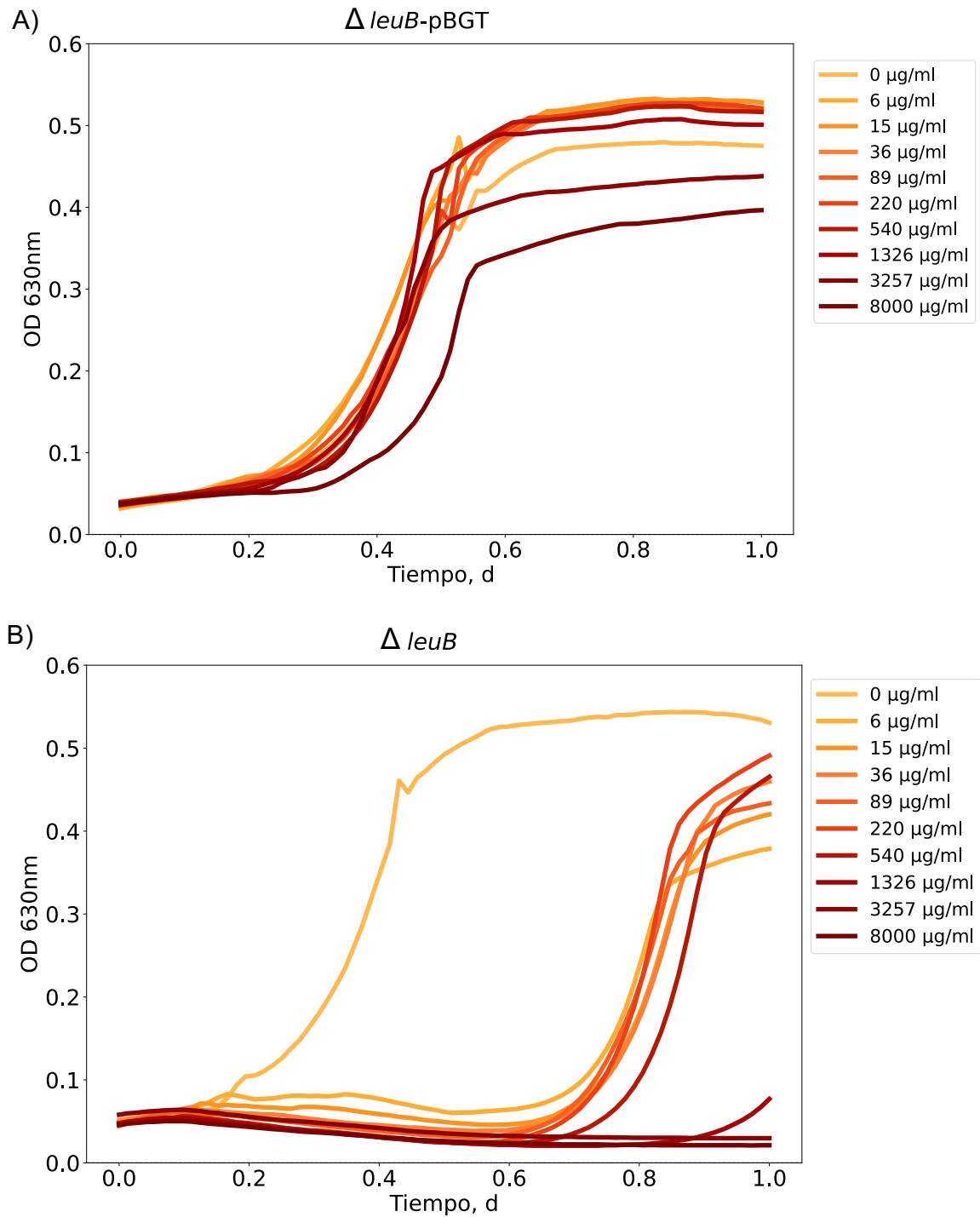


Figura 6.2: Cinéticas de crecimiento de monocultivos **A)** $\Delta leuB$ -pBGT y **B)** $\Delta leuB$ en medio rico (LB) con ampicilina, cada línea representa el promedio del crecimiento en cada concentración N=4)

Susceptibilidad a ampicilina

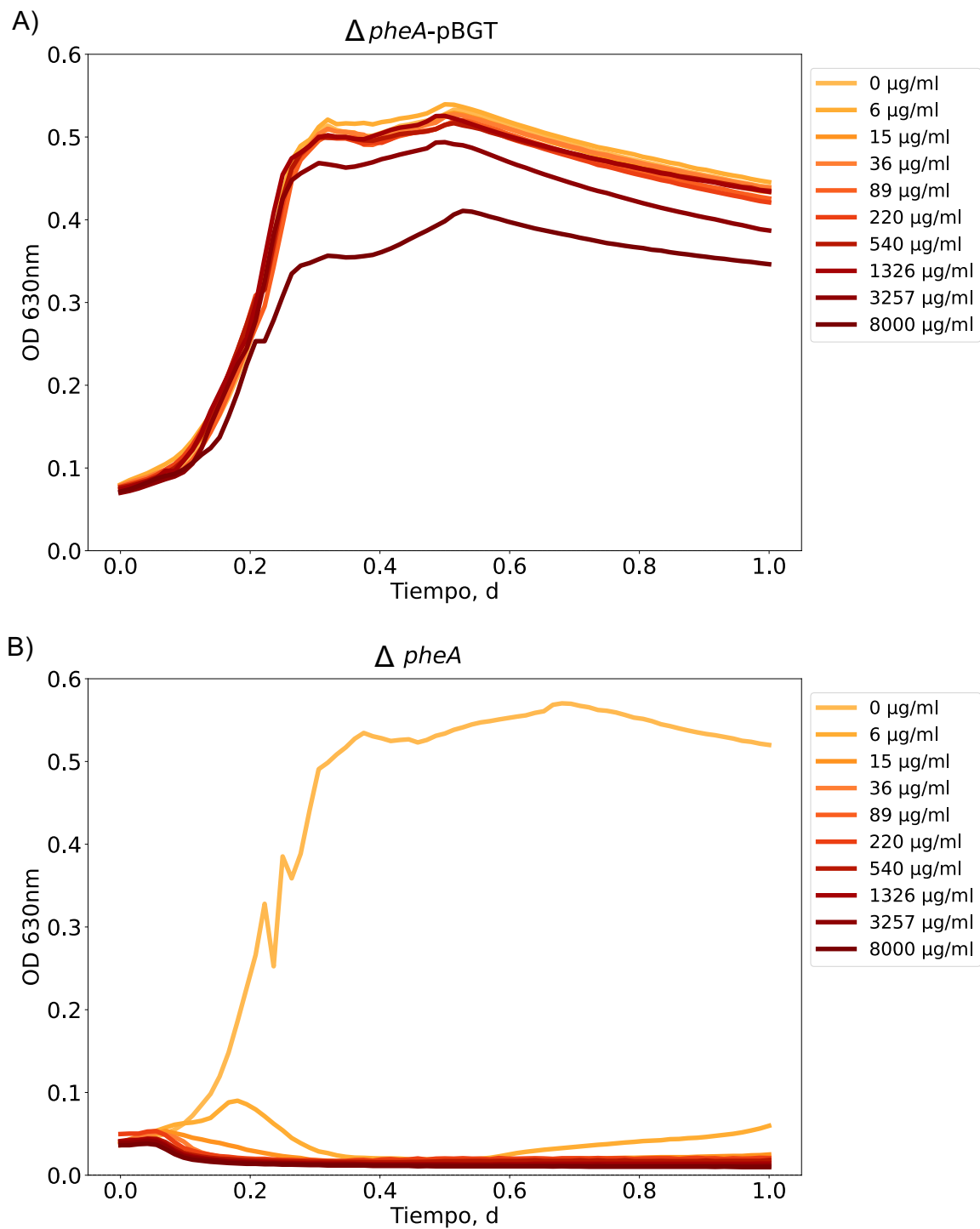


Figura 6.3: *Cinéticas de crecimiento de monocultivos A) $\Delta pheA$ -pBGT y B) $\Delta pheA$ en medio rico (LB) con ampicilina, cada línea representa el promedio del crecimiento en cada concentración N=4)*

Susceptibilidad a ampicilina

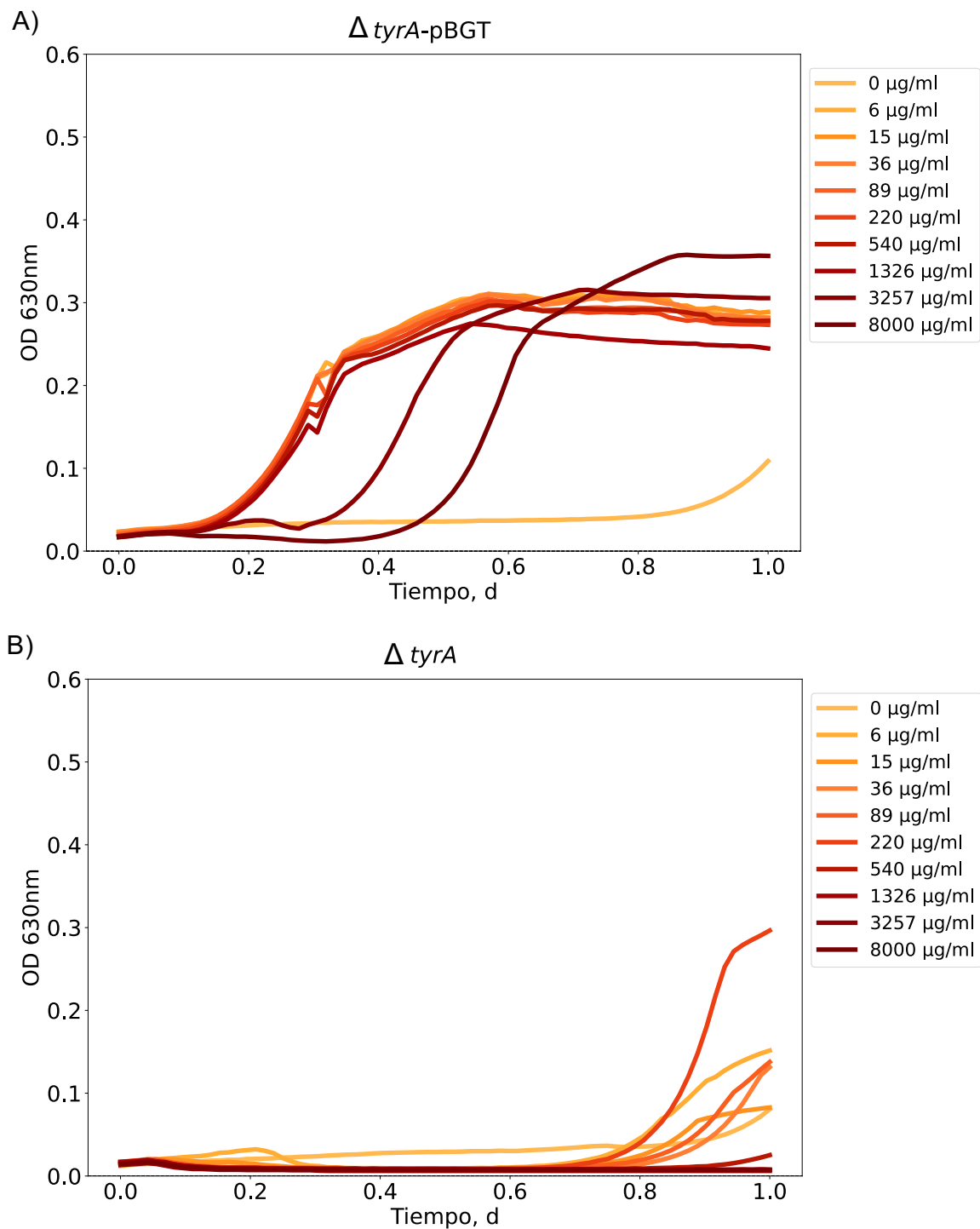


Figura 6.4: *Cinéticas de crecimiento de monocultivos A) $\Delta tyrA$ -pBGT y B) $\Delta tyrA$ en medio rico (LB) con ampicilina, cada línea representa el promedio del crecimiento en cada concentración N=4)*

6.3 Bienes públicos en un sistema con cepas susceptibles y resistentes

Para evaluar la dinámica de crecimiento y la respuesta colectiva a diferentes niveles de estrés, utilizamos un cultivo mixto compuesto por cepas con fenotipos susceptibles ($\Delta ilvA$ y $\Delta tyrA$) y resistentes ($\Delta ilvA$ -pBGT y $\Delta tyrA$ -pBGT) en el cual medimos las diferencias en densidad óptica, en viabilidad y cuantificamos los cambios en la abundancia final en medio mínimo con diferentes concentraciones de aminoácidos y medio rico LB bajo tres concentraciones de ampicilina: nula, baja [$6 \mu\text{g/ml}$] y alta [$89 \mu\text{g/ml}$] (Métodos 7.9), dichas concentraciones se establecieron a partir de la dosis respuesta de monocultivos.

Utilizamos ensayos de invasión comenzando con 20% de células con fenotipo resistente ($\Delta ilvA$ -pBGT y $\Delta tyrA$ -pBGT) y 80% de células con fenotipo susceptible a ampicilina $\Delta ilvA$ y $\Delta tyrA$, medimos densidad óptica durante 24 horas y cada 2 horas hasta las 12 horas medimos el número de células de cada fenotipo y la relación entre resistentes y susceptibles (Métodos 7.9).

En la Figura 6.5 observamos la cinética de crecimiento de nuestro cultivo mixto en las 12 condiciones evaluadas. En medio sin aminoácidos (**A**) observamos densidades ópticas muy cercanas a cero en las tres concentraciones de ampicilina utilizadas, sin embargo en aquellas condiciones con baja (**B**) y alta (**C**) concentración de aminoácidos se alcanzan densidades ópticas cercanas a 0.2 y en medio rico (**D**) en baja y nula concentración de ampicilina el promedio de densidad óptica se acerca a 0.4, estos resultados confirman que la presencia de aminoácidos en el medio favorece el crecimiento de cultivos con cepas auxótrofas a aminoácidos y que de acuerdo a las concentraciones de los mismos la dinámica de crecimiento se verá afectada.

En experimentos previos (Figura 2.2 capítulo 2) se observa que la dinámica de crecimiento del co-cultivo $\Delta ilvA$ - $\Delta tyrA$ es plana, por lo tanto es posible que en condiciones sin aminoácidos el co-cultivo no sea capaz de mantenerse, es decir, las concentraciones de aminoácidos producidas por ambas cepas no son las suficientes para mantener el crecimiento de ambas o la competencia por recursos es tal que ninguna de las dos cepas es capaz de crecer a altas densidades.

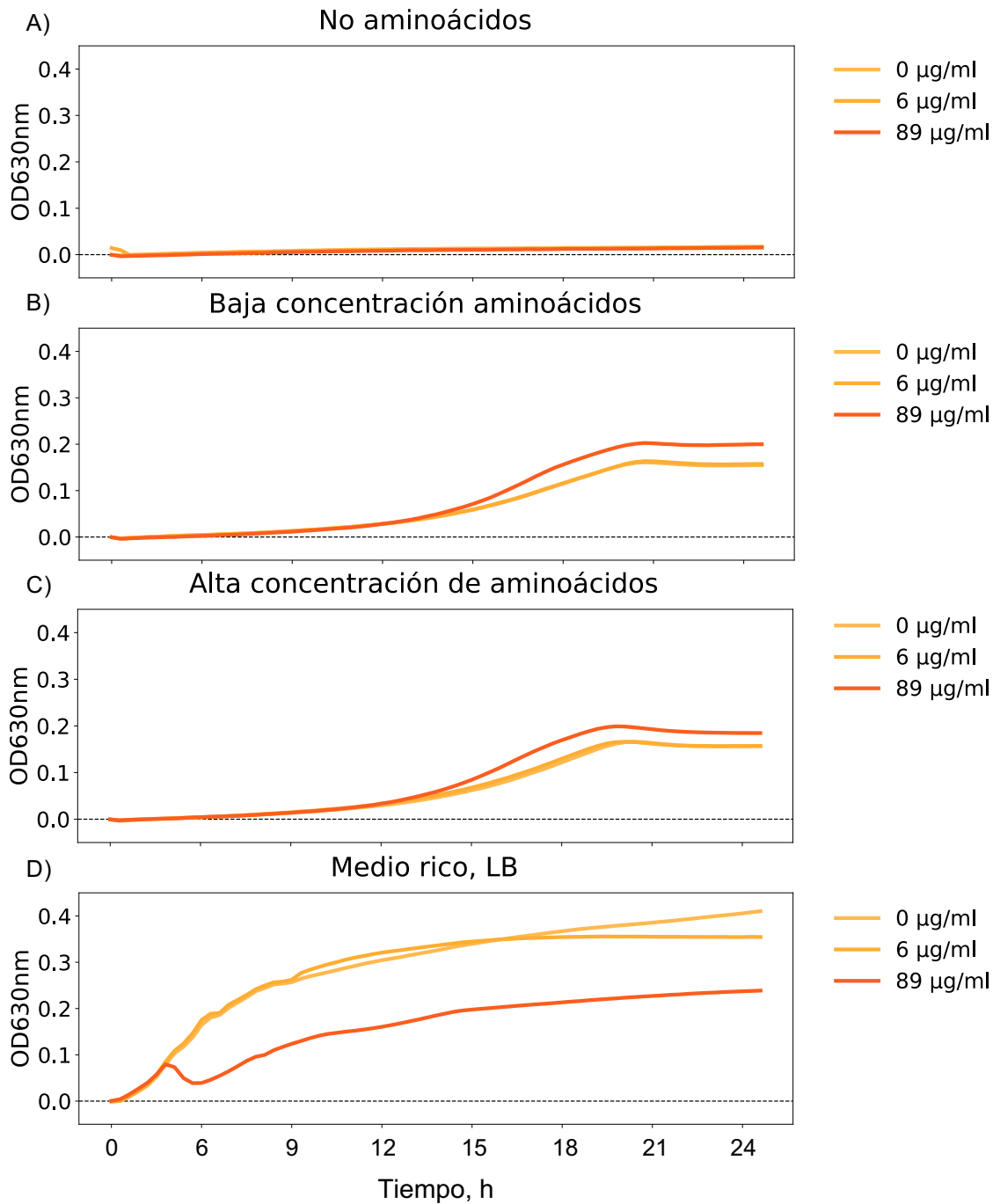


Figura 6.5: *Cinéticas de crecimiento del cultivo mixto con las cepas Δ ilvA y Δ tyrA sensibles y con resistencia a ampicilina (cepas con pBGT). Cada línea representa el promedio de las réplicas utilizadas, N=8)*

6.4 Viabilidad versus abundancia de fenotipos

Para estudiar los cambios en abundancia de cada fenotipo (auxotrofia a isoleucina o tirosina y susceptibilidad o resistencia) cuantificamos la viabilidad celular en medio mínimo selectivo y el número de células de cada fenotipo mediante citometría de flujo, en la Figura 6.6 observamos la viabilidad de cada fenotipo en las 12 combinaciones de medio evaluadas en intervalos de 2 horas (métodos 7.9), las condiciones sin aminoácidos y LB en nula y baja concentración de antibiótico (**A, B, J & K**) el porcentaje de cepas susceptibles se mantiene en un rango entre el 80 y 90 %, estas condiciones pueden describirse como los escenarios con mayor competencia entre fenotipos auxótrofos, en medio sin aminoácidos pueden no producir las concentraciones suficientes por lo tanto el intercambio metabólico se rompe, caso semejante en medio rico donde se cumplen los requerimientos metabólicos de ambas cepas.

En medio con baja concentración aminoácidos (Figura 6.6: **D, E & F**) observamos que la proporción de cepas resistentes aumenta a porcentajes de entre 20 y 50 % en todas las concentraciones de ampicilina, en contraste con el medio mínimo con altas concentraciones aminoácidos (**G, H & I**) donde se observa que los fenotipos resistentes aumentan en porcentaje en medio con ampicilina alcanzando porcentajes cercanos al 100 % al final del experimento (**I**), por último el medio rico con alta concentración de ampicilina (**L**) se observa que en la mayoría de los tiempos de muestreo la población viable estaba compuesta por fenotipos resistentes, dicho resultado nos indica que la combinación de medio rico de recursos y altas concentraciones de antibiótico ejerce una presión de selección que favorece solo a aquellas cepas resistentes.

Viabilidad versus abundancia de fenotipos

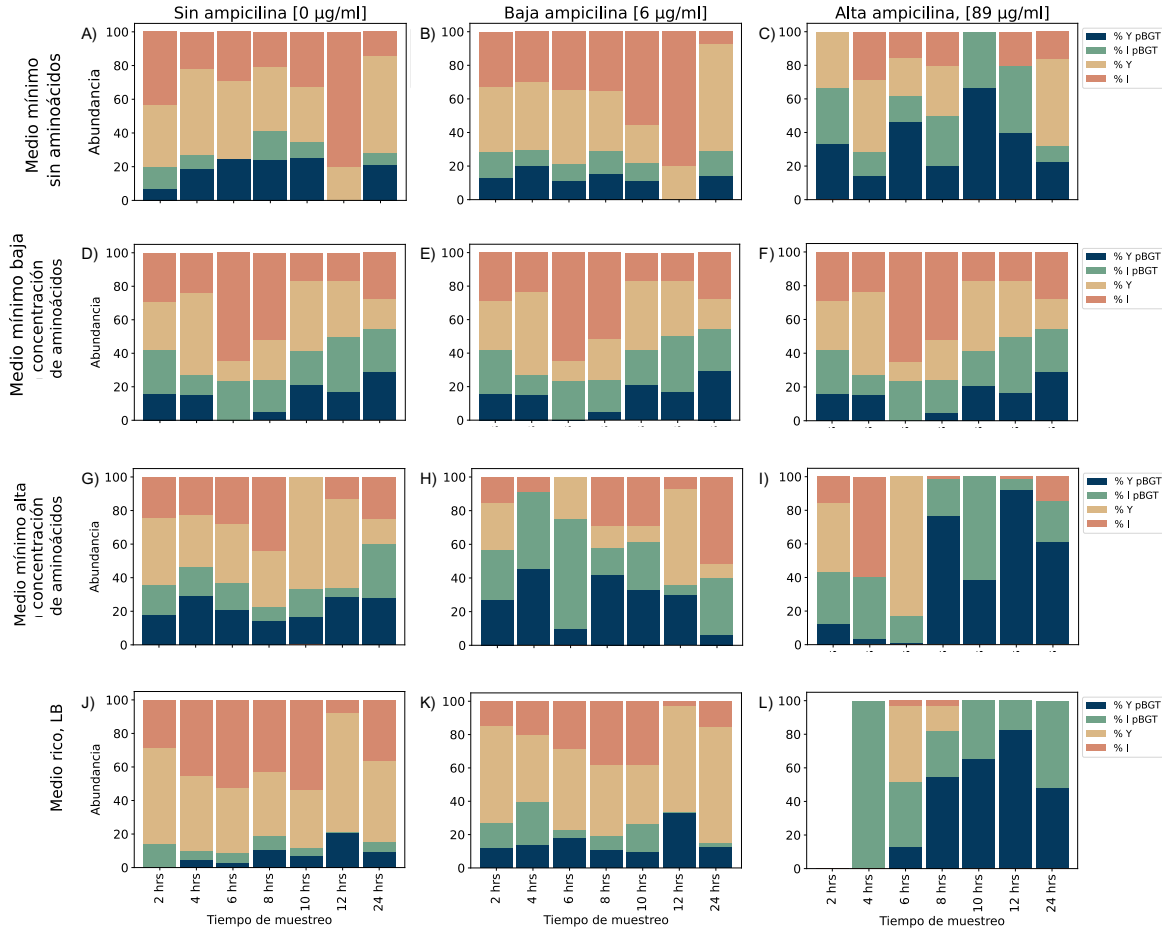


Figura 6.6: Viabilidad del co-cultivo $\Delta ilvA$ y $\Delta tyrA$ sensibles y con resistencia a ampicilina (cepas con *pBGT*). Cada cuadro representa una condición de crecimiento y cada barra un tiempo de muestreo, el color azul representa a la cepa $\Delta tyrA$ -*pBGT*, el verde a $\Delta tyrA$, el amarillo a $\Delta ilvA$ -*pBGT* y el naranja a $\Delta ilvA$, el porcentaje final se calculó con el total de colonias presentes en ambos medios selectivos. El conteo de colonias utilizado se resume en las tablas 8.39 y 8.39 del material suplementario.

Para cada tiempo de muestreo cuantificamos utilizando citometría de flujo el número de células resistentes (fluorescentes en verde, GFP) y células susceptibles (sin fluorescencia), en la Figura 6.7 observamos que en medio sin aminoácidos (A, B & C) cerca del 100% de la población eran susceptibles, en cambio para medio mínimo con aminoácidos y medio rico en concentración nula y baja de ampicilina la abundancia entre fenotipos susceptibles y resistentes oscilo entre el 10 y el 50% (D, E, G H, J & K), sin embargo en medios con aminoácidos y medio rico con concentración alta de ampicilina el porcentaje de fenotipos resistentes oscilo entre el 80 y 100% del total de la población (F, I & L).

Discusión

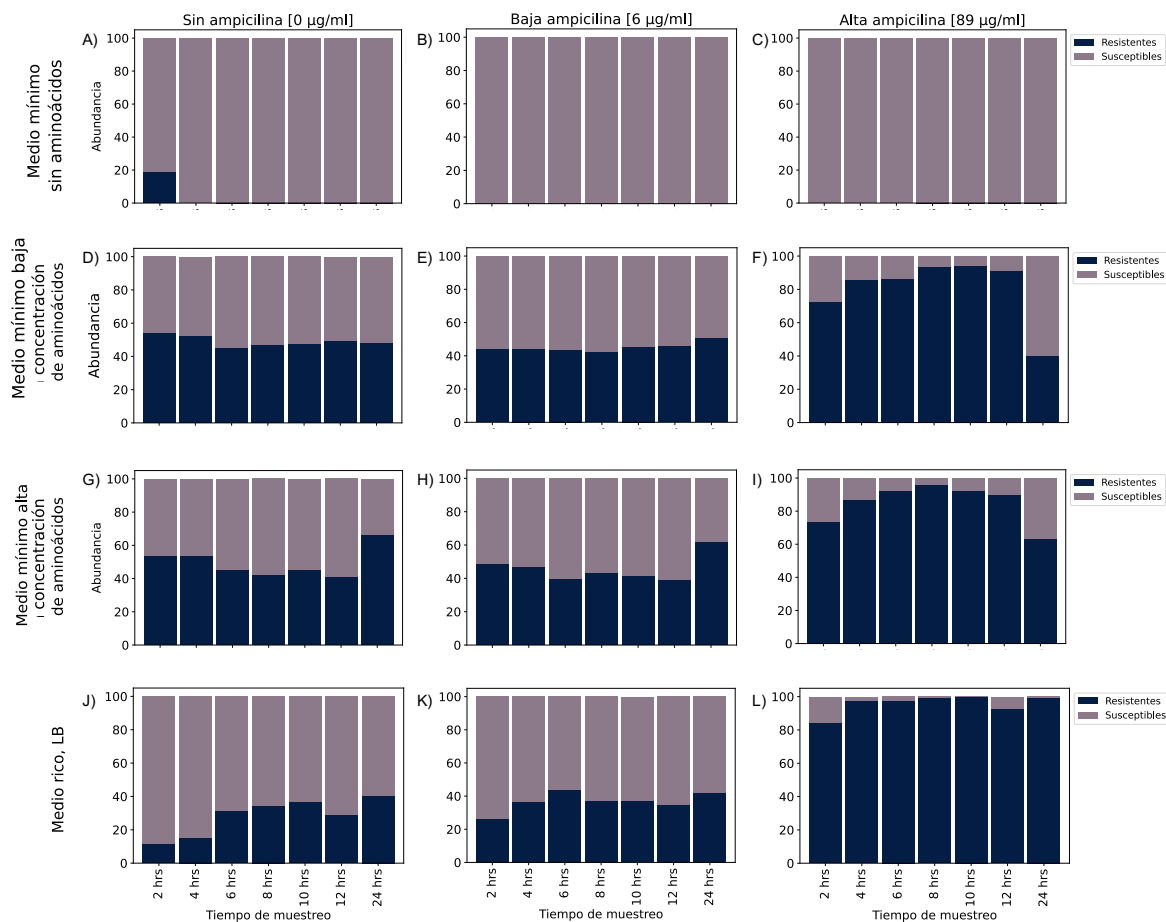


Figura 6.7: Abundancia final del co-cultivo $\Delta ilvA$ y $\Delta tyrA$ sensibles y con resistencia a ampicilina (cepas con *pBGT*). Cada cuadro representa una condición de crecimiento y cada barra un tiempo de muestreo, el color azul representa a las cepas resistentes (con *pBGT*) y el morado a las cepas susceptibles, el porcentaje final de cada fenotipo se calculó a partir del número de células de cada fenotipo en $100\mu\text{l}$ de muestra.

6.5 Discusión

La presencia de fenotipos resistentes a ampicilina capaces de producir beta-lactamasas y degradar enzimáticamente la ampicilina del medio favorece la abundancia de los mismos dentro del consorcio. Los resultados de experimentos de invasión nos permiten observar diferentes dinámicas de un solo consorcio, las cuales se ven modificadas por la cantidad de recursos presentes en el ambiente.

El papel de cada fenotipo dentro de la comunidad, así como la estabilidad y las funciones conjuntas son de importancia ecológica, al verse modificado uno de estos aspectos se favorece la selección de uno o más miembros de la comunidad. El uso de sistemas sintéticos con cepas susceptibles y resistentes a antibióticos permite realizar

Discusión

experimentos enfocados en entender aspectos como tolerancia y resistencia a antibióticos de una comunidad y no de poblaciones individuales a partir de modificar las condiciones ambientales claves del sistema.

Nuestros resultados son congruentes con los previamente reportados en sistemas con cepas resistentes y susceptibles, donde se observa que los cambios en la velocidad de crecimiento de las cepas susceptibles favorece la abundancia de las cepas resistentes y por consecuencia perfiles de interacción competitivos (Frost et al. (2018)), sin embargo en medios con limitación de recursos se favorece la división de labores entre los fenotipos presentes en el sistema, en donde aquellos fenotipos resistentes son capaces de degradar el antibiótico del ambiente confiriendo protección al resto de la población como lo observamos en medios con concentraciones bajas de aminoácidos.

Es relevante que al finalizar los experimentos recuperamos a ambos fenotipos auxótrofos, lo que indica que la interacción a nivel metabólico (intercambio de aminoácidos) también juega un papel en la respuesta final a los tratamientos utilizados, pasando a segundo término en condiciones con alta concentración de aminoácidos y ampicilina, donde la presión por antibiótico puede ser mayor a la presión ejercida por la limitación de recursos.

Capítulo 7

Conclusiones y perspectivas

Utilizar sistemas sintéticos con *cross-feeding* permite explorar diferentes aspectos de las interacciones, en este proyecto evaluamos el efecto del medio ambiente en el establecimiento de interacciones entre cepas auxótrofas a aminoácidos y posteriormente el efecto conjunto de medio ambiente y antibióticos.

En los capítulos 2 y 3 demostramos que cepas de *E. coli* con diferentes auxotrofías a aminoácidos son capaces de establecer interacciones, las cuales dependen principalmente de las concentraciones de recurso presentes en el medio.

Utilizando modelos matemáticos fuimos capaces de simular cambios en el perfil de interacción de dos co-cultivos con diferentes auxotrofías y demostramos experimentalmente que los co-cultivos son capaces de cambiar de un perfil a otro en respuesta a la concentración de aminoácidos presentes en el medio, demostrando que el sistema es dinámico y el establecimiento de los distintos perfiles un comportamiento ecológico que no depende de las auxotrofías del sistema.

Posteriormente evaluamos el rol de los antibióticos en la susceptibilidad colectiva de diferentes perfiles de interacción (Capítulo 4), demostrando que en aquellas condiciones donde se favorecen perfiles cooperativos los co-cultivos son menos susceptibles a los antibióticos utilizados, teniendo como resultado un aumento en la densidad óptica final y porcentajes de inhibición negativos, en cambio en aquellos medios ambientes donde se favorece la competencia observamos porcentajes de inhibición cercanos al 50 %.

En el Capítulo 5 complementamos los resultados observados en el Capítulo 4 evaluando los cambios en la velocidad de crecimiento de diferentes perfiles y observamos que en el caso de cloranfenicol la velocidad de crecimiento de los co-cultivos en condiciones con aminoácidos (donde se favorece la competencia) disminuyen su velocidad de crecimiento a velocidades cercanas a las observadas en medio sin aminoácidos (donde se favorece la cooperación), indicándonos un *trade-off* en el cual se pierde un porcentaje de la población por efectos inhibitorios transicionando de un perfil de competencia a uno de cooperación. De manera similar observamos cambios en la velocidad de crecimiento de los co-cultivos creciendo en medio con ciprofloxacino, sin embargo en estas condiciones la velocidad de crecimiento se mantuvo cercana entre las condiciones con aminoácidos y antibiótico, esta diferencia puede ser efecto del mecanismo de acción del antibiótico, por lo tanto existe un aumento en la cantidad de recursos efecto de la población inhibida por efecto del antibiótico lo que favorece el crecimiento de la población restante.

Por ultimo utilizando cultivos mixtos con cepas capaces de producir beta-lactamas evaluamos el efecto de los bienes públicos en medios ambientes que favorecen la cooperación o la competencia (Capítulo 6). Cuantificamos cambios en la abundancia de dos fenotipos auxótrofos con y sin resistencia a antibióticos y demostramos que en medio

ambiente sin aminoácidos existe un mayor porcentaje de células susceptibles que va disminuyendo una vez que hay aminoácidos en el sistema, siendo en altas concentraciones de aminoácidos y antibiótico donde se favorece la presencia de cepas resistentes.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que el medio ambiente juega un papel importante en el establecimiento de diferentes perfiles de interacción los cuales pueden ser modificados por las condiciones ambientales así como por metabolitos con efectos inhibitorios como los antibióticos. Demostramos además que en medios donde se favorecen perfiles cooperativos se presentan dinámicas de tolerancia al antibiótico y en medios donde se favorece la competencia existe un *trade-off* que les permite cambiar de perfil de interacción, demostrando que los antibióticos a dosis sub-letales impactan en la dinámica conjunta de los co-cultivos.

Métodos

7.1 Elección de cepas y validación de fenotipos

Se eligieron 9 cepas de *Escherichia coli* provenientes de la colección Keio (Baba et al. (2006)) con auxotrofías a Fenilalanina (F), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Treonina (T), Triptófano (W) y Tirosina (Y), dichos fenotipos se obtuvieron a partir de la sustitución de los genes *pheA*, *glyA*, *hisB*, *ilvA*, *leuB*, *metA*, *thrC*, *trpC* & *tyrA* (respectivamente) por un cassette de resistencia a kanamicina. Para todas las cepas se evaluó la ausencia de crecimiento en medio mínimo sin aminoácidos por 96 horas a 37°C.

Una vez validados los fenotipos transformamos cada cepa con un cassette de fluorescencia con las proteínas mCherry y eCyan, dichos cassettes fueron ensamblados con la técnica Golden Gate Assembly con fragmentos provenientes del Kit EcoFlex MoClo (colaboración con el Dr. José Utrilla, CCG UNAM).

Dentro de cada cassette de fluorescencia fueron ensamblados:

1. Promotor constitutivo J23100
2. Secuencia de unión a ribosoma 0034
3. Secuencia ORF-eCFP y ORF-mCherry para eCyan y mCherry respectivamente
4. Terminador B0015
5. Plásmido multicopia pTU1

Mediante una reacción de digestión (con la enzima BsaI-HF) y ligación (Ligase T4) Golden Gate Assembly, dicho plásmido confiere un fenotipo resistente a ampicilina (TEM-1 beta-lactamasa) (Moore et al. (2016)).

7.2 Preparación de células para inoculación y preparación de microplacas

Las células utilizadas para inoculación provenían de un cultivo de 15 a 16 horas de crecimiento en medio lisogénico (LB) con kanamicina [40 mg/ml] a 37°C con agitación constante, para los experimentos con cepas fluorescentes se agregó ampicilina [100 mg/ml] para mantener el plásmido, previo a la inoculación las células fueron lavadas 2 veces en sales de M9 para eliminar restos de medio rico y resuspendidas en medio mínimo M9 con glucosa [2 g/l].

Para todos los experimentos se ajustó la densidad óptica de las células en un rango de 0.15 a 0.2 de OD₆₃₀ previo a la inoculación.

Utilizamos el robot pipeteador OpenTrons para llenar las microplacas con 180 μ l de medio por pozo (dependiendo de las condiciones a evaluar), posteriormente inoculamos con pipeta multicanal 20 μ l de células limpias por pozo, la inoculación de los co-cultivos fue 50 % de cada uno de los fenotipos y el 100 % para los monocultivos, posterior a la inoculación sellamos cada microplaca con una mica y parafilm e incubamos a 37°C por 24 horas con agitación constante en incubadora obteniendo lecturas de densidad óptica (630nm) y fluorescencia para ambas proteínas (435/505 eCyan y 579/616 mCherry) a las 0 y 24 horas.

7.3 Dinámica de crecimiento en monocultivos

Para caracterizar el crecimiento de cada cepa de manera individual utilizamos medio mínimo M9 suplementado con el aminoácido que compensa su auxotrofia utilizando curvas dosis respuesta con concentraciones que van desde 0 hasta 4 veces la concentración mínima de cada aminoácido necesaria para producir un gramo de peso seco de bacteria, dicha concentración mínima es representada como concentración basal= 1, y fue calculada a partir de la estimación del modelo metabólico de formación de biomasa iML1515 (antes iJO1366) descrito para *E. coli* MG1655 (King et al. (2016)).

Para obtener la cantidad de miligramos por litro de cada aminoácido (concentración basal) realizamos el siguiente calculo:

Miligramos por litro = (RDW*OD (0.295))* Peso molecular del aminoácido

mg/l de leucina = ((0.437*0.295) * 131.17) = 16.909

mg/l de fenilalanina = (0.180*0.295) * 165.19) = 8.757

mg/l de tirosina = (0.1339 * 0.295) * 181.21 = 7.15

mg/l de isoleucina = (0.282 * 0.295) * 131.17 = 10.9

Utilizando microplacas de titulación observamos el crecimiento de cada cepa en medio mínimo con glucosa al 0.2 % y el aminoácido correspondiente a cada auxotrofia en concentraciones de 0 a 4 veces la concentración basal (con incrementos de 0.25 veces).

7.4 Crecimiento en sobrenadantes

Evaluamos el crecimiento en tapete de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta pheA$ en placas de medio mínimo sin aminoácidos adicionando sobre papel filtro un volumen de 20 μ l de sobrenadante proveniente de los co-cultivos. Los tapetes bacterianos se realizaron con 50 μ l de células lavadas y resuspendidas en sales M9, utilizamos 4 tapetes por placa

Dosis respuesta de aminoácidos utilizando co-cultivos

de agar e incubamos por 48 horas a 37°C.

Previo a la inoculación crecimos 3 ml de los co-cultivos de $\Delta leuB$ & $\Delta ilvA$, $\Delta pheA$ & $\Delta ilvA$, $\Delta pheA$ & $\Delta tyrA$, $\Delta pheA$ & $\Delta leuB$ y $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en proporciones 50-50 y $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en proporciones 90-10, todos los co-cultivos crecieron por 24 horas en medio mínimo sin aminoácidos a 37°C con agitación constante, posterior al ciclo de crecimiento recuperamos el sobrenadante de cada co-cultivo centrifugando 2 ml de cultivo a 12,000 rpm por 5 minutos.

7.5 Dosis respuesta de aminoácidos utilizando co-cultivos

Para evaluar los cambio en la dinámica de los co-cultivos $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$, $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ y $\Delta tyrA$ & $\Delta ilvA$ en medio adicionado con aminoácidos construimos una matriz con diferentes concentraciones de cada aminoácido que van desde 0 a 4 veces la concentración basal de aminoácidos, con un incremento de 0.25 veces (Ver apéndices). Utilizando el robot pipeteador OpenTrons llenamos las microplacas con 180 μ l de medio por pozo e inoculadas con 20 μ l de células limpias.

Para el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ utilizamos la cepa $\Delta leuB$ Keio marcada con mCherry y la cepa $\Delta tyrA$ Keio marcada con eCyan y para el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ la cepa $\Delta leuB$ Keio marcada con mCherry y $\Delta pheA$ Keio marcada con eCyan, de cada combinación inoculamos microplacas con 100 % de cada cepa (por separado) y co-cultivos al 50/50 de cada cepa, una vez inoculadas sellamos cada microplaca con una mica y parafilm e incubamos a 37°C por 48 horas con agitación constante en incubadora obteniendo lecturas de densidad óptica (630 nm) y fluorescencia para ambas proteínas (435/505 y 579/616) a las 0, 24 y 48 horas de incubación.

Para el co-cultivo $\Delta tyrA$ & $\Delta ilvA$ utilizamos las cepas $\Delta tyrA$ y $\Delta ilvA$ provenientes de la colección Keio sin marcadores fluorescentes e inoculamos microplacas con 100 % de cada monocultivo y 50/50 del co-cultivo

7.6 Dosis respuesta a cloranfenicol y a ciprofloxacino

A partir de la matriz de medio mínimo con aminoácidos tomamos 4 puntos con concentraciones de aminoácidos: nula (sin aminoácidos), baja (1 vez la concentración basal de cada aminoácido), media (2 veces la concentración basal de cada aminoácido) y alta (3 veces la concentración basal de cada aminoácido), evaluamos en microplacas de titulación el crecimiento en 24 horas de monocultivos y co-cultivos al 50/50 en una dosis respuesta utilizando cloranfenicol (CHL) en las siguientes concentraciones (μ g por ml): 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 y en una dosis respuesta a ciprofloxacino (CPR) utilizando las siguientes concentraciones 0, 0.001, 0.002, 0.006, 0.01, 0.014, 0.018, 0.02, 0.03 & 0.04 μ g/ml.

El porcentaje de inhibición a cada tratamiento al final del crecimiento se calculo dividiendo la OD₆₃₀ del pozo control (sin antibiótico) entre la OD₆₃₀ de los pozos con antibiótico, el resultado nos da un valor de 0 a 1, siendo 1 el cero porcentaje de inhibición, para convertirlo a un valor entre 0 y 100 % a 1 le restamos el valor obtenido para condición y lo multiplicamos por 100.

7.7 Cinéticas dosis respuesta a cloranfenicol y a ciprofloxacino

Para evaluar las diferencias en velocidad de crecimiento comparamos el crecimiento de ambos co-cultivos utilizando las concentraciones nula, baja, media y alta de aminoácidos y 4 concentraciones de cada antibiótico, CHL: 0, 0.5, 1.5 y 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y CPR: 0, 0.014, 0.03 y 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para los co-cultivos con aminoácidos y 9 concentraciones para los co-cultivos en medio sin aminoácidos (CHL: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y CPR: 0, 0.001, 0.002, 0.006, 0.01, 0.014, 0.018, 0.02 & 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Posterior a la inoculación las placas se incubaron en lector de placas BioTek H1 Synergy Hybrid Multi-Mode Microplate Reader obteniendo lecturas de densidad óptica y fluorescencia cada 20 minutos por 24 horas, una vez terminado el tiempo de incubación inoculamos $1\mu\text{l}$ de células en medio LB sólido para verificar viabilidad celular, el resto de las réplicas fueron utilizadas para medir abundancias finales por citometría de flujo (métodos sección citometría)

La velocidad de crecimiento para cada condiciones fue calculada utilizando un algoritmo basado en procesos Gaussianos (Swain et al. (2016)) (Python) y corroboradas por regresiones lineales. El tiempo y Vmax de cada condición se localizo de manera manual.

7.8 Dosis respuesta a ampicilina, monocultivos

Mediante transformación química insertamos el plásmido pBGT TEM-1 a las cepas $\Delta ilvA$, $\Delta leuB$, $\Delta pheA$ y $\Delta tyrA$, posteriormente comparamos el crecimiento de las cepas sin el plásmido con las transformadas utilizando una dosis respuesta a ampicilina utilizando las siguientes concentraciones: 0, 6, 15, 36, 89, 220, 540, 1326, 3257 y 8000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en medio rico (LB).

7.9 Co-cultivo con cepas susceptibles y resistentes en presencia de ampicilina

Para evaluar la respuesta del co-cultivo en medio mínimo con ampicilina transformamos las cepas $\Delta leuB$ Keio y $\Delta tyrA$ Keio con el plásmido pBGT que contiene la proteína fluorescente GFP y confiere resistencia a ampicilina mediada por la producción de betalactamasas (TEM-1) (San Millan et al. (2016)).

Ensamblamos un sistema de cultivos mixto utilizando las cepas $\Delta leuB$ pBGT, $\Delta ilvA$ pBGT, $\Delta leuB$ Keio & $\Delta ilvA$ Keio, (cepas con el plásmido pBGT células resistentes y cepas Keio susceptibles), en cultivo líquido con el 80 % de células susceptibles (40 % de cada fenotipo) y 20 % células resistentes (10 % de cada fenotipo) evaluamos el crecimiento en 3 condiciones de M9 con aminoácidos (nula, baja y alta) y medio rico LB, bajo 3 concentraciones de ampicilina (nula, baja [6 μ g/ml] y alta [89 μ g/ml] tomando muestras a las 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas.

En cada tiempo de muestreo se realizó una dilución 1:1000 de cada condición y se inocularon 5 μ l de dilución en placas petri con medio mínimo M9 selectivo (M9 con 1.5 % de agar bacteriológico con baja concentración de leucina o baja concentración de isoleucina) con 1 % de arabinosa, las placas fueron incubadas por 48 horas, posterior al tiempo de inoculación se fotografiaron utilizando el el BAFFLE (dispositivo armado en el laboratorio del Dr. Rafael Peña Miller en Centro de Ciencias Genómicas, UNAM referencia baffle), cada placa petri fue fotografiada en campo claro para conteo del total de colonias y con el filtro Green (469 nm/525 nm) para el conteo de colonias con fluorescencia en verde, al total de colonias se restaron aquellas con fluorescencia, se calculo el porcentaje de cada fenotipo por muestra y el número de células viables de cada fenotipo.

El restante de cada muestra fue incubado con 20 μ l de arabinosa al 10 % (concentración final 1 %) por 4 horas, posteriormente se cuantificó mediante citometría de flujo la abundancia final de células resistentes (GFP con el filtro FITC, (490nm/ 525nm)) y susceptibles, en 10,000 eventos por muestra, posteriormente utilizando el volumen de muestreado se estimó el número de células de cada fenotipo en un volumen total de 100 μ l y se calculó el porcentaje por fenotipo, las muestras fueron procesadas utilizando el citómetro CytoFlex S Flow Cytometer.

7.10 Cuantificación de abundancias mediante citometría de flujo

Para las dosis respuesta a CHL (puntos finales) tomamos 3 réplicas de los co-cultivos de cada condición las cuales fueron centrifugadas juntas para eliminar los restos de medio y resuspendidas en 200 μ l de medio M9 fresco, posteriormente fueron

Preparación de medios de cultivos y soluciones

leídas en el citómetro de flujo Amnis ImageStream Mk II Imaging Flow Cytometer. Utilizando el software IDEAS se identificaron las bacterias con fluorescencia en rojo (mCherry) y en azul (eCyan) para cada co-cultivo, con el total de eventos registrados (eliminando aquellos dobles) se calculó la proporción final de cada fenotipo.

Las muestras provenientes de la dosis respuesta a CPR y cinéticas fueron preparadas con el mismo protocolo y cuantificadas en el citómetro de flujo CytoFlex S Flow Cytometer, utilizando el software CytExpert se determinó un rango de muestra para cada población, utilizando el filtro PerCP que permite diferenciar las células con fluorescencia roja, con la suma del número de eventos en cada rango se calculó el porcentaje final de cada fenotipo. Se calibró el rango equivalente a cada población utilizando monocultivos de cada cepa y co-cultivos con abundancias conocidas para cada co-cultivo evaluado.

Las muestras provenientes de la matriz de medio con aminoácidos (Capítulo 3) fueron centrifugadas juntas y resuspendidas en 300 μl de medio M9 sin aminoácidos, de los cuales 200 μl se almacenaron en una placa nueva a -80°C , con el resto de la muestra se cuantificaron 20,000 eventos utilizando el citómetro CytoFlex S Flow Cytometer.

Para cada muestra se obtuvieron de 5,000 a 2,0000 eventos dependiendo de la concentración de la misma, el conteo y volumen total de cada muestra se describe en la carpeta de datos (.../Datos/Citometria...) del repositorio GitHub del proyecto https://github.com/DanielaReyesGonzalez/Tesis_doctorado.git.

7.11 Preparación de medios de cultivos y soluciones

Medio mínimo M9

Para cada litro de medio utilizamos 960 ml de agua destilada estéril, 20 ml/L de sales Parte A, 20 ml/L de sales parte B y glucosa a 2, 4 o 6 g/L, cada parte de sales fue esterilizada por separado, la glucosa fue preparada en agua destilada y filtrada con filtros millipore de 0.22 μm al momento de la preparación del medio.

Las sales se prepararon utilizando los siguientes compuestos: Sales parte A:

- 350 g/L de fosfato dipotásico o fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4)
- 100 g/L de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)

Y, Sales parte B:

- 29.4 g/L de Citrato Trisodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)
- 50 g/L de Sulfato de Amonio (NH_4)₂ SO₄)

Preparación de medios de cultivos y soluciones

- 5 g/L de Sulfato de Magnesio (MgSO_4) o 10.25 g/L de Sulfato de Magnesio Pentahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Para los medios selectivos con aminoácidos y antibióticos se restó el volumen añadido al volumen inicial de agua para cada litro de medio con el fin de conservar las concentraciones de sales y glucosa finales, para medios con agar se esterilizó agar bacteriológico (concentración final de 15 g/L) en agua y posteriormente se añadieron sales, glucosa, aminoácidos y antibióticos dependiendo del experimento.

7.11.1 Preparación de aminoácidos

- **Solución stock Leucina:** L-Leucine de sigma (L8000) en HCl al 0.3 %, una vez disuelta se almaceno en alícuotas a 4°C.
- **Solución stock Tirosina:** L-Tyrosine de sigma (T3754) en HCl al 0.3 %, una vez disuelta se almaceno en alícuotas a 4°C.
- **Solución stock Fenilalanina:** L-Phenylalanine de sigma (P2126) en agua destilada estéril, una vez disuelta se filtró con filtro milipore de 0.22 μm y se almaceno en alícuotas a 4°C.
- **Solución stock Isoleucina:** L-Isoleucine de sigma (I2752) en HCl al 0.3 %, una vez disuelta se almaceno en alícuotas a 4°C.

7.11.2 Preparación de antibióticos

- **Solución stock de Cloranfenicol:** Chloramphenicol de sigma (C0378) con una concentración final de 50 mg/ml en etanol, posterior a la preparación se almaceno a -20°C hasta su uso.
- **Solución Stock de Ciprofloxacino:** Ciprofloxacin de sigma (17850) con una concentración final de 10 mg/ml en 0.1 N ácido clorhídrico, posterior a la preparación se almaceno a -20°C hasta su uso.
- **Solución stock de Kanamicina:** Kanamycin disulfate salt from SK de sigma (K1876) con una concentración final de 40 mg/ml en agua destilada, una vez preparada la solución se filtro con filtros millipore de 0.22 μm y se almaceno a -20°C hasta su uso.
- **Solución stock de Ampicilina:** Ampicillin sodium salt de sigma (A016) con una concentración final de 100 mg/ml en agua destilada, una vez preparada la solución se filtro con filtros millipore de 0.22 μm y se almaceno a -20°C hasta su uso.

A partir de las soluciones stock se prepararon soluciones de trabajo en medio mínimo con las concentraciones necesarias para cada experimento.

Preparación de medios de cultivos y soluciones

Otras soluciones

- **Solución stock de Arabinosa:** L-(+)-Arabinose de sigma (A3256) al 10% en agua destilada estéril, una vez preparada la solución se filtro con filtros millipore de $0.22\mu\text{m}$ y se almaceno a 4°C hasta su uso.

Capítulo 8

Material suplementario

8.1 Cepas y plásmidos

8.1.1 Ceparío

Todas las cepas utilizadas son *Escherichia coli* provenientes de la colección Keio (Baba et al. (2006)) (Tabla 8.1), algunas fueron modificadas para los experimentos de dosis respuesta con aminoácidos, dosis respuesta con cloranfenicol y dosis respuesta con ciprofloxacino.

<i>ID cepa / Δ Gen</i>	<i>Auxotrofía</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Fuente</i>
$\Delta pheA$	Fenilalanina	Kan+	Keio collection
$\Delta glyA$	Glicina	Kan+	Keio collection
$\Delta hisB$	Histidina	Kan+	Keio collection
$\Delta ilvA$	Isoleucina	Kan+	Keio collection
$\Delta leuB$	Leucina	Kan+	Keio collection
$\Delta metA$	Metionina	Kan+	Keio collection
$\Delta thrC$	Treonina	Kan+	Keio collection
$\Delta trpC$	Triptófano	Kan+	Keio collection
$\Delta tyrA$	Tirosina	Kan+	Keio collection
$\Delta leuB$ -mCherry	Leucina	Kan+, amp+ fluorescencia mCherry	Keio collection Moore et al. (2016)
$\Delta tyrA$ -eCyan	Tirosina	Kan+, amp+ fluorescencia eCyan	Keio collection Moore et al. (2016)
$\Delta pheA$ -mCherry	Fenilalanina	Kan+, amp+ fluorescencia mCherry	Keio collection Moore et al. (2016)
$\Delta leuB$ -eCyan	Leucina	Kan+, amp+ fluorescencia eCyan	Keio collection Moore et al. (2016)
$\Delta ilvA$ -pBGT	Isoleucina	p-BGT-TEM-1, amp+ fluorescencia GFP	Keio Collection, San Millan et al. (2016)
$\Delta tyrA$ -pBGT	Tirosina	p-BGT-TEM-1, amp+ fluorescencia GFP	Keio Collection, San Millan et al. (2016)

Cuadro 8.1: Lista de cepas utilizadas.

8.1.2 Plásmidos utilizados

- eCyan EcoFlex: Resistencia a ampicilina y fluorescencia proteína eCyan
- mCherry EcoFlex: Resistencia a ampicilina y fluorescencia proteína mCherry
- pCP20: Resistencia a ampicilina, utilizado para eliminar resistencia en cromosoma a kanamicina de cepas Keio
- pE-FLP: Resistencia a ampicilina utilizado para eliminar resistencia en cromosoma a kanamicina proveniente de la integración de mCherry mediante el pOSIP-KF-mCherry
- pOSIP-KF-mCherry: Integración a cromosoma de la proteína fluorescente mCherry
- pBGT: Resistencia a ampicilina (TEM-1) y fluorescencia proteína GFP

<i>Aminoácido</i>	<i>Requerimiento para DW (RDW)</i>	<i>nM por OD (0.2945)</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>g/ml</i>
Leucina	0.437778	0.128925621	131.17	16.91
Isoleucina	0.282306	0.083139117	131.17	10.90
Fenilalanina	0.180021	0.0530161845	165.19	8.757743518
Glicina	0.595297	0.1753149665	75	13.14862249
Tirosina	0.133993	0.0394609385	181.21	7.150716666
Metionina	0.149336	0.043979452	149.21	6.562174033
Treonina	0.246506	0.072596017	119.12	8.647637545
Triptófano	0.055234	0.016266413	204.23	3.322089527
Histidina	0.092053	0.0271096085	155.15	4.206055759

Cuadro 8.2: Requerimiento de aminoácidos para un gramo de peso seco de *E. coli* (King et al. (2016)).

8.2 MS Capítulo 2: Descripción del sistema

8.2.1 Crecimiento co-cultivos en medio mínimo con diferentes concentraciones de glucosa

<i>Co-cultivo</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Promedio</i> <i>OD₆₃₀</i>	<i>std</i>
$\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$	M9 2g/L glucosa	0.178250	0.009601
	M9 con 4g/L glucosa	0.202250	0.008496
	M9 con 6g/L glucosa	0.211000	0.011424
$\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$	Alta concentración de aminoácidos con 2g/L glucosa	0.502000	0.069954
	Alta concentración de aminoácidos con 4g/L glucosa	0.484750	0.054669
	Alta concentración de aminoácidos con 6g/L glucosa	0.478750	0.025849
$\Delta leuB$ & $\Delta pheA$	M9 con 2g/L glucosa	0.14475	0.05680
	M9 con 4g/L glucosa	0.207500	0.008732
	M9 con 6g/L glucosa	0.235250	0.016873
$\Delta leuB$ & $\Delta pheA$	Alta concentración de aminoácidos con 2g/L glucosa	0.570750	0.52875
	Alta concentración de aminoácidos con 4g/L glucosa	0.480500	0.019033
	Alta concentración de aminoácidos con 6g/L glucosa	0.026818	0.01630

Cuadro 8.3: Promedio y desviación estándar de la OD_{630} final de los co-cultivos $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ y $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio con limitación de recursos

8.3 MS Capítulo 3: Perfiles de interacción en sistemas mediados por cross-feeding.

En la tabla 8.4 se describen los valores numéricos utilizados para las simulaciones numéricas descritas en el capítulo 3.

8.3.1 Parámetros modelo proteómico

MS Capítulo 3: Perfiles de interacción en sistemas mediados por cross-feeding.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor (B_x)</i>	<i>Valor (B_y)</i>	<i>Descripción</i>
			Modelo de partición del proteoma
μ	1×10^3	1×10^3	Tasa máxima de consumo
k	50,0	50,0	Constante de saturación media
$\hat{\theta}_E$	0,020	0,020	Tasa máxima de transcripción basal de los genes en el sector E
$\hat{\theta}_R$	0,08	0,08	Tasa máxima de transcripción basal de los genes en el sector R
θ_E	20	20	Tasa de transcripción de ppGpp inducible por genes del sector E
θ_R	20	20	Tasa de transcripción de ppGpp inducible por genes del sector R
n	2,0	2,0	Coefficiente de Hill
ω	5,1	5,1	Umbral de actividad para ppGpp en los sectores E y R
κ_E	60,0	60,0	Tasa máxima de traducción de mRNAs en el sector E
κ_R	60,0	60,0	Tasa máxima de traducción de mRNAs en el sector R
η_E	2,4	2,4	Tasa de degradación de transcritos en E
η_R	2,4	2,4	Tasa de degradación de transcritos en R
δ_E	1,7	1,7	Tasa de degradación de moléculas de E
δ_R	1,7	1,7	Tasa de degradación de moléculas de R
δ_Γ	0,8	0,8	Tasa de degradación de ppGpp
J_E	0,5	0,5	Fracción de ribosomas traduciendo proteínas del sector E
J_R	0,5	0,5	Fracción de ribosomas traduciendo proteínas del sector R
θ_b	0,05	0,05	Tasa de síntesis basal de ppGpp
θ_i	15,2	15,2	Tasa de síntesis de ppGpp inducida
φ	0,01	0,01	Fracción del sector E utilizada en la síntesis de aminoácidos
			Modelo de dinámica poblacional
c	$13,95 \times 10^9$	$13,95 \times 10^9$	Eficiencia celular
k_1	1×10^{-11}	1×10^{-11}	Coefficiente de conversión de crecimiento
k_2	$0,5 \times 10^{-9}$	1×10^{-9}	Coefficiente de conversión de aminoácidos

Cuadro 8.4: Parámetros numéricos utilizados en experimentos del modelo multi-escala, B_x y B_y , representan a las cepas auxótrofas a los aminoácidos X y Y , respectivamente.

8.3.2 Crecimiento de monocultivos en medio con aminoácidos, CB

En las figuras 8.1, 8.2, 8.3 y 8.4 se observa la frecuencia relativa de los monocultivos $\Delta leuB$, $\Delta tyrA$ y $\Delta pheA$ en matrices de medio mínimo con los aminoácidos leucina-tirosina y leucina-fenilalanina a las 48 horas de crecimiento (Métodos 7.5).

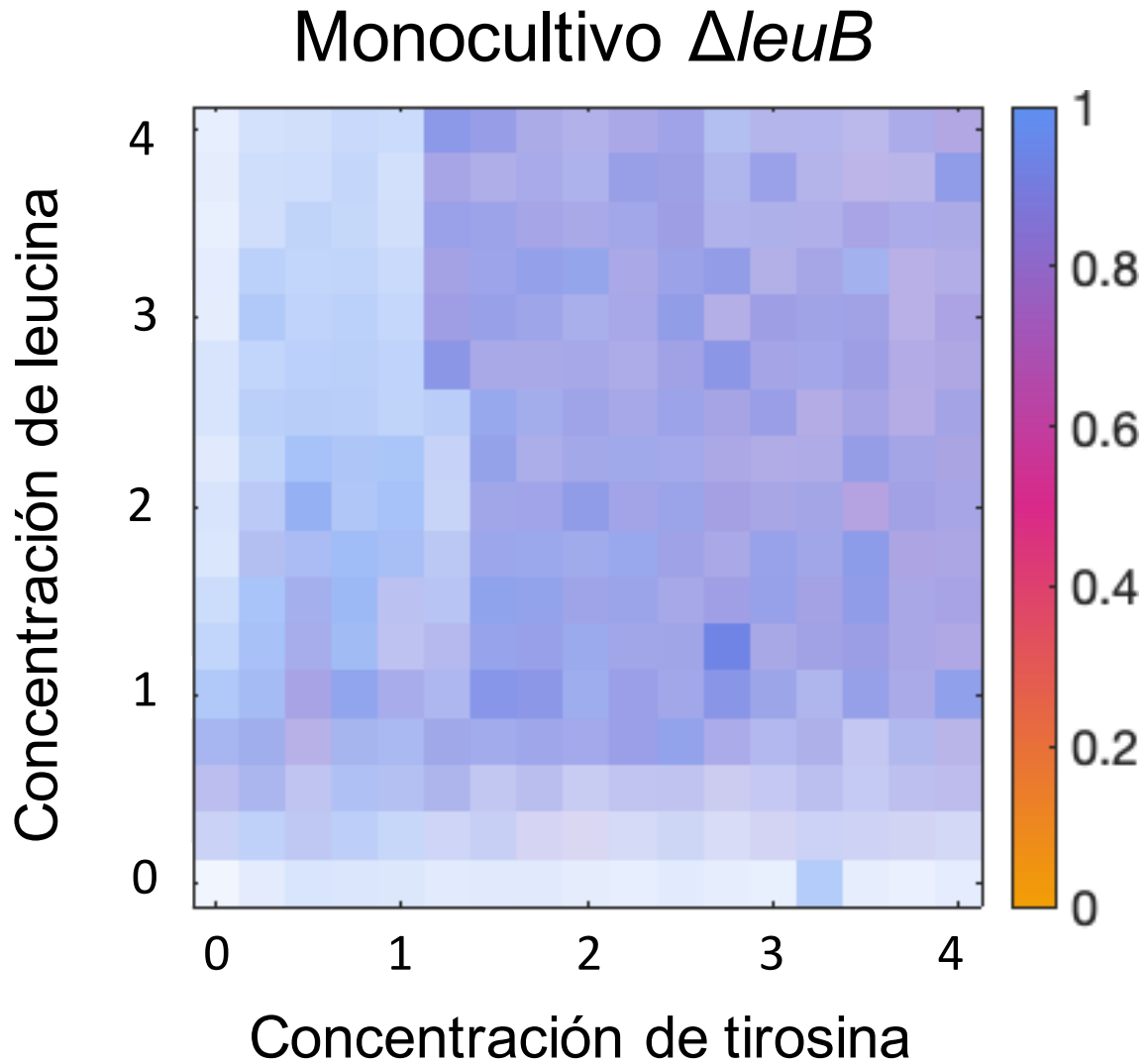


Figura 8.1: Densidad relativa del monocultivo $\Delta leuB$ en matriz de medio mínimo M9 con los aminoácidos leucina-tirosina. (N=3).

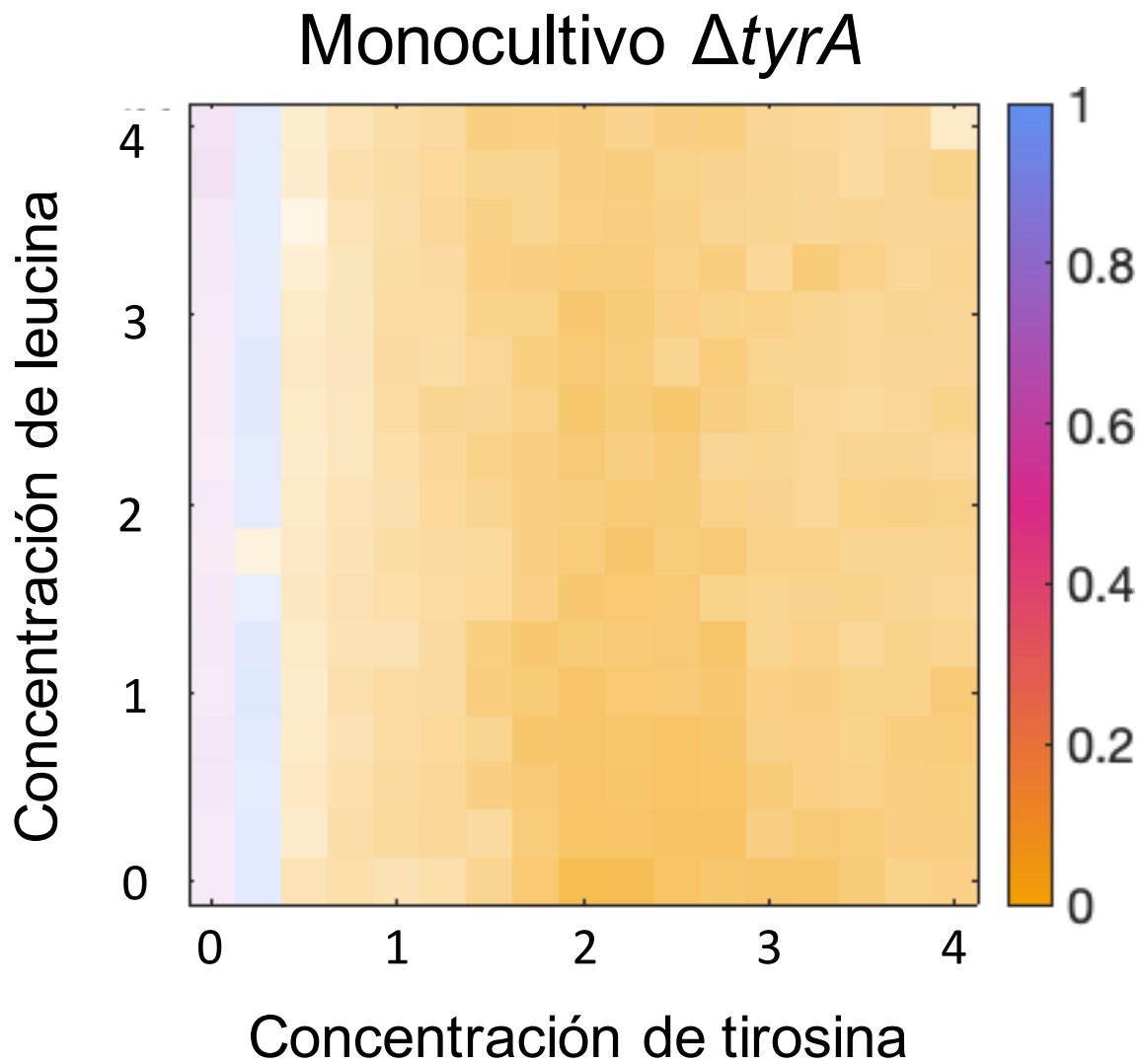


Figura 8.2: Densidad relativa del monocultivo $\Delta tyrA$ en en matriz de medio mínimo M9 con los aminoácidos leucina-tirosina.(N=3).

Monocultivo $\Delta leuB$

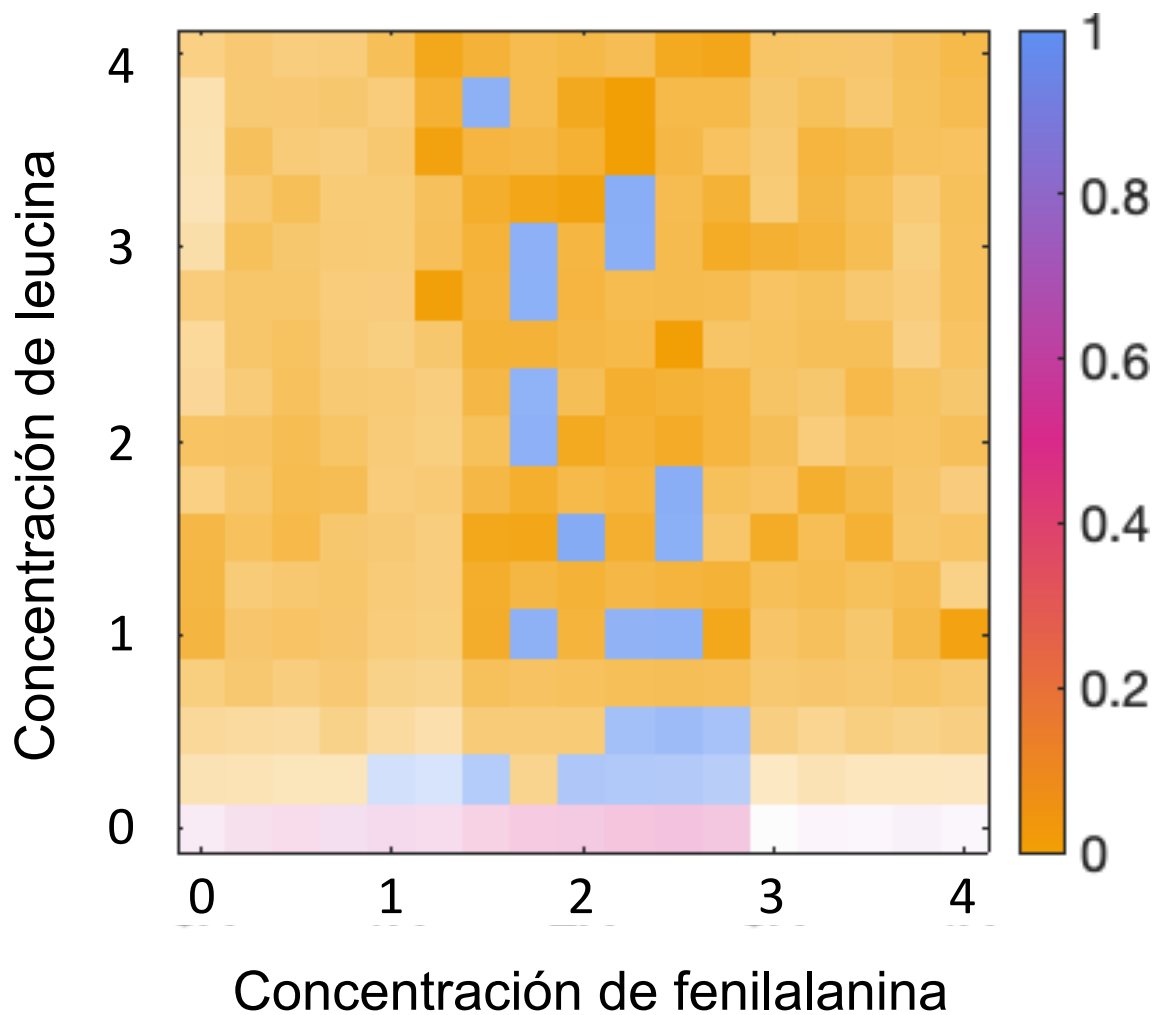


Figura 8.3: Densidad relativa del monocultivo $\Delta leuB$ en matriz de medio mínimo M9 con los aminoácidos leucina-fenilalanina.(N=3).

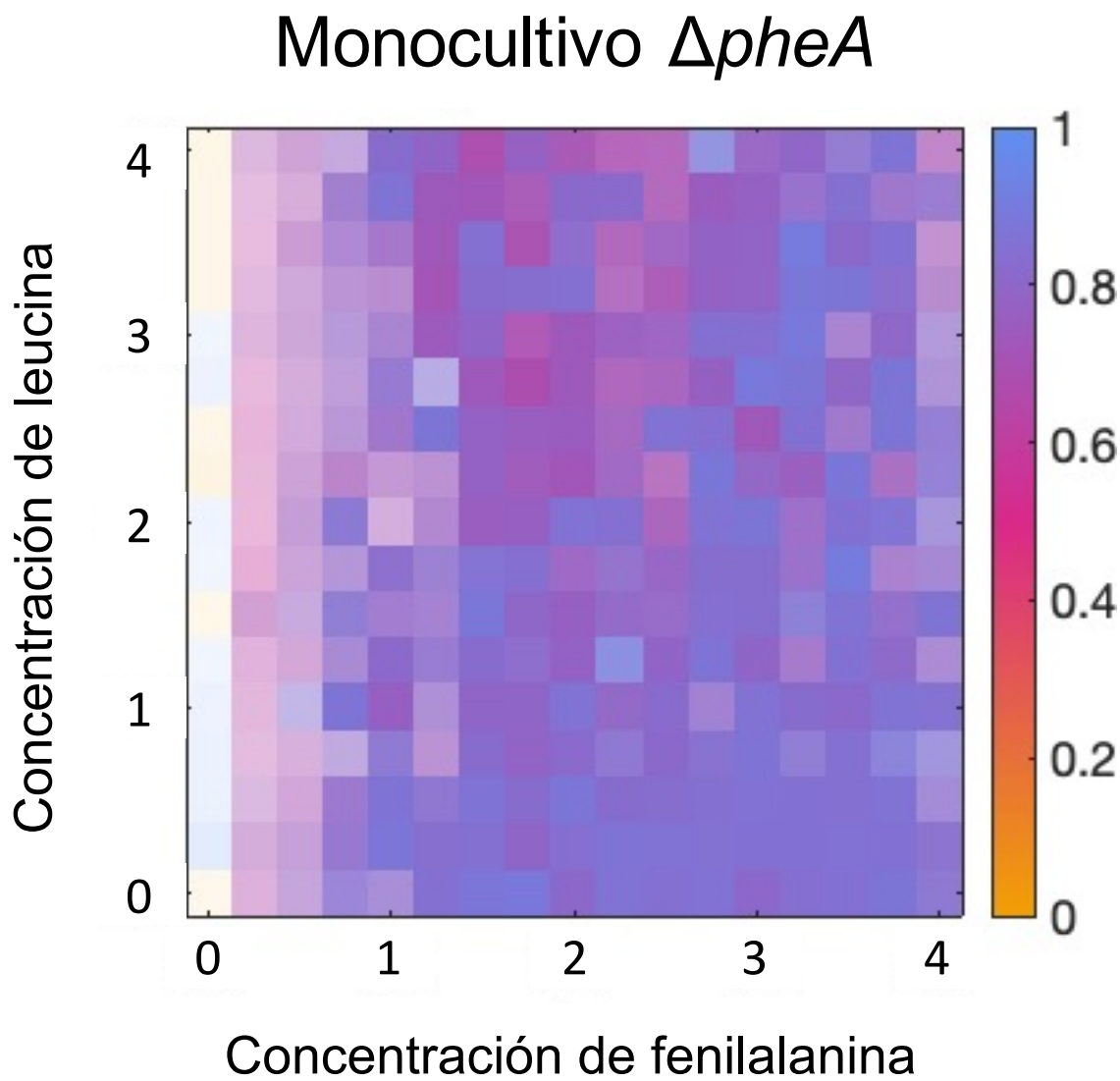


Figura 8.4: Densidad relativa del monocultivo $\Delta pheA$ en matriz de medio mínimo M9 con los aminoácidos leucina-fenilalanina.(N=3).

8.4 MS Capítulo 4: Susceptibilidad y perfiles de interacción

8.4.1 Densidad óptica de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta tyrA$ y el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio mínimo con cloranfenicol

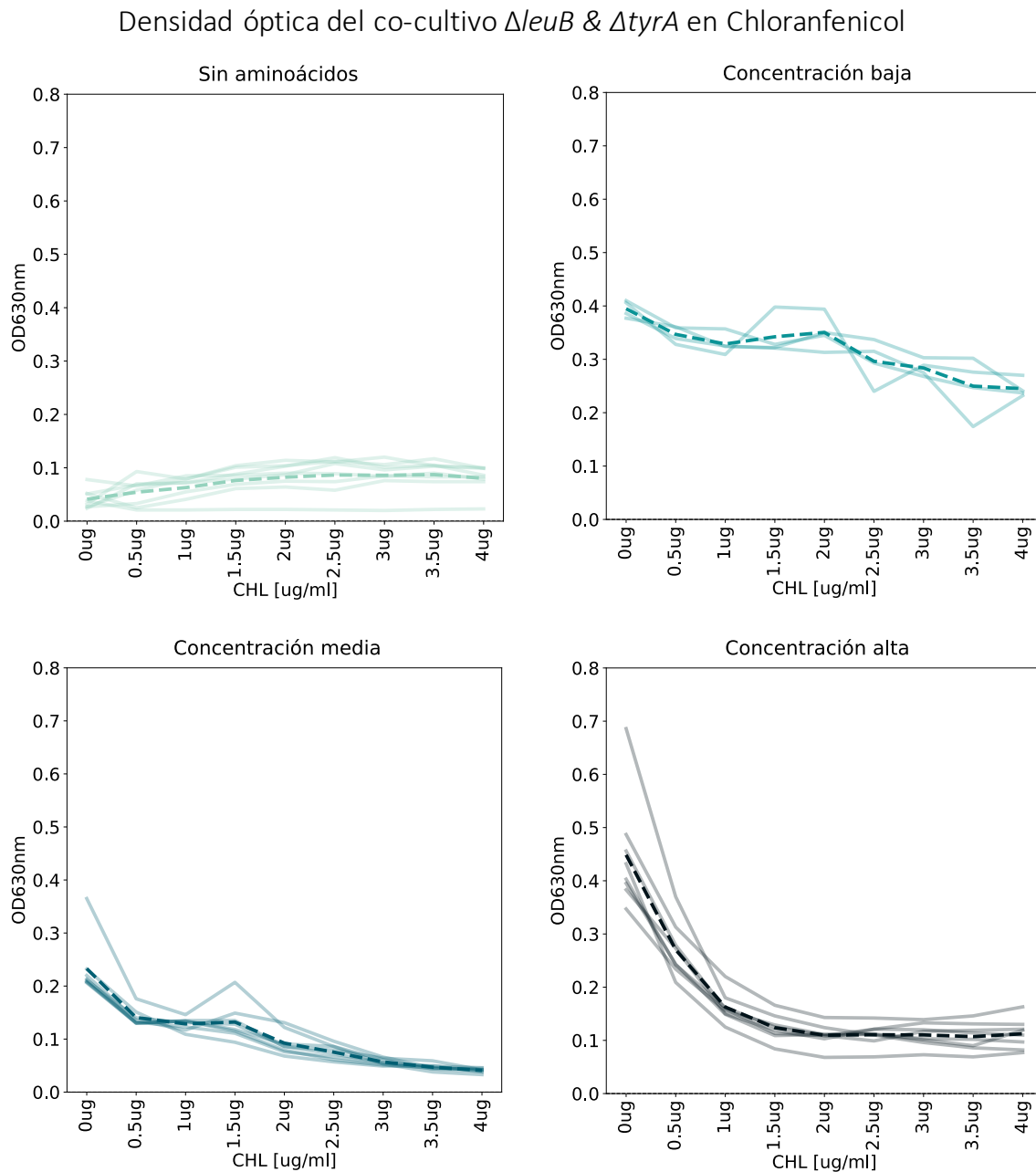


Figura 8.5: Densidad óptica final co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

Densidad óptica del monocultivo $\Delta leuB$ en Chloranfenicol

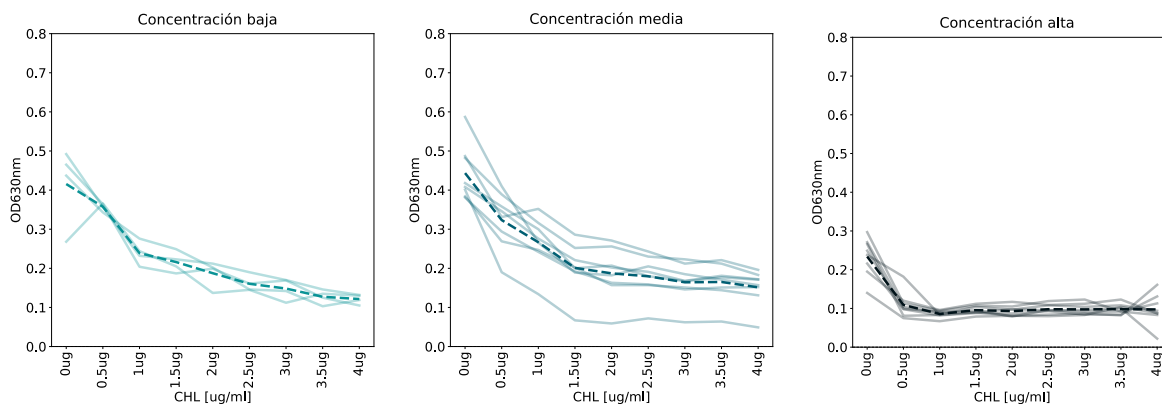


Figura 8.6: Densidad óptica final monocultivo $\Delta leuB$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

Densidad óptica del monocultivo $\Delta tyrA$ en Chloranfenicol

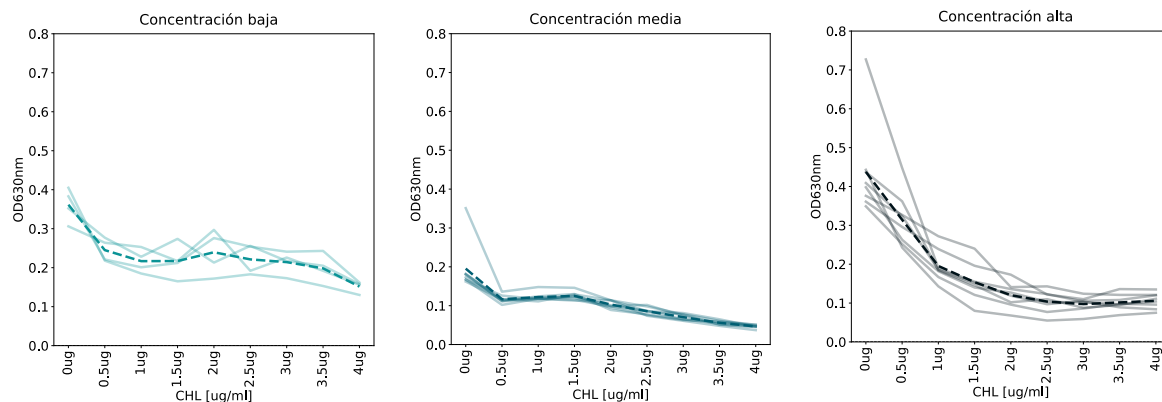


Figura 8.7: Densidad óptica final monocultivo $\Delta tyrA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

8.4.2 Porcentajes de inhibición de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta tyrA$ y el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio mínimo con cloranfenicol

Porcentajes de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio mínimo con cloranfenicol

Porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en Chloranfenicol

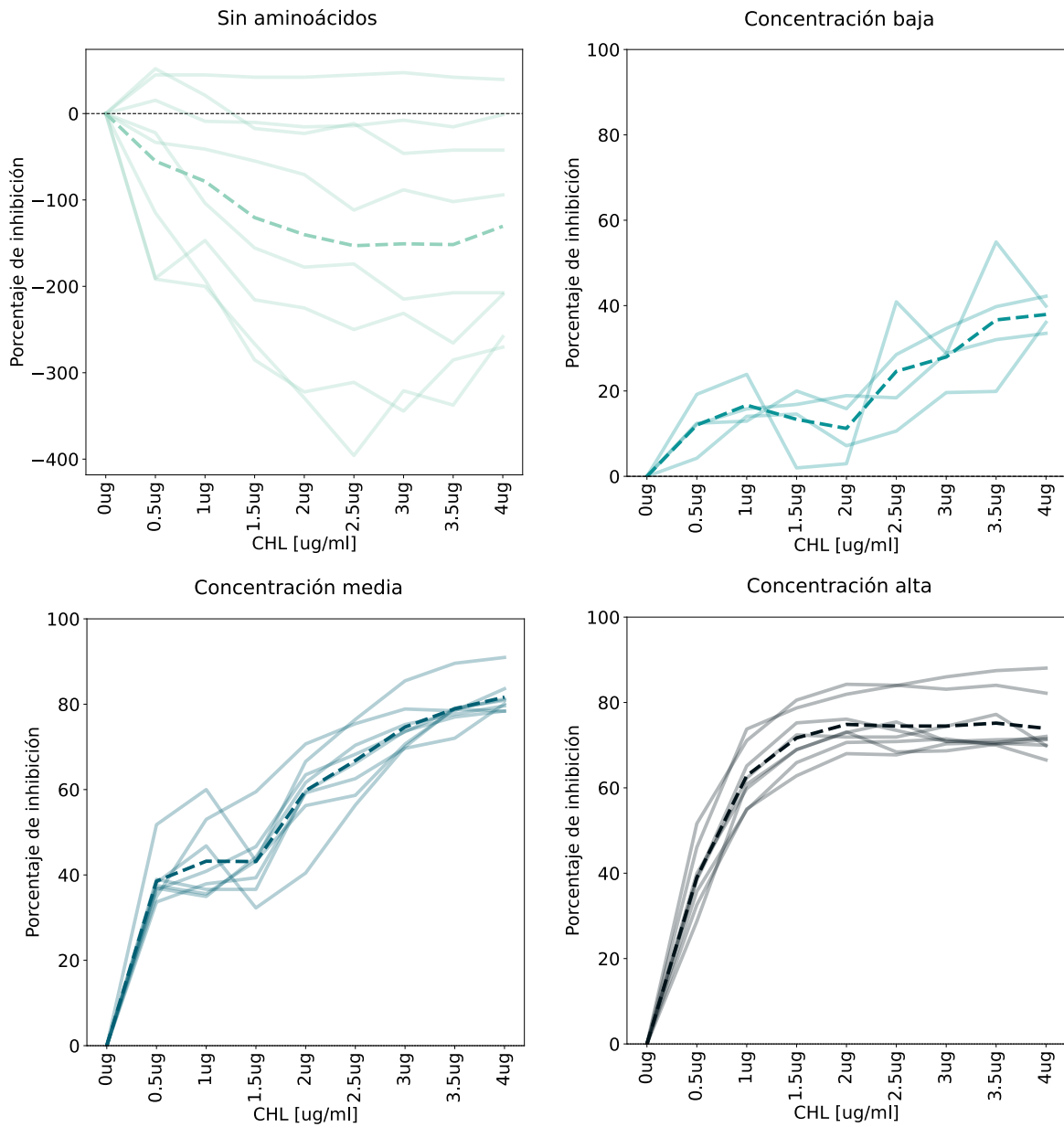


Figura 8.8: Porcentaje de inhibición co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

Concentración CHL	Sin Aminoácidos	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.5 $\mu\text{g/ml}$	-55.077 (± 92.552)	12.017 (± 5.300)	38.553 (± 5.249)	38.993 (± 6.783)
1 $\mu\text{g/ml}$	-78.428 (± 89.746)	16.669 (± 4.293)	43.220 (± 8.620)	62.842 (± 6.429)
1.5 $\mu\text{g/ml}$	-120.424 (± 118.484)	13.349 (± 6.845)	43.134 (± 7.545)	71.693 (± 5.786)
2 $\mu\text{g/ml}$	-140.138 (± 134.546)	11.220 (± 6.430)	59.743 (± 8.429)	74.860 (± 5.243)
2.5 $\mu\text{g/ml}$	-152.960 (± 147.446)	24.606 (± 11.346)	66.787 (± 6.856)	74.470 (± 5.973)
3 $\mu\text{g/ml}$	-150.756 (± 137.656)	27.959 (± 5.369)	74.651 (± 4.998)	74.472 (± 6.052)
3.5 $\mu\text{g/ml}$	-151.658 (± 131.816)	36.647 (± 12.705)	78.940 (± 4.565)	75.163 (± 6.545)
4 $\mu\text{g/ml}$	-130.464 (± 113.319)	37.915 (± 3.359)	81.651 (± 3.859)	73.927 (± 6.806)

Cuadro 8.5: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del co-cultivo ΔleuB & ΔtyrA en medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol.

Porcentaje de inhibición del monocultivo $\Delta leuB$ en Cloranfenicol

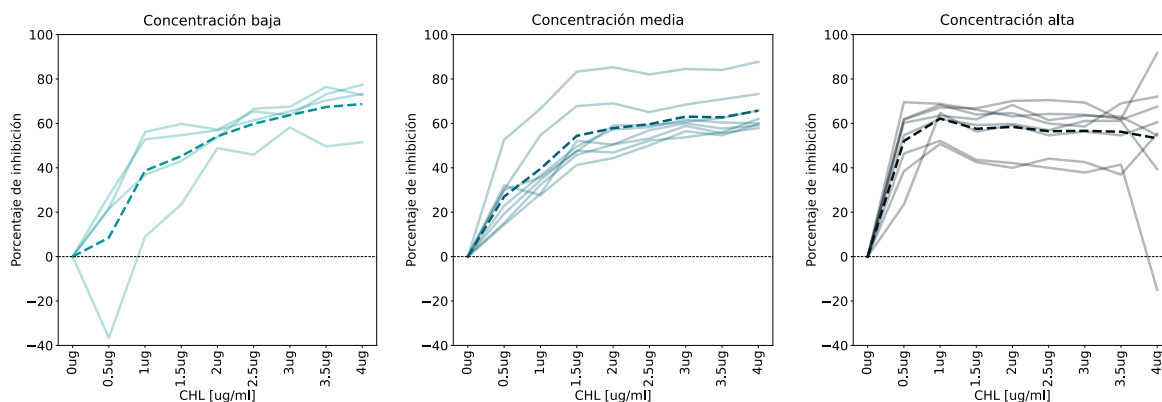


Figura 8.9: Porcentaje de inhibición del monocultivo $\Delta leuB$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

Concentración CHL	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.5 $\mu\text{g/ml}$	8.525 (± 26.142)	27.053 (± 11.598)	52.051 (± 14.139)
1 $\mu\text{g/ml}$	38.692 (± 18.655)	39.521 (± 12.895)	62.176832 (± 6.572)
1.5 $\mu\text{g/ml}$	45.246 (± 13.944)	54.384 (± 13.142)	57.559 (± 8.970)
2 $\mu\text{g/ml}$	54.192 (± 3.348)	57.852 (± 12.697)	58.412 (± 10.615)
2.5 $\mu\text{g/ml}$	59.811 (± 8.261)	59.626 (± 9.537)	56.476 (± 9.499)
3 $\mu\text{g/ml}$	63.704 (± 3.452)	63.056 (± 9.053)	56.644 (± 10.223)
3.5 $\mu\text{g/ml}$	67.375 (± 10.472)	62.713 (± 9.439)	56.226 (± 10.554)
4 $\mu\text{g/ml}$	68.712 (± 10.107)	65.718 (± 9.553)	53.271 (± 29.471)

Cuadro 8.6: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del monocultivo $\Delta leuB$ en medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol.

MS Capítulo 4: Susceptibilidad y perfiles de interacción

Porcentaje de inhibición del monocultivo $\Delta tyrA$ en Cloranfenicol

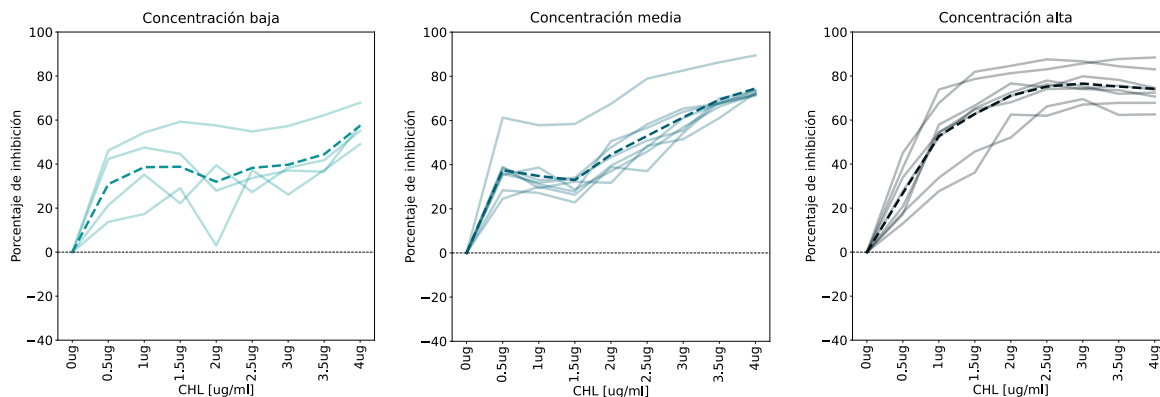


Figura 8.10: Porcentaje de inhibición del monocultivo $\Delta tyrA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

Concentración CHL	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.5 $\mu\text{g/ml}$	30.875 (± 13.694)	37.500 (± 10.156)	26.777 (± 10.713)
1 $\mu\text{g/ml}$	38.597 (± 14.061)	34.852 (± 9.242)	52.734 (± 14.539)
1.5 $\mu\text{g/ml}$	38.787 (± 14.353)	33.003 (± 10.248)	62.759 (± 14.338)
2 $\mu\text{g/ml}$	31.974 (± 19.804)	44.549 (± 10.332)	71.083 (± 9.780)
2.5 $\mu\text{g/ml}$	38.255 (± 10.207)	52.999 (± 11.560)	75.251 (± 7.757)
3 $\mu\text{g/ml}$	39.713 (± 11.198)	61.398 (± 9.191)	76.575 (± 6.610)
3.5 $\mu\text{g/ml}$	44.448 (± 10.454)	69.398 (± 6.849)	75.216 (± 7.793)
4 $\mu\text{g/ml}$	57.434 (± 6.815)	74.490 (± 5.709)	74.195 (± 7.685)

Cuadro 8.7: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del monocultivo $\Delta tyrA$ en medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol.

8.4.3 Densidad óptica de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta tyrA$ y el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio mínimo con ciprofloxacino

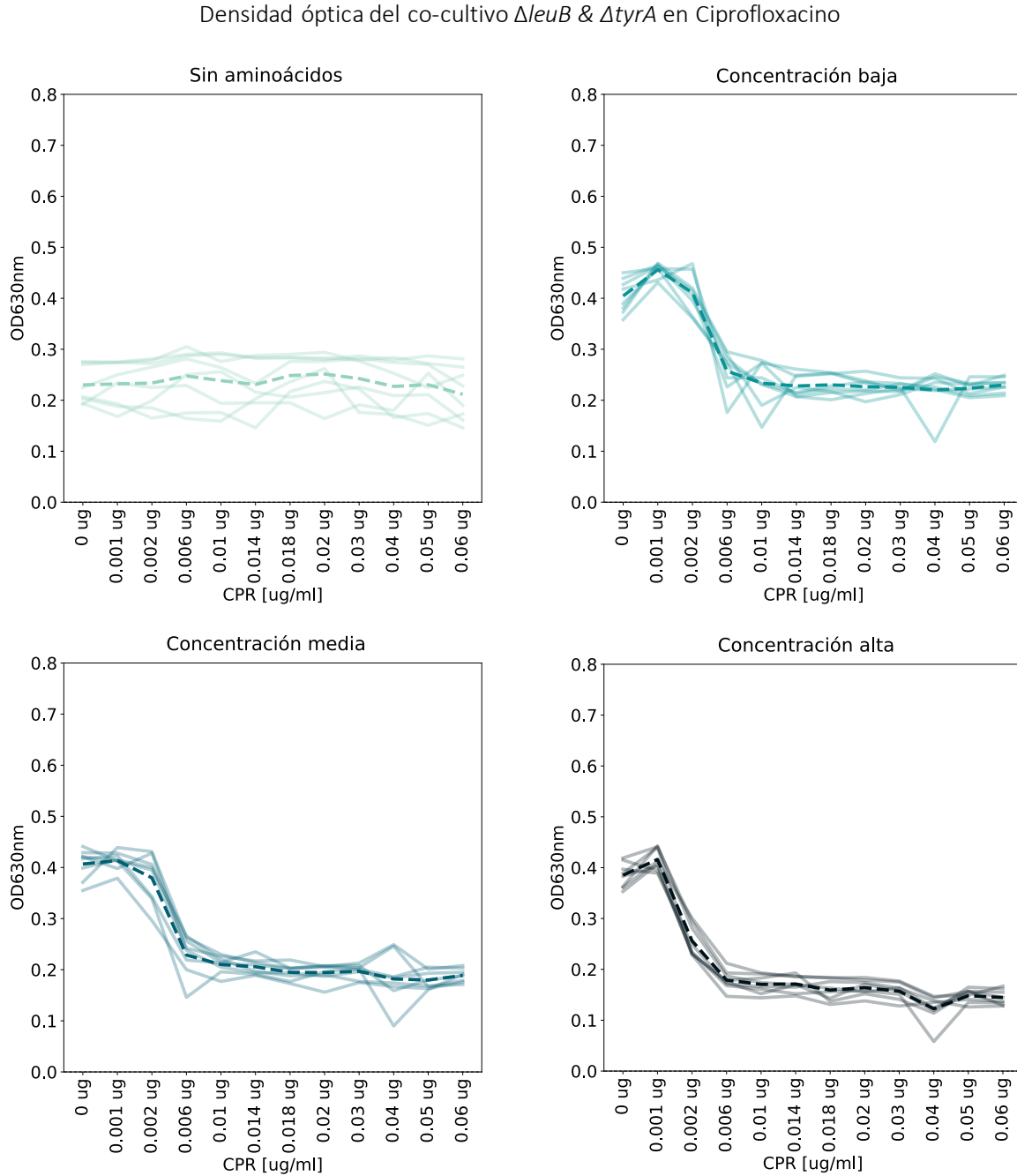


Figura 8.11: Densidad óptica final co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (N=8).

Densidad óptica del monocultivo $\Delta leuB$ en Ciprofloxacino

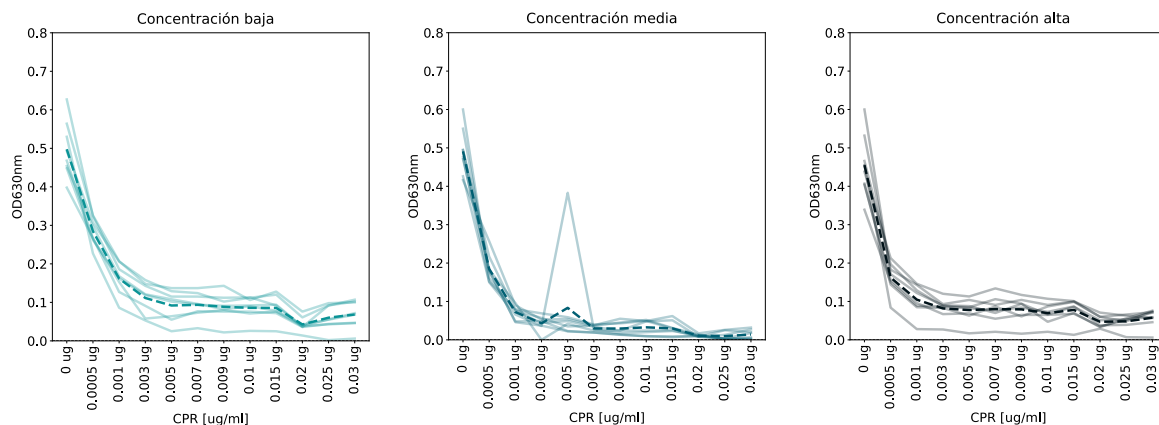


Figura 8.12: Densidad óptica final monocultivo $\Delta leuB$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (N=8).

Densidad óptica del monocultivo $\Delta tyrA$ en Ciprofloxacino

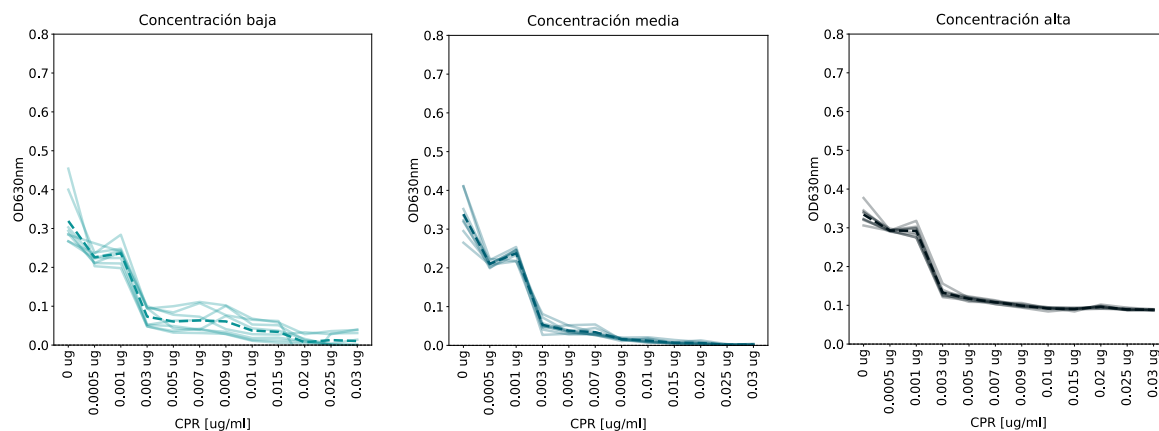


Figura 8.13: Densidad óptica final monocultivo $\Delta tyrA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (N=8).

8.4.4 Porcentajes de inhibición de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta tyrA$ y el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio mínimo con ciprofloxacino

Porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en Ciprofloxacino

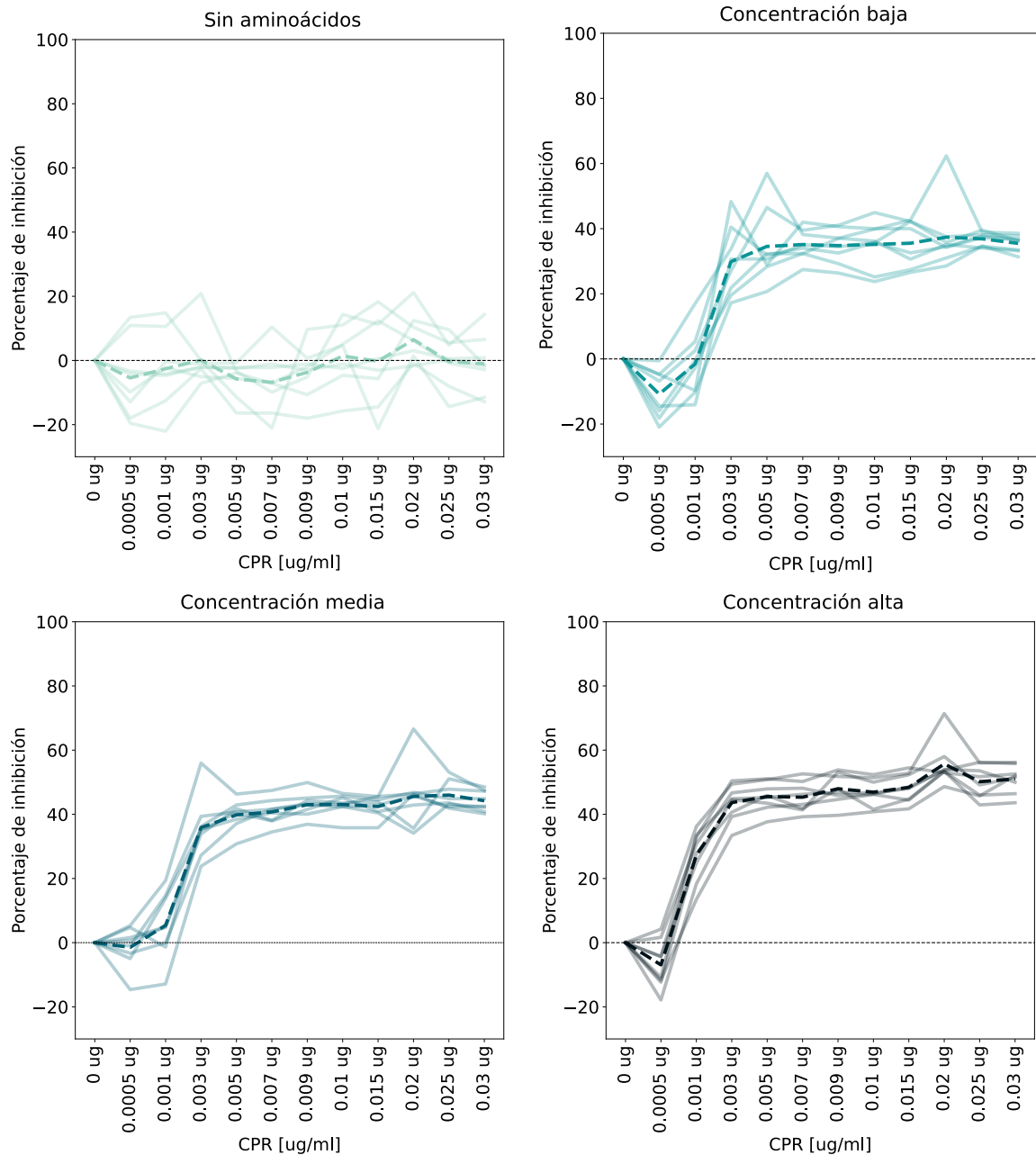


Figura 8.14: Porcentaje de inhibición co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (N=8).

MS Capítulo 4: Susceptibilidad y perfiles de interacción

Concentración CPR	Sin Aminoácidos	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.001 $\mu\text{g/ml}$	-5.433 (± 11.532)	-10.804 (± 6.994)	-1.461 (± 5.987)	-6.922 (± 7.043)
0.002 $\mu\text{g/ml}$	-2.583 (± 10.994)	-1.553 (± 9.411)	5.417 (± 9.755)	27.22 (± 7.419)
0.006 $\mu\text{g/ml}$	0.104 (± 8.108)	29.861 (± 10.050)	35.868 (± 8.958)	43.649 (± 5.283)
0.01 $\mu\text{g/ml}$	-5.769 (± 5.029)	34.547 (± 10.820)	39.814 (± 4.292)	45.529 (± 4.208)
0.014 $\mu\text{g/ml}$	-6.795 (± 9.047)	35.115 (± 4.344)	40.736 (± 3.756)	45.328 (± 4.415)
0.018 $\mu\text{g/ml}$	-3.693 (± 7.610)	34.789 (± 4.882)	42.999 (± 3.568)	47.970 (± 4.495)
0.02 $\mu\text{g/ml}$	1.389 (± 8.918)	35.169 (± 6.827)	43.059 (± 3.095)	46.901 (± 3.972)
0.03 $\mu\text{g/ml}$	-0.247 (± 12.820)	35.527 (± 6.50)	42.443 (± 3.092)	48.380 (± 4.271)
0.04 $\mu\text{g/ml}$	6.499 (± 7.290)	37.379 (± 9.803)	45.557 (± 9.240)	55.692 (± 6.387)

Cuadro 8.8: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del cultivo ΔleuB & ΔtyrA en medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino.

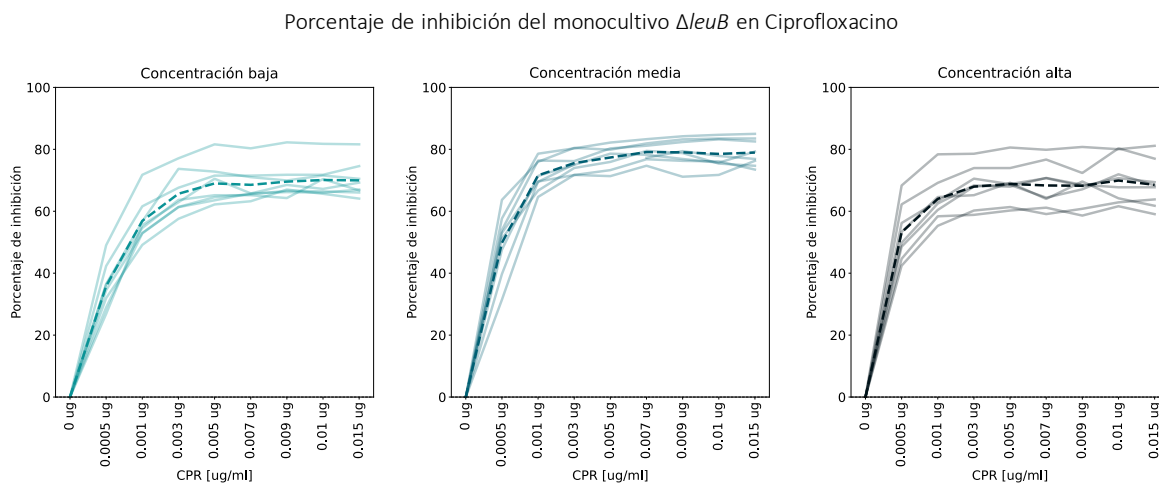


Figura 8.15: Porcentaje de inhibición del monocultivo ΔleuB en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino ($N=8$).

Concentración CPR	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.001 $\mu\text{g/ml}$	35.803 (± 6.730)	49.772 (± 9.537)	53.187 (± 8.225)
0.002 $\mu\text{g/ml}$	56.898 (± 6.541)	71.593 (± 4.639)	64.005 (± 6.679)
0.006 $\mu\text{g/ml}$	65.653 (± 6.260)	75.567 (± 3.152)	67.955 (± 6.184)
0.01 $\mu\text{g/ml}$	68.986 (± 6.047)	77.363 (± 3.678)	68.822 (± 6.073)
0.014 $\mu\text{g/ml}$	68.534318 (± 5.220)	79.112 (± 2.702)	68.329 (± 6.941)
0.018 $\mu\text{g/ml}$	69.570 (± 5.26)	79.037 (± 4.032)	68.237 (± 6.379)
0.02 $\mu\text{g/ml}$	70.096 (± 5)	78.524 (± 4.401)	69.927 (± 6.811)
0.03 $\mu\text{g/ml}$	69.972 (± 5.326)	78.955 (± 4.029)	68.535 (± 6.974)
0.04 $\mu\text{g/ml}$	77.384 (± 3.431)	82.479 (± 1.728)	74.515 (± 3.908)

Cuadro 8.9: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del monocultivo ΔleuB en medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino.

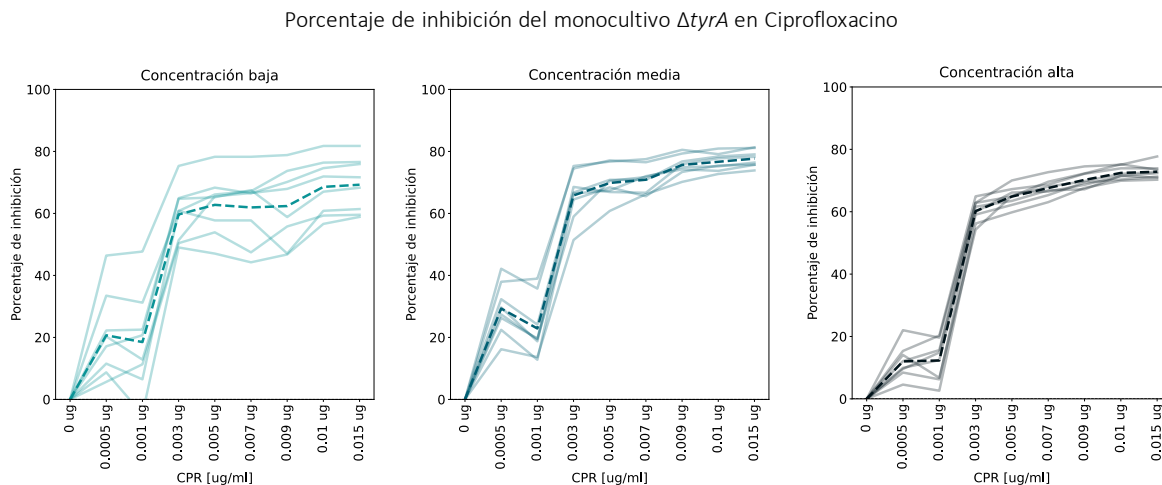


Figura 8.16: Porcentaje de inhibición del monocultivo ΔtyrA en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (N=8).

Concentración CPR	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.001 $\mu\text{g/ml}$	20.691 (± 12.710)	29.313 (± 7.754)	12.012 (± 4.921)
0.002 $\mu\text{g/ml}$	18.497 (± 15.023)	22.881 (± 9.030)	12.305 (± 6.087)
0.006 $\mu\text{g/ml}$	59.666 (± 8.436)	65.800 (± 7.331)	60.211 (± 3.373)
0.01 $\mu\text{g/ml}$	62.766 (± 8.992)	69.834 (± 4.998)	64.860 (± 2.931)
0.014 $\mu\text{g/ml}$	61.926 (± 10.658)	70.877 (± 4.271)	67.592 (± 2.711)
0.018 $\mu\text{g/ml}$	62.378 (± 11.320)	75.647 (± 3.088)	70.201 (± 2.395)
0.02 $\mu\text{g/ml}$	68.557 (± 8.469)	76.658 (± 2.647)	72.441 (± 1.922)
0.03 $\mu\text{g/ml}$	69.258 (± 8.098)	77.675 (± 2.534)	72.822 (± 2.194)
0.04 $\mu\text{g/ml}$	72.792 (± 6.018)	78.011 (± 2.186)	71.203 (± 1.376)

Cuadro 8.10: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del monocultivo $\Delta tyrA$ en medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino.

8.4.5 Densidad óptica de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta pheA$ y el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio mínimo con cloranfenicol

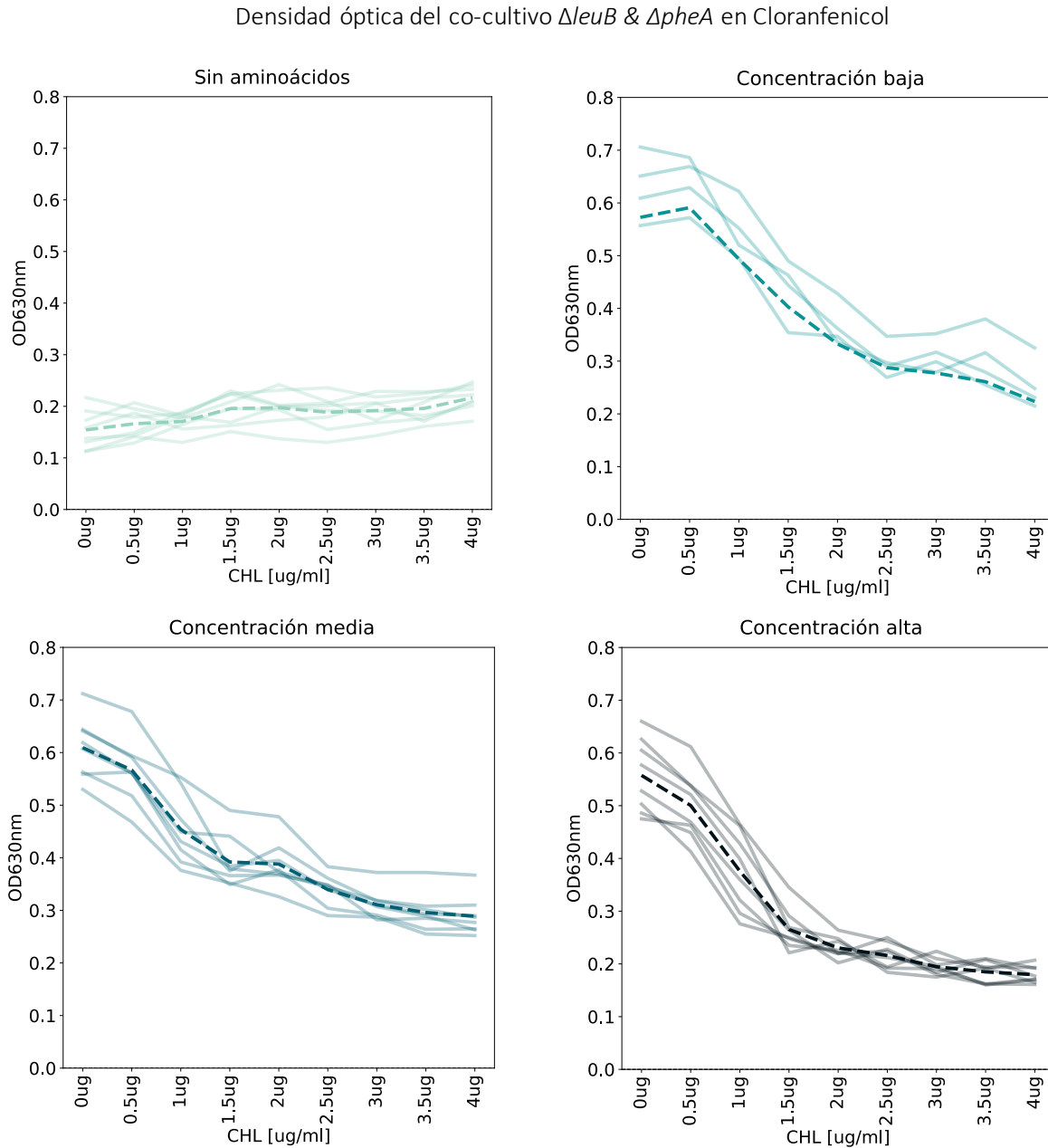


Figura 8.17: Densidad óptica final co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

Densidad óptica del monocultivo $\Delta leuB$ en Cloranfenicol

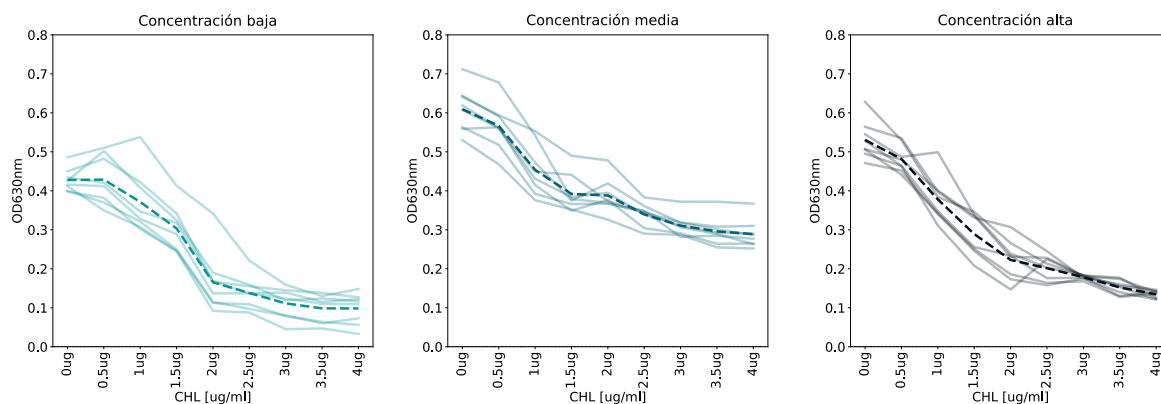


Figura 8.18: Densidad óptica final monocultivo $\Delta leuB$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

Densidad óptica del monocultivo $\Delta pheA$ en Cloranfenicol

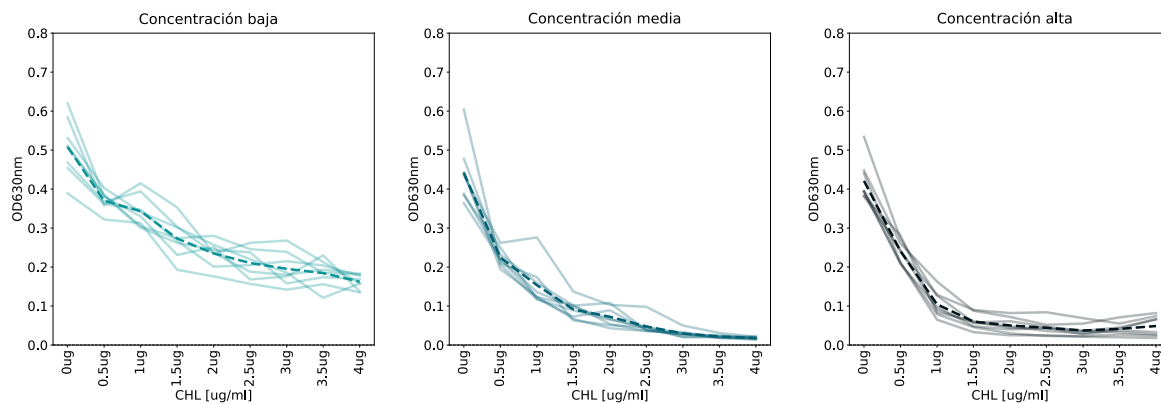


Figura 8.19: Densidad óptica final monocultivo $\Delta pheA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

8.4.6 Porcentajes de inhibición de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta pheA$ y el co-cultivo $\Delta leuB \& \Delta pheA$ en medio mínimo con cloranfenicol

Porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB \& \Delta pheA$ en M9 con Cloranfenicol

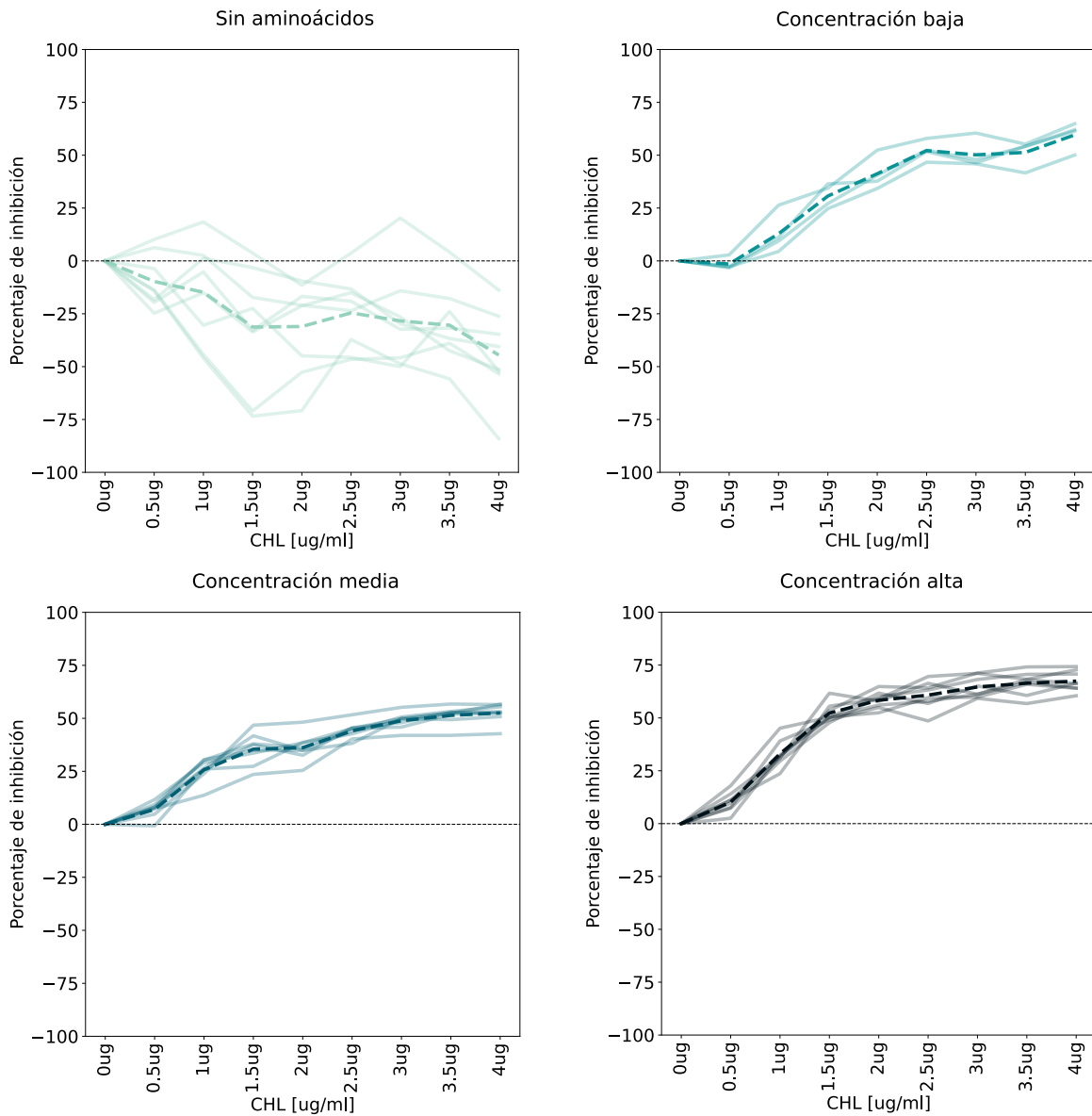


Figura 8.20: Porcentaje de inhibición co-cultivo $\Delta leuB \& \Delta pheA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

Concentración CHL	Sin Aminoácidos	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.5 $\mu\text{g/ml}$	-9.736 (± 12.668)	-3.522 (± 4.481)	7.032 (± 3.685)	10.164 (± 4.631)
1 $\mu\text{g/ml}$	-14.832 (± 23.439)	13.731 (± 6.685)	25.718 (± 5.377)	33.015 (± 6.459)
1.5 $\mu\text{g/ml}$	-31.279 (± 28.412)	29.62 (± 5.038)	35.443 (± 7.461)	52.284 (± 4.546)
2 $\mu\text{g/ml}$	-31.044 (± 22.323)	41.768 (± 5.794)	36.142 (± 6.402)	58.364 (± 3.95)
2.5 $\mu\text{g/ml}$	-24.583 (± 17.462)	49.446 (± 6.309)	44.108 (± 4.042)	60.771 (± 6.563)
3 $\mu\text{g/ml}$	-28.374 (± 23.22)	51.478 (± 5.188)	48.853 (± 3.84)	64.639 (± 4.984)
3.5 $\mu\text{g/ml}$	-30.403 (± 18.116)	54.84 (± 6.903)	51.382 (± 4.305)	66.421 (± 5.482)
4 $\mu\text{g/ml}$	-44.524 (± 21.18)	61.12 (± 4.764)	52.538 (± 4.474)	67.383 (± 4.769)

Cuadro 8.11: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol.

Porcentaje de inhibición del monocultivo $\Delta leuB$ en Cloranfenicol

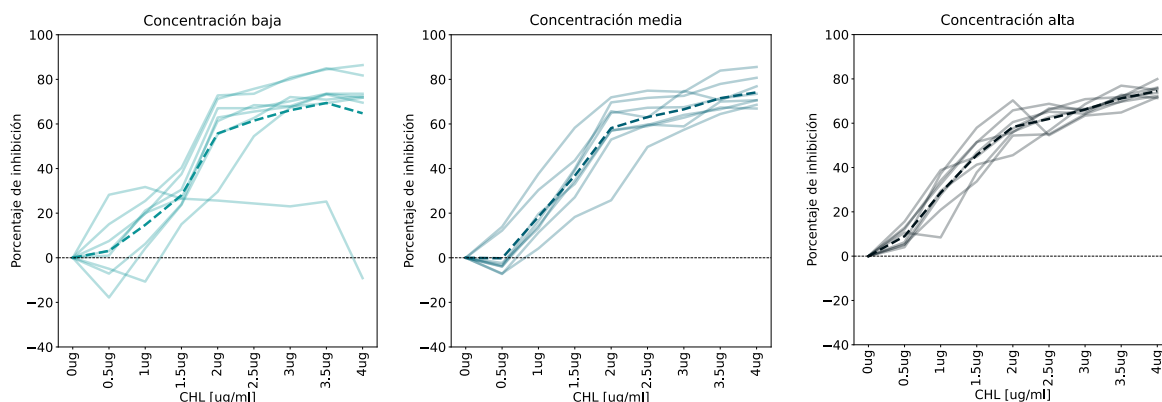


Figura 8.21: Porcentaje de inhibición del monocultivo $\Delta leuB$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

Concentración CHL	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.5 $\mu\text{g/ml}$	3.109 (± 14.178)	-0.223 (± 8.386)	8.997 (± 4.332)
1 $\mu\text{g/ml}$	14.74 (± 13.779)	18.422 (± 10.774)	28.613 (± 9.932)
1.5 $\mu\text{g/ml}$	28.037 (± 8.056)	36.771 (± 11.827)	45.666 (± 7.96)
2 $\mu\text{g/ml}$	55.749 (± 18.242)	58.143 (± 14.651)	58.286 (± 7.496)
2.5 $\mu\text{g/ml}$	61.487 (± 16.361)	63.091 (± 8.034)	61.949 (± 5.716)
3 $\mu\text{g/ml}$	66.145 (± 18.22)	66.56 (± 6.862)	66.184 (± 2.501)
3.5 $\mu\text{g/ml}$	69.402 (± 18.798)	71.547 (± 6.431)	71.208 (± 3.42)
4 $\mu\text{g/ml}$	64.791 (± 30.42)	74.176 (± 6.424)	74.49 (± 2.847)

Cuadro 8.12: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del monocultivo $\Delta leuB$ en medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol.

MS Capítulo 4: Susceptibilidad y perfiles de interacción

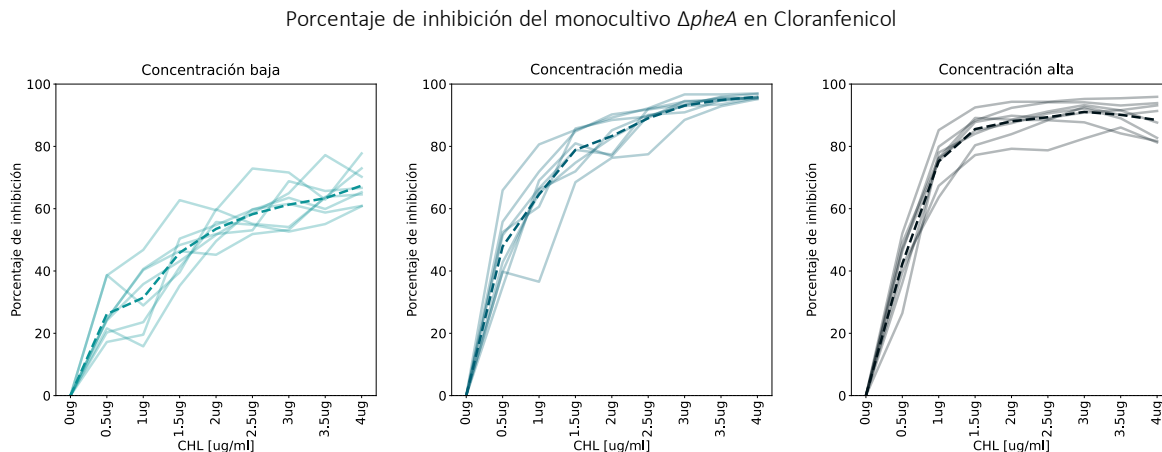


Figura 8.22: Porcentaje de inhibición del monocultivo $\Delta pheA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol (N=8).

Concentración CHL	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.5 $\mu\text{g/ml}$	26.192 (± 8.067)	47.864 (± 10.323)	42.331 (± 8.268)
1 $\mu\text{g/ml}$	31.419 (± 11.156)	64.548 (± 12.751)	75.201 (± 6.849)
1.5 $\mu\text{g/ml}$	45.869 (± 8.394)	78.863 (± 6.545)	85.554 (± 4.968)
2 $\mu\text{g/ml}$	53.501 (± 4.962)	83.299 (± 5.847)	88.024 (± 4.729)
2.5 $\mu\text{g/ml}$	58.23 (± 6.636)	89.037 (± 4.824)	89.366 (± 4.885)
3 $\mu\text{g/ml}$	61.304 (± 7.302)	93.084 (± 2.466)	91.07 (± 4.13)
3.5 $\mu\text{g/ml}$	63.355 (± 6.542)	94.903 (± 1.263)	90.133 (± 3.686)
4 $\mu\text{g/ml}$	67.395 (± 5.911)	95.899 (± 0.685)	88.454 (± 5.934)

Cuadro 8.13: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del monocultivo $\Delta pheA$ en medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol.

8.4.7 Densidad óptica de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta pheA$ y el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio mínimo con ciprofloxacino

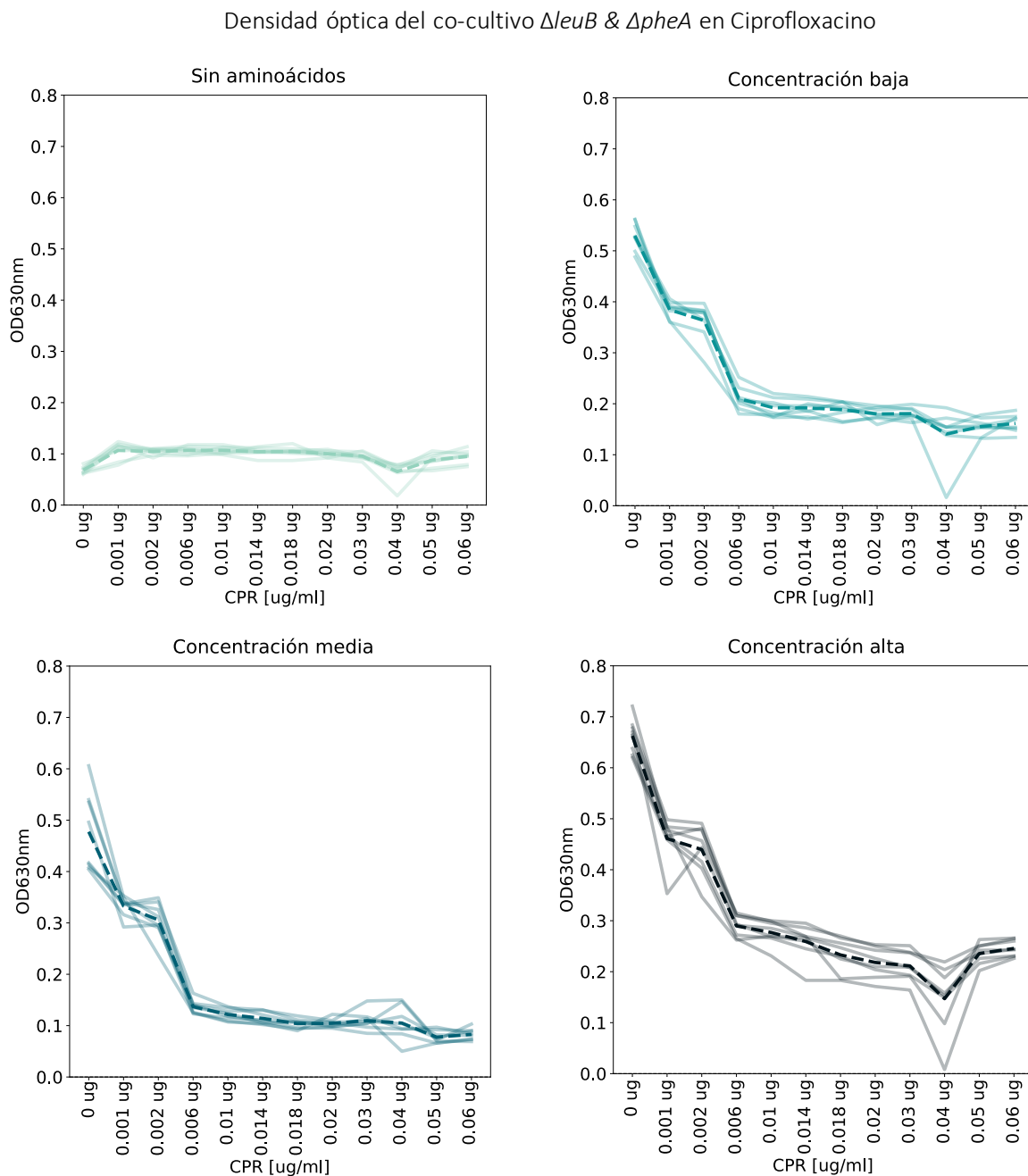


Figura 8.23: Densidad óptica final co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (N=8).

Densidad óptica del monocultivo $\Delta leuB$ en Ciprofloxacino

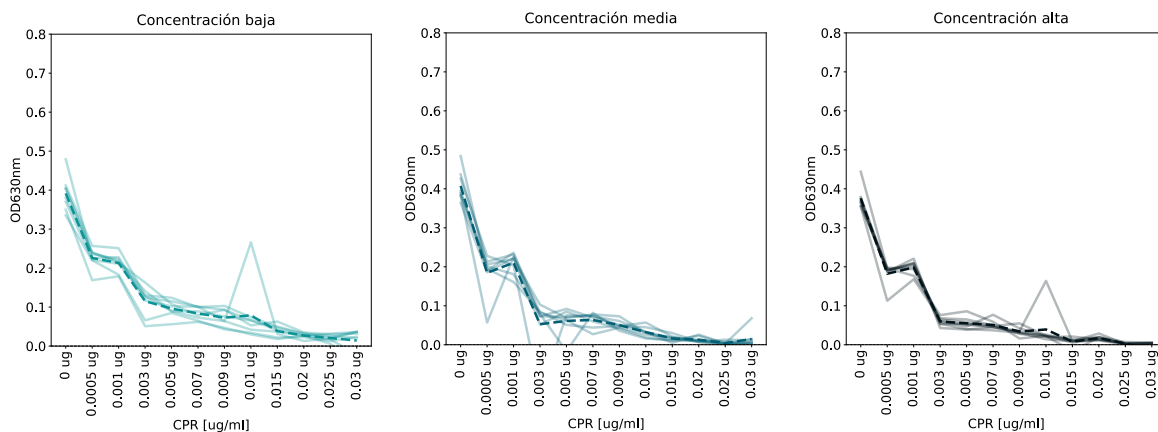


Figura 8.24: Densidad óptica final monocultivo $\Delta leuB$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (N=8).

Densidad óptica del monocultivo $\Delta pheA$ en Ciprofloxacino

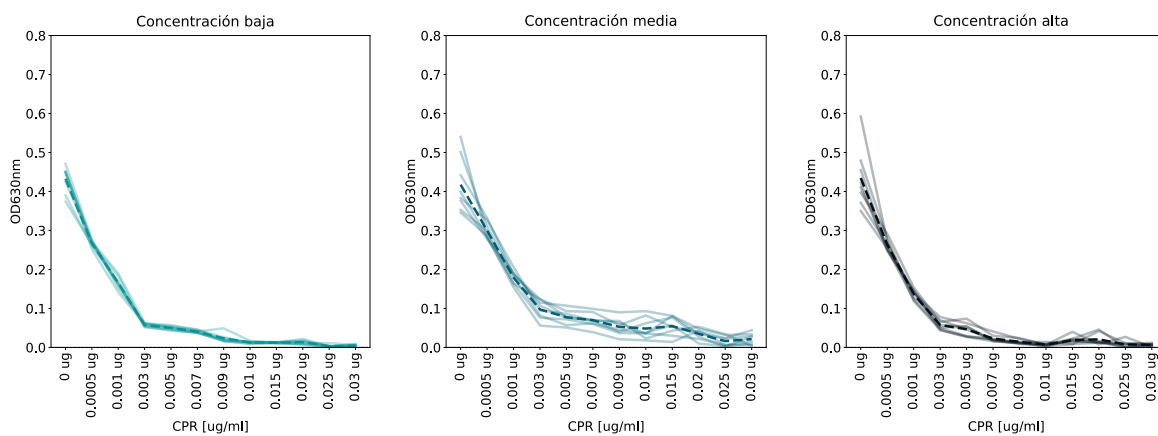


Figura 8.25: Densidad óptica final monocultivo $\Delta pheA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (N=8).

8.4.8 Porcentajes de inhibición de los monocultivos $\Delta leuB$ y $\Delta pheA$ y el co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio mínimo con ciprofloxacino

Porcentaje de inhibición del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en M9 con Ciprofloxacino

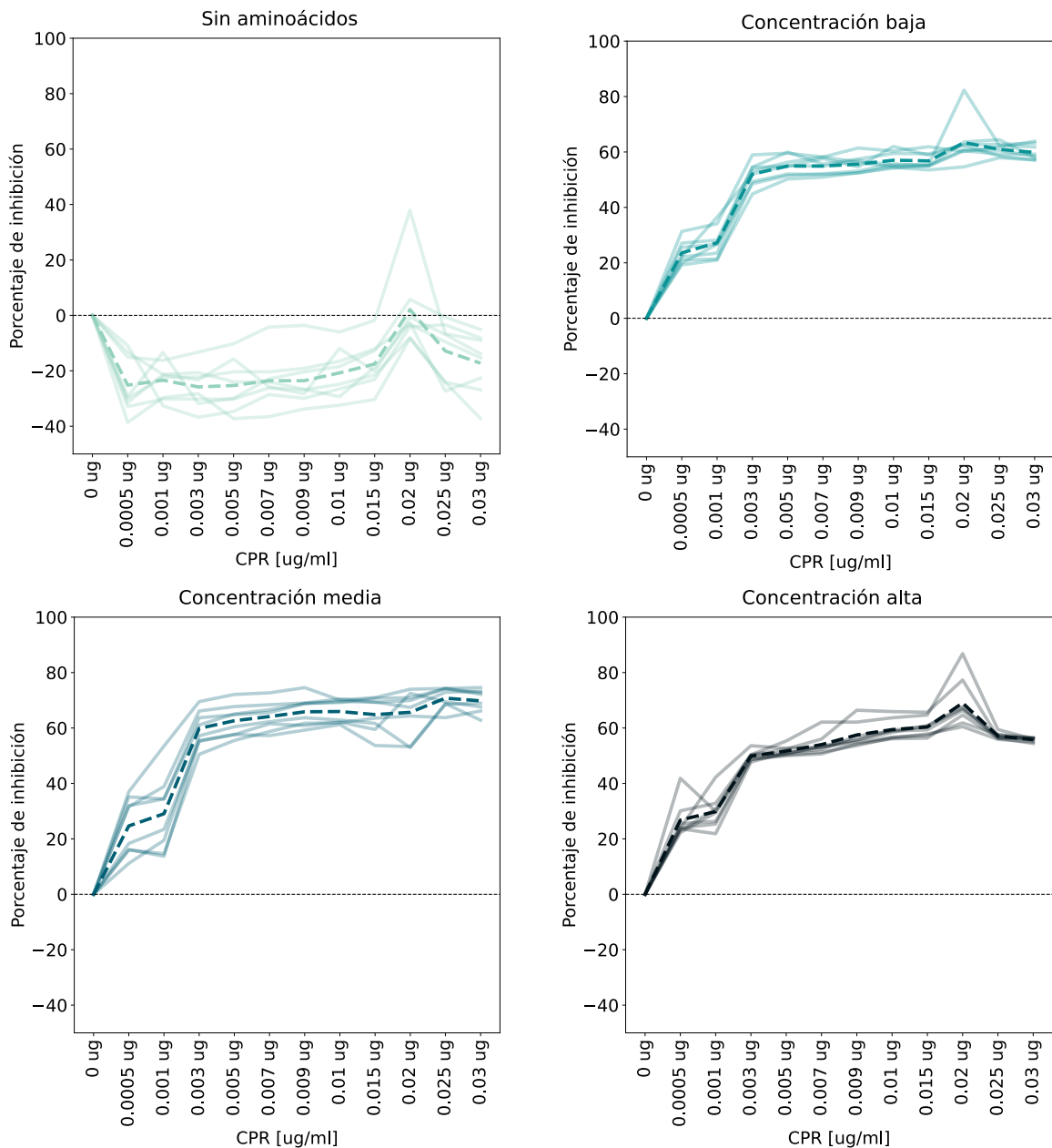


Figura 8.26: Porcentaje de inhibición co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (N=8).

Concentración CPR	Sin Aminoácidos	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.001 $\mu\text{g/ml}$	-25.183 (± 9.785)	23.601 (± 3.849)	24.667 (± 9.576)	26.791 (± 6.127)
0.002 $\mu\text{g/ml}$	-23.395 (± 6.441)	27.251 (± 5.258)	29.05 (± 12.828)	29.84 (± 5.707)
0.006 $\mu\text{g/ml}$	-25.817 (± 6.929)	51.993 (± 4.069)	59.847 (± 5.96)	49.861 (± 1.674)
0.01 $\mu\text{g/ml}$	-25.302 (± 8.808)	54.92 (± 3.367)	62.62 (± 5.382)	51.691 (± 1.628)
0.014 $\mu\text{g/ml}$	-23.576 (± 8.591)	54.925 (± 2.799)	64.129 (± 4.828)	54.01 (± 3.416)
0.018 $\mu\text{g/ml}$	-23.58 (± 8.774)	55.595 (± 2.885)	65.85 (± 4.919)	57.48 (± 4.179)
0.02 $\mu\text{g/ml}$	-20.764 (± 8.491)	57.019 (± 2.885)	65.939 (± 3.938)	59.414 (± 3.341)
0.03 $\mu\text{g/ml}$	-17.548 (± 8.052)	56.784 (± 2.695)	64.833 (± 5.889)	60.349 (± 3.154)
0.04 $\mu\text{g/ml}$	2.099 (± 14.166)	63.388 (± 7.587)	65.661 (± 7.76)	69.026 (± 8.226)

Cuadro 8.14: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del co-cultivo $\Delta\text{leuB}\mathcal{E}\Delta\text{pheA}$ en medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino.

MS Capítulo 4: Susceptibilidad y perfiles de interacción

Porcentaje de inhibición del monocultivo $\Delta leuB$ en Ciprofloxacino

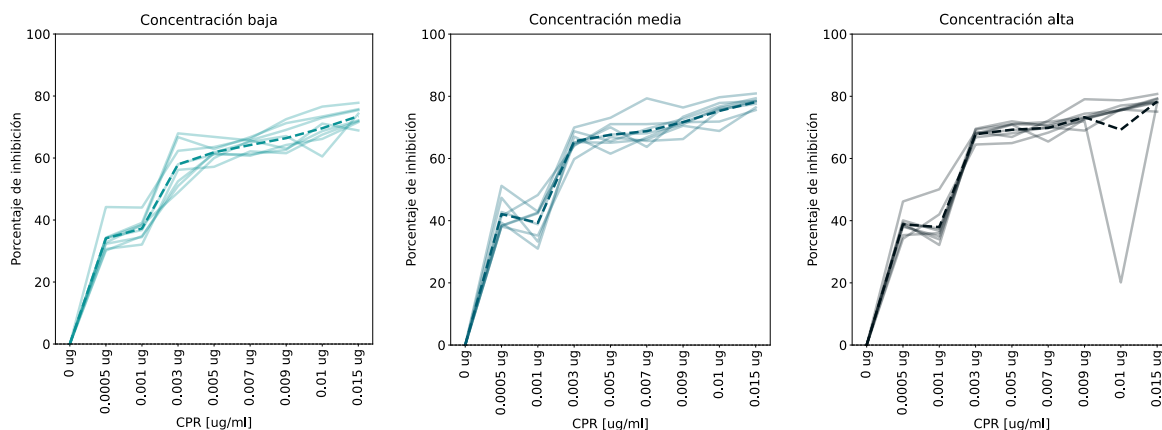


Figura 8.27: Porcentaje de inhibición del monocultivo $\Delta leuB$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (N=8).

Concentración CPR	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.001 $\mu\text{g/ml}$	34.08 (± 4.379)	42.128 (± 4.83)	38.821 (± 3.595)
0.002 $\mu\text{g/ml}$	37.256 (± 3.632)	39.299 (± 5.804)	37.934 (± 5.698)
0.006 $\mu\text{g/ml}$	57.938 (± 7.175)	65.525 (± 3.142)	67.796 (± 1.604)
0.01 $\mu\text{g/ml}$	61.85 (± 2.792)	67.609 (± 3.704)	69.25 (± 2.44)
0.014 $\mu\text{g/ml}$	64.194 (± 2.414)	68.779 (± 4.845)	69.838 (± 2.137)
0.018 $\mu\text{g/ml}$	66.422 (± 4.186)	71.701 (± 2.868)	73.278 (± 2.819)
0.02 $\mu\text{g/ml}$	69.614 (± 5.021)	75.3 (± 3.429)	69.253 (± 19.878)
0.03 $\mu\text{g/ml}$	73.479 (± 2.866)	78.148 (± 1.661)	78.317 (± 1.626)
0.04 $\mu\text{g/ml}$	75.705 (± 1.997)	78.987 (± 2.066)	76.767 (± 1.748)

Cuadro 8.15: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del monocultivo $\Delta leuB$ en medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino.

MS Capítulo 4: Susceptibilidad y perfiles de interacción

Porcentaje de inhibición del monocultivo $\Delta pheA$ en Ciprofloxacino

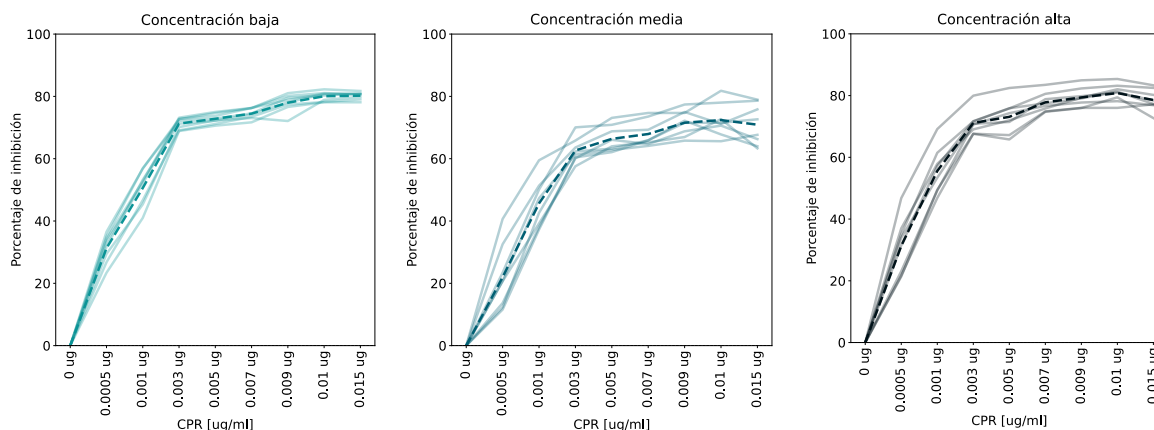


Figura 8.28: Porcentaje de inhibición del monocultivo $\Delta pheA$ en dosis respuesta de medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino (N=8).

Concentración CPR	Baja Concentración	Media Concentración	Alta Concentración
0 $\mu\text{g/ml}$	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
0.001 $\mu\text{g/ml}$	31.282 (± 4.464)	21.955 (± 10.257)	31.309 (± 8.867)
0.002 $\mu\text{g/ml}$	50.598 (± 5.703)	45.67 (± 7.794)	55.579 (± 7.418)
0.006 $\mu\text{g/ml}$	71.27 (± 1.706)	62.655 (± 3.87)	71.14 (± 3.925)
0.01 $\mu\text{g/ml}$	72.807 (± 1.57)	66.366 (± 4.107)	73.111 (± 5.299)
0.014 $\mu\text{g/ml}$	74.468 (± 1.718)	67.92 (± 4.126)	(± 77.811) (± 3.024)
0.018 $\mu\text{g/ml}$	77.968 (± 2.778)	71.543 (± 4.108)	79.398 (± 3.056)
0.02 $\mu\text{g/ml}$	80.048 (± 1.493)	72.399 (± 5.249)	80.812 (± 2.929)
0.03 $\mu\text{g/ml}$	80.229 (± 1.168)	70.916 (± 6.42)	78.565 (± 3.414)
0.04 $\mu\text{g/ml}$	80.111 (± 1.093)	75.107 (± 2.006)	78.479 (± 1.614)

Cuadro 8.16: Promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición final del monocultivo $\Delta pheA$ en medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino.

8.4.9 Análisis estadístico

Utilizando los datos de densidad óptica final calculamos el p-value entre co-cultivos en diferentes concentraciones de aminoácidos en medio mínimo bajo la misma concentración de antibiótico. Para el análisis primero calculamos si los datos siguen una distribución normal, posteriormente realizamos T-test para aquellas muestras con distribución normal y Wilcox-test para aquellas con distribución no normal, consideramos como significativos p-values menores a 0.001.

Condición de medio	Concentración CHL	Tipo de Análisis	p-value	Significativo
Sin Aminoácidos vs Concentración Baja	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.75E-08	Si
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.18e-08	Si
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.474e-06	Si
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	2.621e-06	Si
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	2.884e-05	Si
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	6.886e-05	Si
	3 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0006	Si
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0270	No
	4 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.8784	No
Sin Aminoácidos vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	3.56e-10	Si
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.11e-08	Si
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.944e-06	Si
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	2.874e-07	Si
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.82e-07	Si
	3 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0001	Si
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	2.43e-05	Si
	4 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0005	Si
Sin Aminoácidos vs Concentración Alta	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	2.087e-08	Si
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.172e-07	Si
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	6.394e-05	Si
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0015	No
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0307	No
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0841	No
	3 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.8097	No
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.4001	No
	4 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0038	No

Cuadro 8.17: p-value de la densidad óptica del co-cultivo ΔleuB & ΔtyrA en medio mínimo sin aminoácidos vs medio con aminoácidos en dosis respuesta a cloranfenicol (Parte 1).

Condición de medio	Concentración CHL	Tipo de Análisis	p-value	Significativo
Concentración Baja vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.2944	No
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.4485	No
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.2651	No
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	1	No
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0342	No
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0086	No
	3 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0829	No
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.2107	No
Concentración Baja vs Concentración Alta	4 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0069	No
	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.6821	No
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0128	No
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0058	No
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0001	Si
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0003	Si
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0006	Si
	3 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0008	Si
Concentración Media vs Concentración Alta	3.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0100	No
	4 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0104	No
	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.1281	No
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0512	No
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0424	No
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0001	Si
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.950e-06	Si
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.141e-07	Si
Concentración Alta	3 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0001	Si
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	4 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.897e-05	Si

Cuadro 8.18: p-value de la densidad óptica del co-cultivo ΔleuB & ΔtyrA en medio mínimo con aminoácidos en dosis respuesta a cloranfenicol (Parte 2).

MS Capítulo 4: Susceptibilidad y perfiles de interacción

Condición de medio	Concentración CHL	Tipo de Análisis	p-value	Significativo
Sin Aminoácidos vs Concentración Baja	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.748E-08	Si
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.181E-08	Si
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.000001474	Si
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.000002621	Si
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.00002884	Si
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.00006886	Si
	3 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0006	Si
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.027	No
	4 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.8784	No
Sin Aminoácidos vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	3.557E-10	Si
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.105E-08	Si
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.000001936	Si
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	2.871E-07	Si
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.000000182	Si
	3 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0001	Si
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0000243	Si
	4 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0005	Si
Sin Aminoácidos vs Concentración Alta	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	2.087E-08	Si
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.172E-07	Si
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.00006394	Si
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0015	No
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0307	No
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0841	No
	3 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.8097	No
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.4001	No
	4 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0038	No

Cuadro 8.19: p-value de la densidad óptica del co-cultivo ΔleuB & ΔpheA en medio mínimo sin aminoácidos vs medio con aminoácidos en dosis respuesta a cloranfenicol (Parte 1).

Condición de medio	Concentración CHL	Tipo de Análisis	p-value	Significativo
Concentración Baja vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.2944	No
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.4485	No
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.2651	No
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	1	No
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0342	No
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0086	No
	3 $\mu\text{g/ml}$	Wilcow test	0.0829	No
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.2107	No
Concentración Baja vs Concentración Media	4 $\mu\text{g/ml}$	Wilcow test	0.0069	No
	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.6821	No
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0128	No
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0058	No
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0001	Si
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0003	Si
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0006	Si
	3 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0008	Si
Concentración Media vs Concentración Alta	3.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.01002	No
	4 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0104	No
	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.1281	No
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0512	No
	1 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0424	No
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0001	Si
	2 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.9509E-06	Si
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.1416E-07	Si
Concentración Alta	3 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0001	Si
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	4 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.00001897	Si

Cuadro 8.20: p-value de la densidad óptica del co-cultivo ΔleuB & ΔpheA en medio mínimo con aminoácidos en dosis respuesta a cloranfenicol (Parte 2).

Condición de medio	Concentración CPR	Tipo de Análisis	p-value	Significativo
Sin Aminoácidos vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.11E-06	Si
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.6959	No
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.8439	No
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.8861	No
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.2711	No
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.1724	No
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.3208	No
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.7209	No
Sin Aminoácidos vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.21E-06	Si
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	T-test	2.00E-05	Si
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.4419	No
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.1908	No
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.2184	No
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0056	No
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0069	No
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0232	No
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.1303	No
Sin Aminoácidos vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	T-test	6.35E-07	Si
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.2476	No
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0083	No
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0085	No
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0127	No
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0001	Si
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0005	Si
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0006	Si
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0001	Si

Cuadro 8.21: p-value de la densidad óptica del co-cultivo ΔleuB & ΔtyrA en medio mínimo sin aminoácidos vs medio con aminoácidos en dosis respuesta a ciprofloxacino (Parte 1).

Condición de medio	Concentración CPR	Tipo de Análisis	p-value	Significativo
Concentración Baja vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.8891	No
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0019	No
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.179	No
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.1797	No
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.2088	No
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0342	No
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0016	No
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0018	No
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0004	Si
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.1718	No
Concentración Baja vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.2088	No
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0046	No
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0001	Si
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0005	Si
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0053	No
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.41E-05	Si
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	7.21E-06	Si
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.28E-06	Si
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.90E-07	Si
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0062	Si
Concentración Media vs Concentración Alta	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.1352	No
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.7908	No
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0003	Si
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0101	No
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0005	Si
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0007	Si
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0017	No
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0062	No
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0001	Si
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0069	No

Cuadro 8.22: p-value de la densidad óptica del co-cultivo ΔleuB & ΔtyrA en medio mínimo con aminoácidos en dosis respuesta a ciprofloxacino (Parte 2).

Condición de medio	Concentración CPR	Tipo de Análisis	p-value	Significativo
Sin Aminoácidos vs Concentración Baja	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	5.23E-11	Si
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0001	Si
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.02E-06	Si
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.74E-07	Si
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.25E-08	Si
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	9.21E-08	Si
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	T-test	8.98E-09	Si
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.02E-09	Si
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0133	No
Sin Aminoácidos vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.27E-06	Si
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0001	Si
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.009	No
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0723	No
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.8556	No
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.2684	No
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.073	No
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.006	No
Sin Aminoácidos vs Concentración Alta	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	9.01E-11	Si
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0001	Si
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	3.69E-09	Si
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	2.52E-08	Si
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0008	Si
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	6.23E-06	Si
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	T-test	6.31E-06	Si
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	5.28E-06	Si
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0104	No

Cuadro 8.23: p-value de la densidad óptica del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio mínimo sin aminoácidos vs medio con aminoácidos en dosis respuesta a ciprofloxacino (Parte 1).

Condición de medio	Concentración CPR	Tipo de Análisis	p-value	Significativo
Concentración Baja vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.107	No
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	T-test	6.66E-05	Si
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0156	No
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	6.57E-06	Si
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	8.53E-07	Si
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	T-test	5.28E-08	Si
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	6.93E-08	Si
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	T-test	3.35E-09	Si
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	9.47E-07	Si
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0399	No
Concentración Baja vs Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	7.35E-07	Si
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0104	No
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0046	No
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	4.40E-06	Si
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.60E-06	Si
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0073	No
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.007	No
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0081	No
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0217	No
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.7123	No
Concentración Meida vs Concentración Alta	0 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.0001	Si
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0011	No
	0.002 $\mu\text{g/ml}$	T-test	3.00E-05	Si
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	T-test	1.16E-09	Si
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	T-test	8.39E-09	Si
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	Wilcox test	0.0009	Si
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	T-test	5.51E-06	Si
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	T-test	5.38E-06	Si
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	T-test	2.73E-06	Si
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	T-test	0.1451	No

Cuadro 8.24: p-value de la densidad óptica del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio mínimo con aminoácidos en dosis respuesta a ciprofloxacino (Parte 2).

8.5 MS Capítulo 5: Cambios en la velocidad de crecimiento que modifican los perfiles de interacción

8.5.1 Velocidad de crecimiento

Las Tablas 8.25, 8.26, 8.27 y 8.28 resumen los datos utilizados para las Figuras 5.5, 5.6, 5.7 y 5.8 del capítulo 5.

Medio mínimo	Concentración Cloranfenicol	Vmax	std	Tiempo hrs
Sin Aminoácidos	0 $\mu\text{g/ml}$	0.07939164	0.006168935	10
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.076067275	0.007429949	16.66
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.084310679	0.004790655	11.66
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.062939561	0.007208751	16.66
Concentración Baja	0 $\mu\text{g/ml}$	0.397829835	0.007570435	10.33
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.167933546	0.004316668	14
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.065347701	0.004624616	19.66
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.044453663	0.011230247	24
Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	0.376940746	0.006977163	10.66
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.14086161	0.006253922	16.66
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.064504762	0.017595761	24
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.059558026	0.027192479	10.33
Concentración Alta	0 $\mu\text{g/ml}$	0.366781264	0.01700656	12
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.188638651	0.027581533	18.33
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.093389174	0.196403471	24
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.072188096	0.251089189	24

Cuadro 8.25: Vmax del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol.

MS Capítulo 5: Cambios en la velocidad de crecimiento que modifican los perfiles de interacción

Medio mínimo	Concentración Cloranfenicol	Vmax	std	Tiempo hrs
Sin Aminoácidos	0 $\mu\text{g/ml}$	0.074153606	0.027422655	24
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.041202172	0.013396675	24
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.031199804	0.008405567	20:20
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.00175592	0.011179698	24
Concentración Baja	0 $\mu\text{g/ml}$	0.458086418	0.005081372	7:40
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.210789054	0.002509404	8:20
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.126240525	0.00193507	5:20
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.101881442	0.004806881	3:40
Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	0.414849561	0.008542002	8:40
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.192506531	0.002911937	10
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.122431284	0.002189949	8
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.098720733	0.002317517	5:40
Concentración Alta	0 $\mu\text{g/ml}$	0.40985387	0.010545335	9
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.174434686	0.006069026	9:40
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.101591241	0.001851096	7:20
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.131954326	0.012953015	4:20

Cuadro 8.26: Vmax del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ en medio mínimo con aminoácidos y cloranfenicol.

Medio mínimo	Concentración Ciprofloxacino	Vmax	std	Tiempo hrs
Sin Aminoácidos	0 $\mu\text{g/ml}$	0.090730436	0.04397512	24
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	0.056575498	0.012207714	17:20
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	0.055190058	0.012544427	12:40
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	0.092079923	0.012645386	17:20
Concentración Baja	0 $\mu\text{g/ml}$	0.48973448	0.009194123	8
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	0.48973448	0.009194123	8
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	0.499144203	0.009686299	8
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	0.505035664	0.027260164	8:40
Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	0.456025492	0.007740276	8:40
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	0.447704699	0.009192989	9
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	0.47927369	0.00631124	9
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	0.455436738	0.008848141	8:40
Concentración Alta	0 $\mu\text{g/ml}$	0.448094417	0.006229188	9
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	0.437735942	0.009830254	9:20
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	0.4423761	0.02022691	8:40
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	0.434393523	0.014262778	9:20

Cuadro 8.27: Vmax del co-cultivo $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ en medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino.

MS Capítulo 5: Cambios en la velocidad de crecimiento que modifican los perfiles de interacción

Medio mínimo	Concentración Ciprofloxacino	Vmax	std	Tiempo hrs
Sin Aminoácidos	0 $\mu\text{g/ml}$	0.074153606	0.027422655	24
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.041202172	0.013396675	24
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.031199804	0.008405567	20:20
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.00175592	0.011179698	24
Concentración Baja	0 $\mu\text{g/ml}$	0.458086418	0.005081372	7:40
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.210789054	0.002509404	8:20
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.126240525	0.00193507	5:20
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.101881442	0.004806881	3:40
Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	0.414849561	0.008542002	8:40
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.192506531	0.002911937	10
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.122431284	0.002189949	8
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.098720733	0.002317517	5:40
Concentración Alta	0 $\mu\text{g/ml}$	0.40985387	0.010545335	9
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.174434686	0.006069026	9:40
	3 $\mu\text{g/ml}$	0.101591241	0.001851096	7:20
	4 $\mu\text{g/ml}$	0.131954326	0.012953015	4:20

Cuadro 8.28: Vmax del co-cultivo ΔleuB & ΔpheA en medio mínimo con aminoácidos y ciprofloxacino.

Concentración Ciprofloxacino	Vmax	std	Tiempo hrs
0 $\mu\text{g/ml}$	0.121804174	0.048147203	10
0.014 $\mu\text{g/ml}$	0.061258678	0.021885869	6:40
0.03 $\mu\text{g/ml}$	0.000115029	0.010071648	4
0.05 $\mu\text{g/ml}$	0.052910068	0.028656943	3:20

Cuadro 8.29: Vmax del co-cultivo ΔleuB & ΔtyrA en medio rico LB y ciprofloxacino.

Concentración Ciprofloxacino	Vmax	std	Tiempo hrs
0 $\mu\text{g/ml}$	0.109003726	0.040825852	5:40
0.014 $\mu\text{g/ml}$	0.013656842	0.035985012	16:20
0.03 $\mu\text{g/ml}$	0.06191806	0.03704209	17:20
0.05 $\mu\text{g/ml}$	0.00600093	0.076777255	24

Cuadro 8.30: Vmax del co-cultivo ΔleuB & ΔpheA en medio rico LB y ciprofloxacino.

8.5.2 Abundancia y viabilidad de fenotipos

Tratamiento			
Medio	Antibiótico	$\Delta leuB$	$\Delta tyrA$
Sin Aminoácidos	0 $\mu\text{g/ml}$	XXX	XX
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	XX	XX
	1 $\mu\text{g/ml}$	XXX	XXX
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	7	1
	2 $\mu\text{g/ml}$	XX	XX
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	XX	XX
	3 $\mu\text{g/ml}$	29	20
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	XX	X
	4 $\mu\text{g/ml}$	XXX	XXX

Cuadro 8.31: Viabilidad de los fenotipos $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ posterior al tratamiento en medio mínimo con cloranfenicol.

MS Capítulo 5: Cambios en la velocidad de crecimiento que modifican los perfiles de interacción

Tratamiento			
Medio	Antibiótico	$\Delta leuB$	$\Delta tyrA$
Sin Aminoácidos	0 $\mu\text{g/ml}$	X	XXX
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	X	XX
	0.003 $\mu\text{g/ml}$	155	XXX
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	57	89
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	XX	XXX
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	XX	XXXX
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	51	119
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	XX	XXXX
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	XX	XXXXX
Concentración Baja	0 $\mu\text{g/ml}$	106	XXXX
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	68	62
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	31	56
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	47	43
Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	0	XXXX
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	XX	XX
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	XXX	XXX
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	XX	XX
Concentración Alta	0 $\mu\text{g/ml}$	X	XXXXX
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	31	19
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	51	36
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	6	17

Cuadro 8.32: Viabilidad de los fenotipos $\Delta leuB$ & $\Delta tyrA$ posterior al tratamiento en medio mínimo con ciprofloxacino.

Tratamiento			
Medio	Antibiótico	$\Delta leuB$	$\Delta pheA$
Sin Aminoácidos	0 $\mu\text{g/ml}$	1	2
	0.5 $\mu\text{g/ml}$	1	0
	1 $\mu\text{g/ml}$	97	23
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	17	7
	2 $\mu\text{g/ml}$	60	12
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	0	0
	3 $\mu\text{g/ml}$	0	0
	3.5 $\mu\text{g/ml}$	31	15
	4 $\mu\text{g/ml}$	7	8

Cuadro 8.33: Viabilidad de los fenotipos $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ posterior al tratamiento en medio mínimo con cloranfenicol.

MS Capítulo 5: Cambios en la velocidad de crecimiento que modifican los perfiles de interacción

Tratamiento			
Medio	Antibiótico	$\Delta leuB$	$\Delta pheA$
Sin Aminoácidos	0 $\mu\text{g/ml}$	XXXX	XXXXX
	0.001 $\mu\text{g/ml}$	XXX	XXXX
	0.003 $\mu\text{g/ml}$	XXXXX	XXXXX
	0.006 $\mu\text{g/ml}$	XXXX	XXXXX
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	XXXX	XXXX
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	XXXX	XXXX
	0.018 $\mu\text{g/ml}$	XXX	XXXX
	0.02 $\mu\text{g/ml}$	XXXX	XXXXX
	0.03 $\mu\text{g/ml}$	XXXXX	XXXXX
Concentración Baja	0 $\mu\text{g/ml}$	XXXX	0
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	3	16
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	11	42
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	41	68
Concentración Media	0 $\mu\text{g/ml}$	XXXX	3
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	6	15
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	5	3
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	2	8
Concentración Alta	0 $\mu\text{g/ml}$	XXX	0
	0.014 $\mu\text{g/ml}$	25	24
	0.04 $\mu\text{g/ml}$	12	17
	0.05 $\mu\text{g/ml}$	11	23

Cuadro 8.34: Viabilidad de los fenotipos $\Delta leuB$ & $\Delta pheA$ posterior al tratamiento en medio mínimo con ciprofloxacino.

8.6 MS Capítulo 6: Susceptibilidad a antibióticos en un sistema con bienes públicos

8.6.1 Densidad óptica y porcentaje de inhibición a las 17 horas

Concentración ampicilina	$\Delta tyrA$ Susceptible		Δtyr -pBGT	
	OD ₆₃₀	% Inhibición	OD ₆₃₀	% Inhibición
0 $\mu\text{g/ml}$	0.110	0	0.114	0
6 $\mu\text{g/ml}$	0.093	15.34	0.386	-237.855
15 $\mu\text{g/ml}$	0.088	19.86	0.381	-233.47
36 $\mu\text{g/ml}$	0.085	23.25	0.378	-230.85
89 $\mu\text{g/ml}$	0.087	21.21	0.368	-222.75
220 $\mu\text{g/ml}$	0.090	18.28	0.365	-219.91
540 $\mu\text{g/ml}$	0.084	23.70	0.369	-222.97
1326 $\mu\text{g/ml}$	0.084	24.15	0.335	-193.65
3257 $\mu\text{g/ml}$	0.082	25.73	0.391	-242.23
8000 $\mu\text{g/ml}$	0.083	24.60	0.378	-230.85

Cuadro 8.35: Densidad óptica y porcentaje de inhibición a las 17 horas de crecimiento de las cepas $\Delta tyrA$ y $\Delta tyrA$ -pBGT en medio LB con ampicilina.

Concentración ampicilina	$\Delta pheA$ Susceptible		$\Delta pheA$ -pBGT	
	OD ₆₃₀	% Inhibición	OD ₆₃₀	% Inhibición
0 $\mu\text{g/ml}$	0.643	0	0.564	-2.22045E-14
6 $\mu\text{g/ml}$	0.110	82.78	0.564	-2.22045E-14
15 $\mu\text{g/ml}$	0.096	85.03	0.569	-0.84
36 $\mu\text{g/ml}$	0.092	85.65	0.560	0.79
89 $\mu\text{g/ml}$	0.090	85.93	0.562	0.48
220 $\mu\text{g/ml}$	0.096	84.99	0.552	2.12
540 $\mu\text{g/ml}$	0.094	85.38	0.549	2.78
1326 $\mu\text{g/ml}$	0.089	86.04	0.553	1.99
3257 $\mu\text{g/ml}$	0.087	86.39	0.554	1.85
8000 $\mu\text{g/ml}$	0.086	86.55	0.517	8.41

Cuadro 8.36: Densidad óptica y porcentaje de inhibición a las 17 horas de crecimiento de las cepas $\Delta pheA$ y $\Delta pheA$ -pBGT en medio LB con ampicilina.

MS Capítulo 6: Susceptibilidad a antibióticos en un sistema con bienes públicos

Concentración ampicilina	$\Delta leuB$ Susceptible		$\Delta leuB$ -pBGT	
	OD ₆₃₀	% Inhibición	OD ₆₃₀	% Inhibición
0 $\mu\text{g/ml}$	0.611	-2.22045E-14	0.549	0
6 $\mu\text{g/ml}$	0.172	71.82	0.593	-8.10
15 $\mu\text{g/ml}$	0.150	75.33	0.596	-8.64
36 $\mu\text{g/ml}$	0.144	76.31	0.589	-7.32
89 $\mu\text{g/ml}$	0.152	75.01	0.587	-6.96
220 $\mu\text{g/ml}$	0.141	76.89	0.590	-7.46
540 $\mu\text{g/ml}$	0.114	81.30	0.586	-6.69
1326 $\mu\text{g/ml}$	0.096	84.17	0.571	-4.05
3257 $\mu\text{g/ml}$	0.107	82.49	0.496	9.55
8000 $\mu\text{g/ml}$	0.098	83.92	0.444	19.16

Cuadro 8.37: Densidad óptica y porcentaje de inhibición a las 17 horas de crecimiento de las cepas $\Delta leuB$ y $\Delta leuB$ -pBGT en medio LB con ampicilina.

Concentración ampicilina	$\Delta ilvA$ Susceptible		$\Delta ilvA$ -pBGT	
	OD ₆₃₀	% Inhibición	OD ₆₃₀	% Inhibición
0 $\mu\text{g/ml}$	0.515	0	0.602	0
6 $\mu\text{g/ml}$	0.125	75.67	0.599	0.45
15 $\mu\text{g/ml}$	0.141	72.57	0.594	1.32
36 $\mu\text{g/ml}$	0.141	72.52	0.596	1.03
89 $\mu\text{g/ml}$	0.110	78.49	0.597	0.87
220 $\mu\text{g/ml}$	0.09	82.52	0.597	0.91
540 $\mu\text{g/ml}$	0.092	82.08	0.599	0.58
1326 $\mu\text{g/ml}$	0.093	81.94	0.585	2.82
3257 $\mu\text{g/ml}$	0.088	82.86	0.433	28.00
8000 $\mu\text{g/ml}$	0.090	82.37	0.460	23.52

Cuadro 8.38: Densidad óptica y porcentaje de inhibición a las 17 horas de crecimiento de las cepas $\Delta ilvA$ y $\Delta ilvA$ -pBGT en medio LB con ampicilina.

MS Capítulo 6: Susceptibilidad a antibióticos en un sistema con bienes públicos

8.6.2 Conteo de colonias cultivo mixto con ampicilina.

Medio	Concentración Ampicilina	Hora de Muestreo	$\Delta tyrA$ Resistentes	$\Delta tyrA$ Susceptibles	$\Delta ilvA$ Resistentes	$\Delta ilvA$ Susceptibles	Total de colonias		
Medio Mínimo sin aminoácidos	No ampicilina	2 hrs	2	11	4	13	30		
		4 hrs	7	19	3	8	37		
		6 hrs	6	11	0	7	24		
		8 hrs	7	11	5	6	29		
		10 hrs	10	13	4	13	40		
		12 hrs	0	1	0	4	5		
		24 hrs	6	16	2	4	28		
		2 hrs	6	18	7	15	46		
	Baja ampicilina	4 hrs	2	4	1	3	10		
		6 hrs	17	67	16	53	153		
		8 hrs	8	18	7	18	51		
		10 hrs	3	6	3	15	27		
		12 hrs	0	1	0	4	5		
		24 hrs	10	44	10	5	69		
		2 hrs	1	1	1	0	3		
		4 hrs	1	3	1	2	7		
	Alta ampicilina	6 hrs	6	3	2	2	13		
		8 hrs	2	3	3	2	10		
		10 hrs	4	0	2	0	6		
		12 hrs	2	0	2	1	5		
		24 hrs	7	16	3	5	31		
		Medio Mínimo Baja Concentración Aminoácidos	No ampicilina	2 hrs	5	9	8	9	31
				4 hrs	16	52	13	25	106
				6 hrs	0	2	4	11	17
8 hrs	3			14	11	30	58		
10 hrs	5			10	5	4	24		
12 hrs	1			2	2	1	6		
24 hrs	291			177	252	275	995		
2 hrs	2			2	2	10	16		
Baja ampicilina	4 hrs		8	17	6	11	42		
	6 hrs		6	21	12	23	62		
	8 hrs		24	36	24	36	120		
	10 hrs		2	0	4	3	9		
	12 hrs		9	9	0	1	19		
	24 hrs		153	95	173	95	516		
	2 hrs		5	5	10	1	21		
	4 hrs		4	4	8	0	16		
Alta ampicilina	6 hrs		14	3	2	1	20		
	8 hrs		12	0	10	0	22		
	10 hrs		11	0	7	0	18		
	12 hrs		3	2	4	0	9		
	24 hrs		117	55	127	76	375		

Cuadro 8.39: Parte 1: Colonias recuperadas del cultivo mixto $\Delta tyrA$ - $\Delta ilvA$ con fenotipos resistentes y susceptibles en medio mínimo sin aminoácidos y con baja concentración de aminoácidos y ampicilina, se utilizó medio selectivo para diferenciar entre fenotipos auxótrofos.

MS Capítulo 6: Susceptibilidad a antibióticos en un sistema con bienes públicos

Medio	Concentración Ampicilina	Hora de Muestreo	$\Delta tyrA$ Resistentes	$\Delta tyrA$ Susceptibles	$\Delta ilvA$ Resistentes	$\Delta ilvA$ Susceptibles	Total de colinas	
Medio Mínimo Alta Concentración Aminoácidos	No ampicilina	2 hrs	9	20	9	12	50	
		4 hrs	13	14	8	10	45	
		6 hrs	16	27	12	21	76	
		8 hrs	9	21	5	27	62	
		10 hrs	1	4	1	0	6	
		12 hrs	45	84	8	20	157	
	24 hrs	324	166	368	286	1144		
	2 hrs	82	85	91	46	304		
	4 hrs	31	0	31	6	68		
	6 hrs	6	15	40	0	61		
	Baja ampicilina	8 hrs	13	4	5	9	31	
		10 hrs	7	2	6	6	21	
		12 hrs	22	42	4	5	73	
		24 hrs	16	21	81	124	242	
		2 hrs	4	13	10	5	32	
		4 hrs	1	0	12	19	32	
	Alta ampicilina	6 hrs	1	83	16	0	100	
		8 hrs	60	0	17	1	78	
		10 hrs	10	0	16	0	26	
		12 hrs	60	0	4	1	65	
		24 hrs	97	0	38	23	158	
		Medio Rico LB	No ampicilina	2 hrs	0	4	1	2
	4 hrs			9	93	12	93	207
	6 hrs			9	111	16	150	286
8 hrs	101			361	78	405	945	
10 hrs	58			298	44	456	856	
2 hrs	80			275	3	30	388	
24 hrs	138		688	79	511	1416		
2 hrs	5		24	6	6	41		
4 hrs	37		107	68	53	265		
6 hrs	69		188	19	109	385		
Baja ampicilina	8 hrs		63	242	50	221	576	
	10 hrs		32	119	56	127	334	
	12 hrs		146	280	2	11	439	
	24 hrs		120	669	27	149	965	
	2 hrs		0	0	0	0	0	
	4 hrs		0	0	6	0	6	
Alta ampicilina	6 hrs		4	14	12	1	31	
	8 hrs		18	5	9	1	33	
	10 hrs		15	0	8	0	23	
	12 hrs		19	0	4	0	23	
	24 hrs		84	0	90	0	174	

Cuadro 8.40: Parte 2: Colonias recuperadas del cultivo mixto $\Delta tyrA$ - $\Delta ilvA$ con fenotipos resistentes y susceptibles en medio mínimo con alta concentración de aminoácidos, medio rico LB y ampicilina, se utilizó medio selectivo para diferenciar entre fenotipos auxótrofos.

Referencias

- Elizabeth M Adamowicz, Jeffrey Flynn, Ryan C Hunter, and William R Harcombe. Cross-feeding modulates antibiotic tolerance in bacterial communities. *The ISME journal*, 12(11):2723–2735, 2018. [5](#), [22](#), [37](#), [64](#)
- Michaeline BN Albright and Jennifer BH Martiny. Dispersal alters bacterial diversity and composition in a natural community. *The ISME journal*, 12(1):296–299, 2018. [4](#)
- Kapil Amarnath, Avaneesh V Narla, Sammy Pontrelli, Jiajia Dong, Tolga Caglar, Brian R Taylor, Julia Schwartzman, Uwe Sauer, Otto X Cordero, and Terence Hwa. Stress-induced cross-feeding of internal metabolites provides a dynamic mechanism of microbial cooperation. *bioRxiv*, 2021. [3](#), [22](#)
- Tomoya Baba, Takeshi Ara, Miki Hasegawa, Yuki Takai, Yoshiko Okumura, Miki Baba, Kirill A Datsenko, Masaru Tomita, Barry L Wanner, and Hirotada Mori. Construction of escherichia coli k-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the keio collection. *Molecular systems biology*, 2(1), 2006. [8](#), [78](#), [86](#)
- Rohan Balakrishnan, Roshali T de Silva, Terence Hwa, and Jonas Cremer. Suboptimal resource allocation in changing environments constrains response and growth in bacteria. *Molecular systems biology*, 17(12):e10597, 2021. [23](#)
- Markus Basan, Sheng Hui, Hiroyuki Okano, Zhongge Zhang, Yang Shen, James R Williamson, and Terence Hwa. Overflow metabolism in escherichia coli results from efficient proteome allocation. *Nature*, 528(7580):99–104, 2015. [24](#)
- Thomas Bell, Jonathan A Newman, Bernard W Silverman, Sarah L Turner, and Andrew K Lilley. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature*, 436(7054):1157–1160, 2005. [1](#)
- Michael J Bottery, Jonathan W Pitchford, and Ville-Petri Friman. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. *The ISME Journal*, 15(4):939–948, 2021. [5](#)
- Michael J Bottery, Jessica L Matthews, A Jamie Wood, Helle Krogh Johansen, Jon W Pitchford, and Ville-Petri Friman. Inter-species interactions alter antibiotic efficacy in bacterial communities. *The ISME journal*, 16(3):812–821, 2022. [5](#)
- Matteo Cavaliere, Song Feng, Orkun S Soyer, and José I Jiménez. Cooperation in microbial communities and their biotechnological applications. *Environmental microbiology*, 19(8):2949–2963, 2017. [3](#), [33](#), [64](#)
- Jeremy M Chacón and William R Harcombe. Antimicrobials: constraints on microbial warfare. *Nature Microbiology*, 1(12):1–2, 2016. [5](#)
- Andrew Chen, Alvaro Sanchez, Lei Dai, and Jeff Gore. Dynamics of a producer-free-loader ecosystem on the brink of collapse. *Nature communications*, 5(1):1–6, 2014. [7](#)
- Mariusz Cycoń, Agnieszka Mrozik, and Zofia Piotrowska-Seget. Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Frontiers in microbiology*, 10:338, 2019. [37](#)
- Martina Dal Bello, Hyunseok Lee, Akshit Goyal, and Jeff Gore. Resource-diversity relationships in bacterial communities reflect the network structure of microbial me-

Referencias

- tabolism. *bioRxiv*, pages 2020–09, 2021a. [1](#)
- Martina Dal Bello, Hyunseok Lee, Akshit Goyal, and Jeff Gore. Resource-diversity relationships in bacterial communities reflect the network structure of microbial metabolism. *Nature Ecology Evolution*, 2021b. URL <https://www.nature.com/articles/s41559-021-01535-8>. [2](#)
- Alma Dal Co, Martin Ackermann, and Simon Van Vliet. Metabolic activity affects the response of single cells to a nutrient switch in structured populations. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(156):20190182, 2019. [1](#)
- Patrick P Dennis and Hans Bremer. Differential rate of ribosomal protein synthesis in escherichia coli b/r. *Journal of molecular biology*, 84(3):407–422, 1974. [27](#)
- Glen D’Souza, Shraddha Shitut, Daniel Preussger, Ghada Yousif, Silvio Waschina, and Christian Kost. Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Natural Product Reports*, 35(5):455–488, 2018. [22](#)
- Tim N Enke, Gabriel E Leventhal, Matthew Metzger, José T Saavedra, and Otto X Cordero. Microscale ecology regulates particulate organic matter turnover in model marine microbial communities. *Nature communications*, 9(1):1–8, 2018. [22](#)
- Sylvie Estrela and Sam P Brown. Community interactions and spatial structure shape selection on antibiotic resistant lineages. *PLoS computational biology*, 14(6): e1006179, 2018. [5](#)
- Sylvie Estrela, Juan Diaz-Colunga, Jean CC Vila, Alicia Sanchez-Gorostiaga, and Alvaro Sanchez. Diversity begets diversity under microbial niche construction. *bioRxiv*, 2022a. [2](#)
- Sylvie Estrela, Jean CC Vila, Nanxi Lu, Djordje Bajić, Maria Rebolleda-Gómez, Chang-Yu Chang, Joshua E Goldford, Alicia Sanchez-Gorostiaga, and Álvaro Sánchez. Functional attractors in microbial community assembly. *Cell Systems*, 13(1):29–42, 2022b. [2](#)
- Shiri Freilich, Raphy Zarecki, Omer Eilam, Ella Shtifman Segal, Christopher S Henry, Martin Kupiec, Uri Gophna, Roded Sharan, and Eytan Ruppín. Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nature communications*, 2(1):1–7, 2011. [22](#)
- Jonathan Friedman, Logan M Higgins, and Jeff Gore. Community structure follows simple assembly rules in microbial microcosms. *Nature ecology & evolution*, 1(5): 1–7, 2017. [2](#), [7](#)
- Ryan K Fritts, Jordan T Bird, Megan G Behringer, Anna Lipzen, Joel Martin, Michael Lynch, and James B McKinlay. Enhanced nutrient uptake is sufficient to drive emergent cross-feeding between bacteria in a synthetic community. *The ISME journal*, 14(11):2816–2828, 2020. [2](#), [7](#), [22](#)
- Isabel Frost, William PJ Smith, Sara Mitri, Alvaro San Millan, Yohan Davit, James M Osborne, Joe M Pitt-Francis, R Craig MacLean, and Kevin R Foster. Cooperation, competition and antibiotic resistance in bacterial colonies. *The ISME journal*, 12(6): 1582–1593, 2018. [5](#), [75](#)
- Ylaine Gerardin, Michael Springer, and Roy Kishony. A competitive trade-off limits the selective advantage of increased antibiotic production. *Nature microbiology*, 1(12):1–7, 2016. [5](#)
- Sebastian Germerodt, Katrin Bohl, Anja Lück, Samay Pande, Anja Schröter, Christoph

Referencias

- Kaleta, Stefan Schuster, and Christian Kost. Pervasive selection for cooperative cross-feeding in bacterial communities. *PLoS computational biology*, 12(6):e1004986, 2016. [2](#), [22](#)
- Jack A Gilbert, Joshua A Steele, J Gregory Caporaso, Lars Steinbrück, Jens Reeder, Ben Temperton, Susan Huse, Alice C McHardy, Rob Knight, Ian Joint, et al. Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME journal*, 6(2):298–308, 2012. [22](#)
- Ee-Been Goh, Grace Yim, Wayne Tsui, JoAnn McClure, Michael G Surette, and Julian Davies. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26):17025–17030, 2002. [50](#)
- Joshua E Goldford, Nanxi Lu, Djordje Bajić, Sylvie Estrela, Mikhail Tikhonov, Alicia Sanchez-Gorostiaga, Daniel Segrè, Pankaj Mehta, and Alvaro Sanchez. Emergent simplicity in microbial community assembly. *Science*, 361(6401):469–474, 2018. [1](#)
- Felix Goldschmidt, Roland R Regoes, and David R Johnson. Metabolite toxicity slows local diversity loss during expansion of a microbial cross-feeding community. *The ISME journal*, 12(1):136–144, 2018. [2](#), [7](#)
- Philip Greulich, Matthew Scott, Martin R Evans, and Rosalind J Allen. Growth-dependent bacterial susceptibility to ribosome-targeting antibiotics. *Molecular systems biology*, 11(3):796, 2015. [24](#), [50](#)
- Philip Greulich, Jakub Doležal, Matthew Scott, Martin R Evans, and Rosalind J Allen. Predicting the dynamics of bacterial growth inhibition by ribosome-targeting antibiotics. *Physical biology*, 14(6):065005, 2017. [24](#), [50](#)
- Jacopo Grilli. Macroecological laws describe variation and diversity in microbial communities. *Nature communications*, 11(1):1–11, 2020. [2](#), [33](#)
- Sarah P Hammarlund, Jeremy M Chacón, and William R Harcombe. A shared limiting resource leads to competitive exclusion in a cross-feeding system. *Environmental microbiology*, 21(2):759–771, 2019. [3](#), [22](#), [23](#), [33](#)
- William R Harcombe, William J Riehl, Ilija Dukovski, Brian R Granger, Alex Betts, Alex H Lang, Gracia Bonilla, Amrita Kar, Nicholas Leiby, Pankaj Mehta, et al. Metabolic resource allocation in individual microbes determines ecosystem interactions and spatial dynamics. *Cell reports*, 7(4):1104–1115, 2014. [22](#), [23](#)
- RJ Harvey and AL Koch. How partially inhibitory concentrations of chloramphenicol affect the growth of escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 18(2):323–337, 1980. [39](#), [50](#)
- Vasili Hauryliuk, Gemma C Atkinson, Katsuhiko S Murakami, Tanel Tenson, and Kenn Gerdes. Recent functional insights into the role of (p) ppgpp in bacterial physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5):298–309, 2015. [23](#), [25](#)
- Cristina M Herren. Disruption of cross-feeding interactions by invading taxa can cause invasional meltdown in microbial communities. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1927):20192945, 2020. [3](#), [22](#)
- Elze Hesse, Siobhan O’Brien, Adela M Luján, Florian Bayer, Eleanor M van Veen, Dave J Hodgson, and Angus Buckling. Interspecific social interactions shape public goods production in natural microbial communities. *BioRxiv*, page 710715, 2019. [22](#)
- Tim A Hoek, Kevin Axelrod, Tommaso Biancalani, Eugene A Yurtsev, Jinghui Liu, and

Referencias

- Jeff Gore. Resource availability modulates the cooperative and competitive nature of a microbial cross-feeding mutualism. *PLoS biology*, 14(8):e1002540, 2016. [1](#), [2](#), [7](#), [23](#), [33](#)
- Nathan I Johns, Tomasz Blazejewski, Antonio LC Gomes, and Harris H Wang. Principles for designing synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 31:146–153, 2016. [2](#)
- Christoph Kaleta, Sascha Schäuble, Ursula Rinas, and Stefan Schuster. Metabolic costs of amino acid and protein production in escherichia coli. *Biotechnology journal*, 8(9):1105–1114, 2013. [16](#), [29](#), [30](#)
- Zachary A King, Justin Lu, Andreas Dräger, Philip Miller, Stephen Federowicz, Joshua A Lerman, Ali Ebrahim, Bernhard O Palsson, and Nathan E Lewis. Bigg models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models. *Nucleic acids research*, 44(D1):D515–D522, 2016. [79](#), [87](#)
- Chen Liao, Andrew E Blanchard, and Ting Lu. An integrative circuit–host modelling framework for predicting synthetic gene network behaviours. *Nature microbiology*, 2(12):1658–1666, 2017. [23](#), [24](#), [26](#)
- Stilianos Louca, Martin F Polz, Florent Mazel, Michaeline BN Albright, Julie A Huber, Mary I O’Connor, Martin Ackermann, Aria S Hahn, Diane S Srivastava, Sean A Crowe, et al. Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature ecology & evolution*, 2(6):936–943, 2018. [1](#), [4](#)
- Robert MacArthur. Species packing and competitive equilibrium for many species. *Theoretical population biology*, 1(1):1–11, 1970. [24](#)
- R Craig MacLean, Ayari Fuentes-Hernandez, Duncan Greig, Laurence D Hurst, and Ivana Gudelj. A mixture of “cheats” and “co-operators” can enable maximal group benefit. *PLoS biology*, 8(9):e1000486, 2010. [22](#)
- Naïma Madi, Michiel Vos, Carmen Lia Murall, Pierre Legendre, and B Jesse Shapiro. Does diversity beget diversity in microbiomes? *Elife*, 9:e58999, 2020. [3](#)
- Lisa U Magnusson, Anne Farewell, and Thomas Nyström. ppgpp: a global regulator in escherichia coli. *Trends in microbiology*, 13(5):236–242, 2005. [25](#)
- Arijit Maitra and Ken A Dill. Modeling the overproduction of ribosomes when antibacterial drugs act on cells. *Biophysical journal*, 110(3):743–748, 2016. [24](#)
- Michael T Mee, James J Collins, George M Church, and Harris H Wang. Syntrophic exchange in synthetic microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(20):E2149–E2156, 2014. [4](#), [23](#)
- Hannah R Meredith, Jaydeep K Srimani, Anna J Lee, Allison J Lopatkin, and Lingchong You. Collective antibiotic tolerance: mechanisms, dynamics and intervention. *Nature chemical biology*, 11(3):182–188, 2015. [5](#), [50](#)
- Hilary Monaco, Tiago Sereno, Kevin Liu, Caleb Reagor, Maxime Deforet, and Joao B Xavier. Spatial-temporal dynamics of a microbial cooperative behavior robust to cheating. *BioRxiv*, 2020. [23](#)
- Simon J Moore, Hung-En Lai, Richard JR Kelwick, Soo Mei Chee, David J Bell, Karen Marie Polizzi, and Paul S Freemont. Ecoflex: a multifunctional moclo kit for e. coli synthetic biology. *ACS synthetic biology*, 5(10):1059–1069, 2016. [78](#), [86](#)
- Lori Niehaus, Ian Boland, Minghao Liu, Kevin Chen, David Fu, Catherine Henckel, Kaitlin Chaung, Suyen Espinoza Miranda, Samantha Dyckman, Matthew Crum,

Referencias

- et al. Microbial coexistence through chemical-mediated interactions. *Nature communications*, 10(1):1–12, 2019. [2](#), [3](#), [22](#), [64](#)
- Leonardo Oña and Christian Kost. Cooperation increases robustness to ecological disturbance in microbial cross-feeding networks. *bioRxiv*, 2020. [3](#)
- Leonardo Pacciani-Mori, Andrea Giometto, Samir Suweis, and Amos Maritan. Dynamic metabolic adaptation can promote species coexistence in competitive microbial communities. *PLoS computational biology*, 16(5):e1007896, 2020. [24](#)
- Leonardo Pacciani-Mori, Samir Suweis, Amos Maritan, and Andrea Giometto. Constrained proteome allocation affects coexistence in models of competitive microbial communities. *The ISME journal*, 15(5):1458–1477, 2021. [23](#), [26](#)
- Alan R Pacheco, Mauricio Moel, and Daniel Segrè. Costless metabolic secretions as drivers of interspecies interactions in microbial ecosystems. *Nature communications*, 10(1):1–12, 2019. [7](#)
- Anggia Prasetyoputri, Angie M Jarrad, Matthew A Cooper, and Mark AT Blaskovich. The eagle effect and antibiotic-induced persistence: two sides of the same coin? *Trends in microbiology*, 27(4):339–354, 2019. [37](#)
- STEVEN C Quay, THOMAS E Dick, and DALE L Oxender. Role of transport systems in amino acid metabolism: leucine toxicity and the branched-chain amino acid transport systems. *Journal of Bacteriology*, 129(3):1257–1265, 1977. [16](#), [33](#)
- Christoph Ratzke, Julien Barrere, and Jeff Gore. Strength of species interactions determines biodiversity and stability in microbial communities. *Nature ecology & evolution*, 4(3):376–383, 2020. [22](#), [23](#)
- Joseph Rauch, Jane Kondev, and Alvaro Sanchez. Cooperators trade off ecological resilience and evolutionary stability in public goods games. *Journal of The Royal Society Interface*, 14(127):20160967, 2017. [3](#)
- D Reyes-González, H De Luna-Valenciano, J Utrilla, M Sieber, R Peña-Miller, and A Fuentes-Hernández. Dynamic proteome allocation regulates the profile of interaction of auxotrophic bacterial consortia. *Royal Society Open Science*, 9(5):212008, 2022. [10](#), [11](#), [23](#)
- Alejandra Rodríguez-Verdugo, Clément Vulin, and Martin Ackermann. The rate of environmental fluctuations shapes ecological dynamics in a two-species microbial system. *Ecology letters*, 22(5):838–846, 2019. [2](#)
- Alvaro San Millan, Jose Antonio Escudero, Danna R Gifford, Didier Mazel, and R Craig MacLean. Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria. *Nature ecology & evolution*, 1(1):1–8, 2016. [82](#), [86](#)
- Alicia Sanchez-Gorostiaga, Djordje Bajić, Melisa L Osborne, Juan F Poyatos, and Alvaro Sanchez. High-order interactions distort the functional landscape of microbial consortia. *PLoS Biology*, 17(12):e3000550, 2019. [1](#), [2](#)
- Patricia Sanchez-Vazquez, Colin N Dewey, Nicole Kitten, Wilma Ross, and Richard L Gourse. Genome-wide effects on escherichia coli transcription from ppgpp binding to its two sites on rna polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(17):8310–8319, 2019. [23](#)
- Whitman B Schofield, Maria Zimmermann-Kogadeeva, Michael Zimmermann, Natasha A Barry, and Andrew L Goodman. The stringent response determines the ability of a commensal bacterium to survive starvation and to persist in the gut.

Referencias

- Cell host & microbe*, 24(1):120–132, 2018. [23](#)
- Matthew Scott, Carl W Gunderson, Eduard M Mateescu, Zhongge Zhang, and Terence Hwa. Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. *Science*, 330(6007):1099–1102, 2010. [23](#), [24](#), [37](#), [39](#), [63](#)
- Matthew Scott, Stefan Klumpp, Eduard M Mateescu, and Terence Hwa. Emergence of robust growth laws from optimal regulation of ribosome synthesis. *Molecular systems biology*, 10(8):747, 2014. [24](#)
- William R Shoemaker, Evgeniya Polezhaeva, Kenzie B Givens, and Jay T Lennon. Molecular evolutionary dynamics of energy limited microorganisms. *Molecular biology and evolution*, 38(10):4532–4545, 2021. [33](#)
- Wenyng Shou, Sri Ram, and Jose MG Vilar. Synthetic cooperation in engineered yeast populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6):1877–1882, 2007. [22](#), [23](#)
- Wieland Steinchen, Victor Zegarra, and Gert Bange. (p) ppgpp: magic modulators of bacterial physiology and metabolism. *Frontiers in Microbiology*, 11:2072, 2020. [23](#)
- Peter S Swain, Keiran Stevenson, Allen Leary, Luis F Montano-Gutierrez, Ivan BN Clark, Jackie Vogel, and Teuta Pilizota. Inferring time derivatives including cell growth rates using gaussian processes. *Nature communications*, 7(1):1–8, 2016. [55](#), [81](#)
- Linda S Thomashow. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. *Manual of environmental microbiology*, 2002. [4](#), [37](#)
- Matthew F Traxler, Sean M Summers, Huyen-Tran Nguyen, Vineetha M Zacharia, G Aaron Hightower, Joel T Smith, and Tyrrell Conway. The global, ppgpp-mediated stringent response to amino acid starvation in escherichia coli. *Molecular microbiology*, 68(5):1128–1148, 2008. [23](#), [25](#)
- Paul E Turner, Valeria Souza, and Richard E Lenski. Tests of ecological mechanisms promoting the stable coexistence of two bacterial genotypes. *Ecology*, 77(7):2119–2129, 1996. [22](#)
- Nicole M Vega and Jeff Gore. Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Current opinion in microbiology*, 21:28–34, 2014. [5](#), [50](#)
- Edwin H Wintermute and Pamela A Silver. Emergent cooperation in microbial metabolism. *Molecular systems biology*, 6(1):407, 2010. [22](#)
- Chenhao Wu, Rohan Balakrishnan, Matteo Mori, Gabriel Manzanarez, Zhongge Zhang, and Terence Hwa. Cellular perception of growth rate and the mechanistic origin of bacterial growth laws. *bioRxiv*, 2021. [23](#)
- Hua Xiao, Miklos Kalman, Kenji Ikehara, Sharon Zemel, Gad Glaser, and Michael Cashel. Residual guanosine 3', 5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by spot null mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 266(9):5980–5990, 1991. [23](#)
- Eugene Anatoly Yurtsev, Arolyn Conwill, and Jeff Gore. Oscillatory dynamics in a bacterial cross-protection mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(22):6236–6241, 2016. [2](#)
- Aleksej Zelezniak, Steven Sheridan, and Kiran Raosaheb Patil. Contribution of network connectivity in determining the relationship between gene expression and metabolite concentration changes. *PLoS computational biology*, 10(4):e1003572, 2014. [23](#)

Referencias

- Karsten Zengler and Livia S Zaramela. The social network of microorganisms—how auxotrophies shape complex communities. *Nature Reviews Microbiology*, 16(6):383–390, 2018. [1](#), [8](#)
- Marika Ziesack, Travis Gibson, John KW Oliver, Andrew M Shumaker, Bryan B Hsu, David T Riglar, Tobias W Giessen, Nicholas V DiBenedetto, Lynn Bry, Jeffrey C Way, et al. Engineered interspecies amino acid cross-feeding increases population evenness in a synthetic bacterial consortium. *Msystems*, 4(4):e00352–19, 2019. [22](#)

Research



Cite this article: Reyes-González D, De Luna-Valenciano H, Utrilla J, Sieber M, Peña-Miller R, Fuentes-Hernández A. 2022 Dynamic proteome allocation regulates the profile of interaction of auxotrophic bacterial consortia. *R. Soc. Open Sci.* **9**: 212008.
<https://doi.org/10.1098/rsos.212008>

Received: 11 January 2022

Accepted: 25 March 2022

Subject Category:

Genetics and genomics

Subject Areas:

synthetic biology/systems biology/computational biology

Keywords:

microbial communities, mathematical modelling, experimental microbiology

Author for correspondence:

A. Fuentes-Hernández

e-mail: ayarifh@ccg.unam.mx

Dynamic proteome allocation regulates the profile of interaction of auxotrophic bacterial consortia

D. Reyes-González¹, H. De Luna-Valenciano^{1,2},
J. Utrilla¹, M. Sieber³, R. Peña-Miller² and
A. Fuentes-Hernández¹

¹Synthetic Biology Program, Center for Genomic Sciences, Universidad Autónoma de México, 62220 Cuernavaca, Mexico

²Systems Biology Program, Center for Genomic Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210 Cuernavaca, Mexico

³Max Planck Institute for Evolutionary Biology, 24306 Plön, Germany

JU, 0000-0003-3048-9241; MS, 0000-0003-2703-3665;
AF-H, 0000-0002-8157-342X

Microbial ecosystems are composed of multiple species in constant metabolic exchange. A pervasive interaction in microbial communities is metabolic cross-feeding and occurs when the metabolic burden of producing costly metabolites is distributed between community members, in some cases for the benefit of all interacting partners. In particular, amino acid auxotrophies generate obligate metabolic inter-dependencies in mixed populations and have been shown to produce a dynamic profile of interaction that depends upon nutrient availability. However, identifying the key components that determine the pair-wise interaction profile remains a challenging problem, partly because metabolic exchange has consequences on multiple levels, from allocating proteomic resources at a cellular level to modulating the structure, function and stability of microbial communities. To evaluate how ppGpp-mediated resource allocation drives the population-level profile of interaction, here we postulate a multi-scale mathematical model that incorporates dynamics of proteome partition into a population dynamics model. We compare our computational results with experimental data obtained from co-cultures of auxotrophic *Escherichia coli* K12 strains under a range of amino acid concentrations and population structures. We conclude by arguing that the stringent response promotes cooperation by inhibiting the growth of fast-growing strains and promoting the synthesis of metabolites essential for other community members.

1. Introduction

Bacterial cells rarely live in isolation, but coexist in communities composed of a genetically diverse assembly of different individuals, with interactions mediated by the exchange of small molecules. Genetically diverse populations tend to exhibit increased resilience to invasion [1] and to environmental perturbations [2–4], as well as to enable the implementation of division of labour strategies [5–8]. In particular, cross-feeding interactions can increase the diversity of the community and lead to metabolic cooperation [9,10] by changing the population's dynamics and composition [1,11]. If the consumption of a metabolite benefits one of the interacting partners and is detrimental for the other, it is referred to as parasitism [12], while if it also benefits the metabolite-producing population, then the community is said to be *mutualistic* [13,14].

Crucially, metabolic exchange mediated by the environment is not always associated with a benefit for the community [15,16]. Moreover, metabolic interactions are not static but condition specific [17–20], resulting from metabolic shifts [21] and trade-offs between different microbial growth traits [22]. Previous studies have shown that in high-nutrient environments, diversity is reduced and interactions tend to be antagonistic [2,16,23], thus increasing susceptibility to invasion by defectors [24,25]. By contrast, nutrient obligate cross-feeding interactions have been shown to become more cooperative in low-nutrient environments, both in natural communities [26] and in synthetic systems [2,18,27–29].

But a key cellular process occurs under amino acid starvation. In environments where nutrients are scarce, cells regulate their global metabolism to shut down growth and increase the synthesis of limiting metabolites [30,31]. This dynamic partition of the proteome is mediated by two small nucleotides collectively referred to as ppGpp. This alarmone is known to modify the expression of hundreds of genes [32,33], including those responsible for the synthesis of the translation machinery [34]. Indeed, altering the normal levels of ppGpp was shown to produce several growth impairments and lethal phenotypes [35]. On the other hand, ppGpp regulation enables a dynamic proteome allocation that can be used to tune the concentration of ribosomes to maximize growth [36] and increase adaptation to fluctuating environments [37]. Furthermore, the stringent response is also known to increase survival to nutrient starvation [38,39], by allocating a large fraction of the proteome towards metabolite production at the expense of ribosomal synthesis [38,40–42].

The objective of this paper is to evaluate how dynamic proteome allocation in response to nutrient limitation impacts the population dynamics of a syntropic community. The paper is structured as follows. First, we will postulate a dynamic proteome partition model that provides estimates on growth and amino acid production rates, which are then used by a population dynamics model to evaluate how different environmental conditions result in different interaction profiles at a population level. We validate our theoretical predictions with an experimental model system consisting of different mutants of *Escherichia coli* K12 growing under a range of amino acid concentrations. This library of strains contains deletions in genes encoding for the production of essential amino acids, thus producing a syntropic interaction when grown in co-culture. Finally, we use the multi-scale model to evaluate computationally how ppGpp produces a dynamic proteome allocation that can drive the diversity and productivity of a syntropic community.

2. Modelling bacterial growth under resource limitation

The development of genomic and bioinformatic tools has enabled researchers to comprehensively quantify the interaction between genes, proteins, reactions and metabolites, thus providing information that can be used to postulate and analyse genome-scale models [43]. These models aim to predict bacterial phenotypes by assuming an internal quasi-steady-state equilibrium and optimizing fluxes from the stoichiometry of every known metabolic reaction occurring within the cell. Multiple extensions have been proposed to evaluate how fluxes are exchanged between individuals, and from an individual to multiple interacting species [21,44–49]. By incorporating diffusion of cells and molecules in space and time, computational models based on dynamic flux balance analysis can be extended to include multiple bacterial types interacting through the environment [46,50].

The aim of the mathematical model postulated in this paper is to predict the population dynamics that emerge from the metabolic exchange between individuals in the community. This problem spans multiple levels of complexity: from metabolic regulation occurring at a cellular level in response to environmental perturbations (e.g. changes in biotic and abiotic conditions) to ecological constraints resulting from the interaction between cells and their local environment (e.g. uptake or secretion of nutrients). A wide range of mathematical modelling approaches have been used to study metabolic

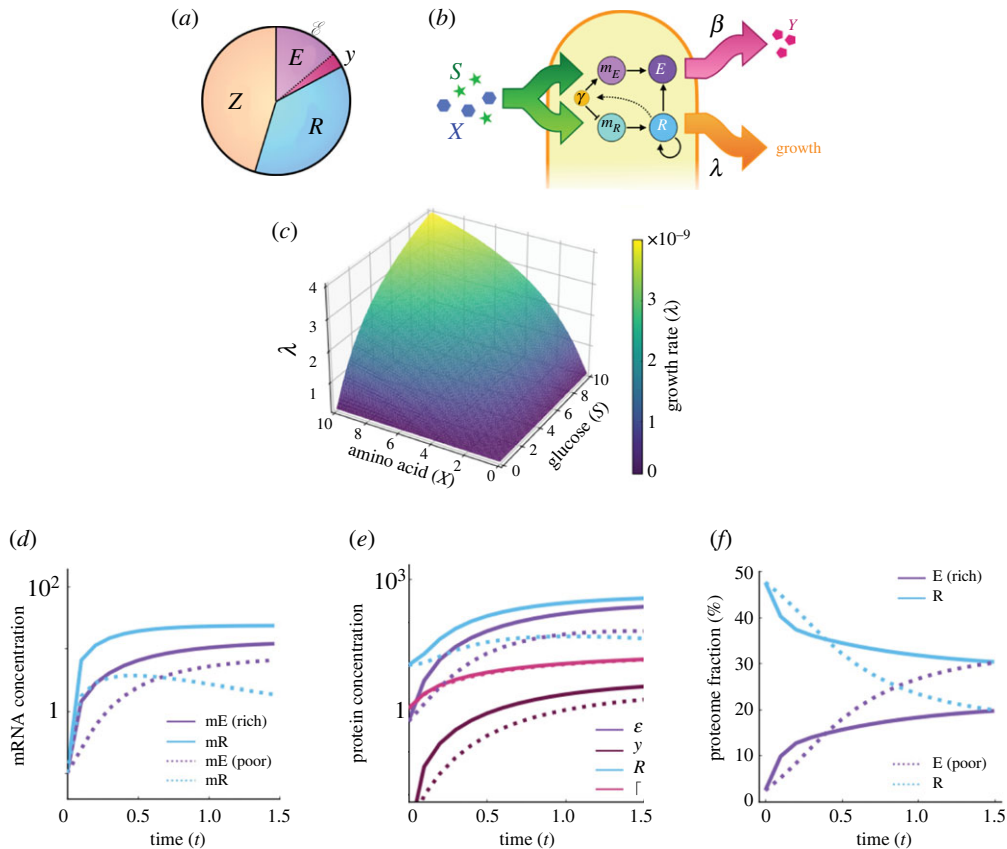


Figure 1. Proteome dynamics model. (a) The overall proteome comprises three main sectors: housekeeping proteins denoted as Z , ribosomal proteins as R and metabolism and nutrient uptake as E . The latter sector is further divided into \mathcal{E} and y to consider the production of amino acid Y at a rate β . (b) Dynamics of proteome sectors are driven by the availability of glucose (S) and an essential amino acid (X). Growth rate is proportional to sector R , which in turn activates ppGpp during the stringent response, thus inhibiting transcription ribosomal mRNAs and promoting synthesis of metabolites from sector E . (c) Bacterial growth rate (λ) obtained numerically for a range of amino acid and glucose concentrations. (d) mRNA concentrations in time of different proteome sectors (purple for m_E and blue for m_R) under different nutrient conditions: low-resource ($S = 0.5$, dotted lines) and rich substrate ($S = 10$, solid lines). (e) Protein concentrations for each sector (\mathcal{E} in purple, y in dark red and R in blue). In environments with low concentrations of amino acids (indicated as poor, dotted lines), ppGpp (I , in pink) inhibits the production of ribosomal proteins and promotes the synthesis of metabolites. (f) Fraction of proteome occupied for different sectors (E in purple and R in blue). In high-nutrient environments (solid lines), a large proteome fraction is allocated for sector R , while in environments with low concentrations of amino acids (indicated as poor, dotted lines) the fraction allocated for sector E increases, thus inhibiting growth and promoting the production of the exchanged metabolite.

interactions in complex microbial communities, for instance by postulating mechanistic population dynamic models that can be used to evaluate the eco-evolutionary dynamics, although they are often limited by modelling and parametric uncertainties [51]. Other studies have posed coarse-grained models that associate growth rate with how bacterial cells allocate resources towards protein synthesis and metabolic functions [41,52–55].

A common assumption of constraint-based models is that the proteome can be divided into three different functional sectors [40]: the ribosomal sector (hereafter denoted with R), which includes not only ribosomes, but also other associated molecules (initiation factors, elongation factors, tRNA synthases); the metabolic sector (represented with E), which encloses catabolic and anabolic proteins, constitutively expressed proteins, and particularly, the necessary enzymes to grow in specific media. As illustrated in figure 1a, we further divide sector E into two sub-sectors: y for the energetic cost of amino acid production, and \mathcal{E} for the remaining catabolic and anabolic reactions occurring inside the cell. A third sector (denoted Z) encompasses all the genes not associated with growth rate, including housekeeping genes. Therefore, we consider that $Z + (\mathcal{E} + y) + R = 1$.

A recent study incorporated dynamic metabolic adaptation into a consumer-resource framework [56] to show that the structure and composition of competitive communities are highly influenced by the

metabolism of member species [21,42]. Here, we use a similar approach to evaluate the role of dynamic proteome allocation in the resulting interaction profile exhibited by a co-culture of auxotrophic strains. First, as other studies [21,40,41], we assume that sector Z remains constant through time and we focus on evaluating the role of nutrient availability in the temporal dynamics of sectors E and R. Figure 1b shows a schematic diagram of our proteome partition model, illustrating that the size of each sector is regulated by the input of substrate (e.g. glucose, denoted by S) and an essential metabolite (e.g. an amino acid, with concentration denoted by X). We model the input of glucose and amino acid into the cell as a saturating function, which depends on both the concentration of S and X , which, for simplicity, we assume are consumed at the same rate:

$$u(S, X) = \frac{\mu(S \cdot X)}{k + (S \cdot X)},$$

where μ and k are parameters denoting the maximum uptake rates and half-saturation constants, respectively.

To overcome the negative effects associated with carbon and amino acid starvation, bacterial cells encode a well-conserved stress signalling pathway known as the stringent response [32,57]. The main effector of this response is the alarmone ppGpp, with a time-dependent concentration we denote by $\Gamma(t)$. Crucially, synthesis and degradation of ppGpp depend on nutrient availability; if too many resources are being used to produce proteins for growth, *RelA* detects empty tRNAs and enhances the production of ppGpp, which in turn reshapes the proteome by enhancing the synthesis of metabolites from the E sector [57].

In our proteome partition model, we consider that ppGpp is produced at a rate $\theta = \theta_b + F(\theta_i, R)$, where θ_b represents the basal transcription rate, and $F(\theta_i; R)$ an inducible rate that increases monotonically with respect to R . So, if δ_Γ denotes a constant degradation rate of the alarmone, then the dynamics of ppGpp regulation can be modelled as

$$\frac{d\Gamma}{dt} = \theta_b + \frac{\theta_i R}{1 + R} - \delta_\Gamma \Gamma. \quad (2.1)$$

To model the effect of ppGpp in the size of each proteome sector, we consider that Γ induces the transcription of genes of the E sector when too many resources are used by the R sector. In consequence, transcription of the ribosomal sector is suppressed under amino acid limitation [31,57]. In our model, we denote with η_E and η_R the mRNA degradation rates of the E sector and R sector. Basal transcription of genes encoding for proteins belonging to sectors E and R occurs at a maximum rate $\hat{\theta}_E$ and $\hat{\theta}_R$, while ppGpp-inducible transcription of sectors E and R is represented by θ_E and θ_R , respectively. So, if ω and n represent Hill parameters describing the interaction between ppGpp and each sector of the proteome, then the temporal dynamics of mRNAs belonging to sectors E and R can be written as

$$\frac{dm_E}{dt} = \theta_E \left(\frac{\Gamma^n}{\Gamma^n + \omega^n} \right) + \hat{\theta}_E u(S, X) - \eta_E m_E \quad (2.2)$$

and

$$\frac{dm_R}{dt} = \theta_R \left(\frac{\omega^n}{\Gamma^n + \omega^n} \right) + \hat{\theta}_R u(S, X) - \eta_R m_R. \quad (2.3)$$

Now, let us assume that the synthesis of each metabolite is associated with a cost in terms of energy consumption [41,42]. In particular, we model biosynthesis of the focal amino acid by dividing the E sector into two sub-sectors: \mathcal{E} and y . Sub-sector \mathcal{E} encompasses the majority of catabolic reactions in the cell, and the y sub-sector describes the energetic cost of producing amino acid Y and releasing it into the environment (figure 1a). Therefore, the translation rate of each mRNA, κ_E and κ_R , depends on J_E and J_R , which indicate the proportion of ribosomes that are actively translating the mRNAs of each sector. Finally, if φ denotes the fraction of sector E that is used for the synthesis of metabolites in sub-sector y , and δ_E and δ_R denote degradation rates of proteins from each sector, we can describe the dynamics of different proteome sectors using the following equations:

$$\frac{d\mathcal{E}}{dt} = (1 - \varphi)(\kappa_E \cdot m_E) \left(\frac{1 - \mathcal{E}}{R \cdot J_E} \right) - \delta_E \mathcal{E}, \quad (2.4)$$

$$\frac{dy}{dt} = \varphi(\kappa_E \cdot m_E) \left(\frac{1 - y}{R \cdot J_E} \right) - \delta_E y \quad (2.5)$$

and

$$\frac{dR}{dt} = \kappa_R \cdot m_R \left(\frac{1 - R}{R \cdot J_R} \right) - \delta_R R. \quad (2.6)$$

Table 1. Parameters used in the numerical experiments of the multi-scale model for bacterial strains B_x and B_y , which are auxotrophic to amino acids X and Y , respectively.

parameter	value (B_x)	value (B_y)	description
<i>proteome partition model</i>			
μ	1×10^3	1×10^3	maximum uptake rate
k	50.0	50.0	half-saturation constant
$\hat{\theta}_E$	0.020	0.020	basal maximum transcription rate for the genes on E
$\hat{\theta}_R$	0.08	0.08	basal maximum transcription rate for the genes on R
θ_E	20	20	ppGpp inducible transcription rate for the genes on E
θ_R	20	20	ppGpp inducible transcription rate for the genes on R
n	2.0	2.0	Hill coefficient
ω	5.1	5.1	activity threshold for ppGpp in sectors E and R
κ_E	60.0	60.0	maximum translation rate for the mRNAs in sector E
κ_R	60.0	60.0	maximum translation rate for the mRNAs in sector R
η_E	2.4	2.4	degradation rate of the transcripts on E
η_R	2.4	2.4	degradation rate of the transcripts on R
δ_E	1.7	1.7	degradation rate of molecules from E
δ_R	1.7	1.7	degradation rate of transcripts from R
δ_{ppGpp}	0.8	0.8	degradation rate of ppGpp
J_E	0.5	0.5	fraction of ribosomes translating proteins from E
J_R	0.5	0.5	fraction of ribosomes translating proteins from R
θ_b	0.05	0.05	basal ppGpp synthesis rate
θ_i	15.2	15.2	induced ppGpp synthesis rate
φ	0.01	0.01	fraction of sector E used for synthesis of amino acid
<i>population dynamics model</i>			
c	13.95×10^9	13.95×10^9	cell efficiency
k_1	1×10^{-11}	1×10^{-11}	growth conversion coefficient
k_2	0.5×10^{-9}	1×10^{-9}	amino acid conversion coefficient

By numerically solving equations (2.1)–(2.6), we obtain the temporal dynamics of mRNA and protein concentrations under different environmental conditions. In particular, [figure 1d,e](#) shows a comparison of dynamics exhibited under high- and low-resource conditions (with parameter values described in [table 1](#)). Note how, in nutrient-rich conditions, overall production of proteins and mRNAs is promoted, while under resource limitation metabolic activity is reduced and, crucially, ppGpp allocates a larger fraction of the proteome to the E sector. Therefore, under amino acid starvation, growth rate is reduced and synthesis of essential metabolites is enhanced, as illustrated in [figure 1e](#).

3. Modelling population dynamics of an auxotrophic consortium

In this section, we will postulate a simple population dynamics model that will allow us to evaluate temporal changes in the abundance of different strains growing in co-culture. First, let us represent with $B_x(t)$ the density of a bacterial population auxotrophic to amino acid X at time $t \in [0, T]$, and with $B_y(t)$ the density of a strain auxotrophic to amino acid Y .

Our model considers that growth rate of strain B_x is a Monod function, $U_x(S, X) = \hat{\lambda} \cdot S / (K + S)$, with growth rate $\hat{\lambda}$ and a half-saturation constant represented with K . Previous studies have shown that the concentration of ribosomal proteins is proportional to the cell's growth rate [38,58], so we use the proteome partition model to obtain $\hat{\lambda} = k_1 \cdot \lambda$, where k_1 is a proportionality constant and λ is computed by interpolating the surface shown in [figure 1c](#) with the current environmental concentration of glucose (with a concentration denoted with S) and amino acid X (for which strain B_x

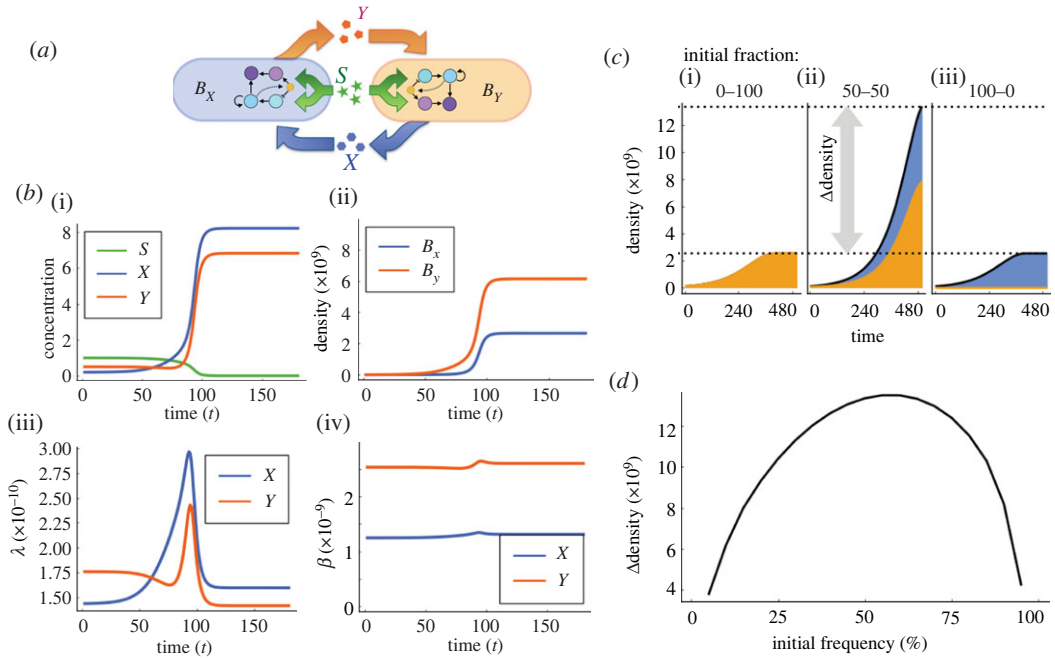


Figure 2. Numerical simulations of population dynamics model. (a) Schematic of the population dynamics model for auxotrophic strains (B_x and B_y), competing for glucose (S , in green) and exchanging essential metabolites (X and Y , in blue and orange, respectively). Growth rate of each sub-population depends on the availability of resources and can be estimated from the proteome allocation model. (b) (i) Numerical results showing the concentration of resources in time: X is produced by B_y and consumed by B_x , while Y is generated by B_x and used as a nutrient by B_y . (ii) Bacterial density of each sub-population in an experiment of duration $T = 180$ units of time. (iii) Maximum growth rate (λ) obtained from the proteome partition model from the environmental concentrations of resources. (iv) Production and export of amino acids for each strain. (c) Growth curves obtained by simulating the model in co-culture (iii), and for each strain grown in isolation (ii) B_x in blue and (ii) B_y in orange. (d) To quantify the pair-wise interaction profile, we consider a range of initial population fractions and numerically evaluate the productivity of the co-culture and compare it with respect to that expected in the absence of interaction. Positive interactions are characterized by a concave Δ density curve, indicating that productivity is maximized when both strains are present.

is auxotrophic). Then growth rate of strain B_x can be modelled with a growth function $G_x(S, X) = c U_x(S, X)$, where c denotes a resource conversion parameter into biomass. Similarly, growth rate of strain B_y can be written as $G_y(S, Y) = c U_y(S, Y)$.

We also consider that amino acid X is produced by strain B_y in surplus and exported into the environment at a rate β_y . Similarly, B_x exports into the environment amino acid Y at a rate β_x . Note that this rate includes both production and export of amino acid into the environment, which we consider to be proportional to the size of sub-sector y of E . Therefore, we consider that production of amino acid Y by strain B_x occurs at a rate $\hat{\beta}_y = k_2 \cdot \beta_y$, where β_y is obtained from the proteome partition model and k_2 is a parameter denoting the conversion of ATP into Y molecules (analogous for the production rate of X).

In summary, the population dynamics of the cross-feeding interaction illustrated in figure 2a can be described with the following differential equations:

$$\frac{dS}{dt} = -(U_x(S, X) \cdot B_x + U_y(S, Y) \cdot B_y) S, \quad (3.1)$$

$$\frac{dX}{dt} = \hat{\beta}_x \cdot G_y(S, Y) \cdot B_y - U_x(S, X) \cdot B_x, \quad (3.2)$$

$$\frac{dY}{dt} = \hat{\beta}_y \cdot G_x(S, X) \cdot B_x - U_y(S, Y) \cdot B_y, \quad (3.3)$$

$$\frac{dB_x}{dt} = G_x(S, X) \cdot B_x \quad (3.4)$$

and
$$\frac{dB_y}{dt} = G_y(S, Y) \cdot B_y, \quad (3.5)$$

with initial conditions $(S^0, X^0, Y^0, B_x^0, B_y^0)$.

We use a sequential multi-scale modelling approach to integrate both models. First, we compute λ and β using the proteome partition model for a range of glucose and amino acid concentrations. Then we discretize the interval $[0, T]$ in regular sub-intervals $[t_i, t_i + \Delta t]$ and, for each time step, we numerically solve equations (3.1)–(3.5) assuming that growth and production rates are constant during this time interval. From the concentration of each nutrient in the environment at time $t_i + \Delta t$, we interpolate the surface shown in figure 1c and obtain λ_{i+1} and β_{i+1} , which are then used to solve the population dynamics model in the next sub-interval. This iterative process allows us to model the dynamics of each sub-population based on instantaneous growth and production rates.

Figure 2b shows a numerical realization of the multi-scale model in a low-resource environment ($S_0 = 1$, $X_0 = 0.2$, $Y_0 = 0.5$). As the concentration of amino acids is initially very low, then growth of both populations is limited. However, as the population increases in density, the concentration of X and Y increases, thus promoting growth of both coexisting sub-populations until S is depleted and the population reaches stationary phase. Note how this feedback between the ecological and proteomic models results in values for λ and β that change in time, as the concentration of resource changes due to consumption and production.

To compare growth in the mixed culture with respect to that observed when each strain is grown in isolation, we consider that the initial population is composed of equal densities of both strains and solve the system forward for T units of time. We then compare the final density with that observed in a similar numerical experiment that considers that each strain is growing in isolation. As expected, figure 2c shows that mono-cultures present impaired growth while, under the same environmental conditions but with both strains present, the model shows an exponentially growing population that is glucose-limited, instead of limited by amino acids.

We repeated this numerical experiment for a range of initial fractions of both strains and quantified the profile of interaction from the bacterial density observed at the end of the experiment. This allowed us to determine the relative density of the co-culture compared to that expected if there was no metabolic interaction between members of the community. Figure 2d shows that the resulting interaction profile is concave, indicating a positive interaction between both strains. In the following section, we will estimate experimentally the profile of interaction for a collection of auxotrophic strains.

4. Positive interactions are common in an experimental auxotrophic system

In the past decade, a series of studies have used synthetic communities to study the rules of community assembly under controlled laboratory conditions (see [59–61] for comprehensive reviews on the topic). For instance, a previous study assembled synthetic communities of *E. coli* to understand how communities with different levels of complexity can establish metabolic cross-feeding interactions based on the syntropic exchange of amino acids [29].

Here, we use a similar experimental approach, and use strains of *Escherichia coli* K-12 obtained from the Keio collection [62], with different amino acid auxotrophies conferred by the deletion of the following genes: *glyA*, *hisB*, *ilvA*, *leuB*, *metA*, *pheA*, *thrC*, *trpC* and *tyrA*. Moreover, we use fluorescent markers to measure species abundances at the end of the experiment, thus enabling us to differentiate between mutualism and parasitism in mixed cultures. We validated that each strain exhibits impaired growth unless the amino acid auxotrophy is complemented, either by externally supplementing the amino acid or when paired with a different mutant.

In general, we consider that positive interactions arise when one species promotes the growth of another one (e.g. niche expansion [63,64] or enhancing nutrient availability [15,65]), or negative when an individual in the community inhibits another member's growth rate (e.g. nutrient sequestration [66,67] or toxin production [68]). Similar to the computational experiments, we characterized the pairwise interaction profile between strains by measuring the optical density (OD_{630}) exhibited by a 50–50 co-culture. By subtracting the mean density of both strains grown in isolation, we obtain the *relative optical density* (ΔOD_{630}). Table 2 summarizes the relative optical density obtained for all pair-wise interactions. Note that, although most of them are positive (e.g. $\Delta glyA-\Delta tyrA$, $\Delta metA-\Delta tyrA$ and $\Delta pheA-\Delta hisB$ have the highest positive relative density), only a few co-cultures exhibit a negative relative density ($\Delta pheA-\Delta thrC$ and $\Delta glyA-\Delta hisB$).

Figure 3a shows the optical density of all 36 co-cultures with 11 different initial abundances of each strain, from 100% of one strain, to 100% of its partner (see Methods). Although some interactions are positive (e.g. $\Delta pheA-\Delta hisB$, $\Delta glyA-\Delta tyrA$, $\Delta leuB-\Delta tyrA$, $\Delta metA-\Delta tyrA$), not all interaction profiles are

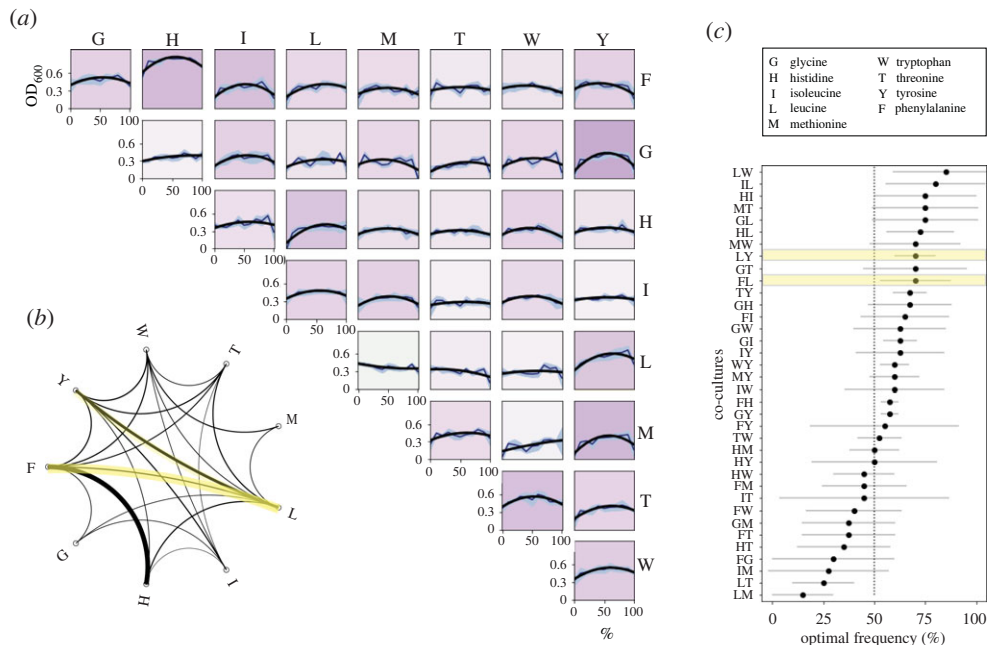


Figure 3. Interaction profiles of *E. coli* strains with different amino acid auxotrophies. Each strain contains a deletion in genes encoding essential metabolites: $\Delta glyA$, $\Delta hisB$, $\Delta ilvA$, $\Delta leuB$, $\Delta metA$, $\Delta pheA$, $\Delta thrC$, $\Delta trpC$ and $\Delta tyrA$. (a) Each box illustrates growth (measured as OD₆₃₀ after 48 h) in terms of the initial fraction of each strain in the co-culture. Solid line illustrates a quadratic fit ($\alpha x^2 + \beta x$) and blue areas the standard deviation over the mean. The colour of each box is proportional to the relative density exhibited by a 50–50 co-culture of both strains; white denotes a neutral interaction, while darker shades of purple denote larger values of ΔOD_{630} . In our data, only $\Delta leuB$ – $\Delta metA$ exhibits negative relative densities, and is represented in light green. (b) Network of pair-wise interactions. Each node represents a mutant strain and the width of the edge is proportional to the strength of the interaction. Only edges with an α larger than the mean are shown (highlighted in yellow are auxotroph pairs that will later be analysed in more detail). (c) Optimal initial frequency in two-member cross-feeding communities. Each dot represents the initial frequency in co-culture that maximizes density, and error bars denoting the standard deviation over the mean ($N = 4$). Rows correspond to each pair of strains (e.g. if LW has an optimal frequency of 85%, this implies that the co-culture that maximizes OD is composed of 85% of $\Delta leuB$ and 15% of $\Delta thrC$).

concave, suggesting that not all co-cultures can establish a cross-feeding interaction (e.g. $\Delta metA$ – $\Delta glyA$, $\Delta thrC$ – $\Delta ilvA$, $\Delta leuB$ – $\Delta metA$, $\Delta leuB$ – $\Delta trpC$). We performed a quadratic fit ($\alpha x^2 + \beta x$) to these experimental interaction profiles, and used α to quantify the degree of pair-wise interaction, whereby high values of α are correlated with enhanced cooperative growth. Table 2 shows the values of α obtained for each pair, as well as its corresponding R^2 . Figure 3b shows an α -interaction network, showing that all auxotrophic strains are able to establish a productive consortium with at least another mutant, albeit with variable interaction strengths.

Note that, despite positive interactions being prevalent throughout the network, certain strains were more successful in establishing positive interactions (e.g. $\Delta leuB$, $\Delta pheA$, $\Delta trpC$) than others (e.g. $\Delta metA$, $\Delta glyA$). This is consistent with previous studies that have shown that the biosynthetic cost of producing an amino acid correlates with the capacity of establishing cross-feeding interactions with other auxotroph strains [29]. In our data, mutant $\Delta leuB$ has the higher number of cross-feeding interactions, and is also auxotrophic to the most expensive amino acid when considering the cellular abundances of amino acids [69].

To quantify cooperative growth as a function of the relative abundance of each strain, we subtract the final optical density observed for each population with the expected final optical density if there was no metabolic interaction between both strains (the line of additivity, obtained by interpolating the optical density in each mono-culture). Figure 4a illustrates the profile of interaction obtained for a co-culture of $\Delta leuB$ and $\Delta tyrA$. A consequence of the biosynthetic costs of producing both amino acids is that the productivity is maximized with $\Delta leuB$ at 70% and $\Delta tyrA$ at 30% (relative density at 70–30 is 37% larger than at 50–50). We estimated the optimal initial frequency for all 36 auxotroph pairs and observed that growth of the co-culture was maximized at different initial frequencies, as illustrated in figure 3c. It is important to note that the optimal initial ratio is not necessarily the final strain frequency that maximizes productivity of the consortia.

Table 2. Profile of pair-wise interaction obtained for different pairs of *E. coli* auxotrophic strains.

key	strains	mean OD ₆₃₀	mean OD ₆₃₀	ΔOD_{630}	α	R^2
		(mono-cultures)	(50–50)			
FG	$\Delta pheA - \Delta glyA$	0.4627	0.5417	0.079	0.39273	0.62
FH	$\Delta pheA - \Delta hisB$	0.77335	0.952	0.17865	0.69142	0.759
FI	$\Delta pheA - \Delta ilvA$	0.4064	0.5573	0.1509	0.351	0.666
FL	$\Delta pheA - \Delta leuB$	0.473	0.54	0.067	0.35761	0.749
FM	$\Delta pheA - \Delta metA$	0.466	0.56	0.094	0.39667	0.402
FT	$\Delta pheA - \Delta thrC$	0.49315	0.4858	-0.00735	0.44008	0.100
FW	$\Delta pheA - \Delta trpC$	0.52855	0.6215	0.09295	0.4694	0.750
FY	$\Delta pheA - \Delta tyrA$	0.4615	0.57	0.1085	0.46357	0.585
GH	$\Delta glyA - \Delta hisB$	0.4337	0.4263	-0.0074	0.29576	0.573
GI	$\Delta glyA - \Delta ilvA$	0.44935	0.5477	0.09835	0.36992	0.708
GL	$\Delta glyA - \Delta leuB$	0.4315	0.525	0.0935	0.35719	0.285
GM	$\Delta glyA - \Delta metA$	0.3605	0.471	0.1105	0.39148	0.290
GW	$\Delta glyA - \Delta trpC$	0.3821	0.4733	0.0912	0.35986	0.190
GY	$\Delta glyA - \Delta tyrA$	0.37035	0.6073	0.23695	0.30094	0.796
GT	$\Delta glyA - \Delta thrC$	0.36575	0.475	0.10925	0.29148	0.413
HI	$\Delta hisB - \Delta ilvA$	0.4185	0.477	0.0585	0.4071	0.190
HL	$\Delta hisB - \Delta leuB$	0.4274	0.573	0.1456	0.34599	0.748
HM	$\Delta hisB - \Delta metA$	0.47265	0.5682	0.09555	0.39923	0.681
HT	$\Delta hisB - \Delta thrC$	0.463	0.5415	0.0785	0.39782	0.494
HW	$\Delta hisB - \Delta trpC$	0.44285	0.5277	0.08485	0.39261	0.730
HY	$\Delta hisB - \Delta tyrA$	0.483	0.5495	0.0665	0.41851	0.414
IL	$\Delta ilvA - \Delta leuB$	0.43685	0.5525	0.11565	0.40002	0.886
IM	$\Delta ilvA - \Delta metA$	0.4559	0.5657	0.1098	0.43427	0.778
IT	$\Delta ilvA - \Delta thrC$	0.4489	0.4547	0.0058	0.46806	0.149
IW	$\Delta ilvA - \Delta trpC$	0.4905	0.5755	0.085	0.40843	0.764
IY	$\Delta ilvA - \Delta tyrA$	0.53095	0.587	0.05605	0.46823	0.276
LM	$\Delta leuB - \Delta metA$	0.44635	0.4697	0.02335	0.43427	0.422
LT	$\Delta leuB - \Delta thrC$	0.4596	0.4883	0.0287	0.46806	0.416
LW	$\Delta leuB - \Delta trpC$	0.46885	0.4828	0.01395	0.4099	0.416
LY	$\Delta leuB - \Delta tyrA$	0.57085	0.715	0.14415	0.45674	0.765
MT	$\Delta metA - \Delta thrC$	0.3871	0.4613	0.0742	0.32419	0.379
MW	$\Delta metA - \Delta trpC$	0.4221	0.4565	0.0344	0.31137	0.506
MY	$\Delta metA - \Delta tyrA$	0.365	0.5745	0.2095	0.28458	0.687
TW	$\Delta thrC - \Delta trpC$	0.4894	0.5862	0.0968	0.38874	0.778
TY	$\Delta thrC - \Delta tyrA$	0.45825	0.5655	0.10725	0.34843	0.802
WY	$\Delta trpC - \Delta tyrA$	0.47215	0.5945	0.12235	0.35519	0.035

5. Cooperative growth is enhanced under amino acid starvation

As we are interested in evaluating how amino acid availability modifies the profile of interaction, we performed high-throughput experiments on a two-dimensional range of externally supplemented amino acids. The basal concentration of each amino acid was obtained from a computational genome-scale metabolic model (iML1515) that provides estimates on the concentration of amino acid necessary

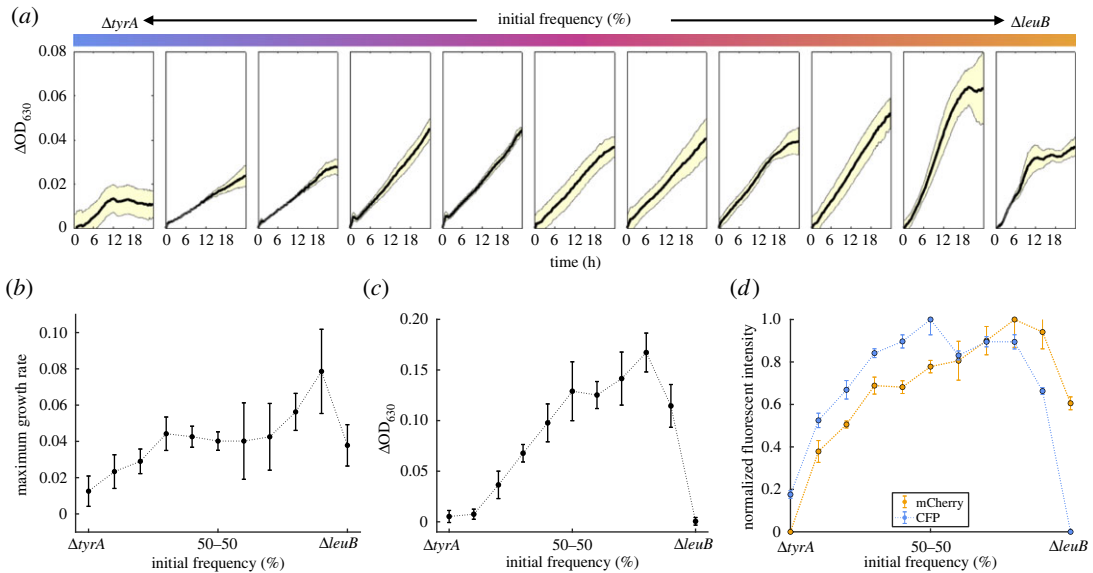


Figure 4. Cross-feeding interaction between ΔleuB and ΔtyrA . (a) Growth curves obtained in LB without antibiotics for different initial fractions of each strain; from a mono-culture of ΔtyrA in blue, to ΔleuB in orange, with intermediate frequencies represented with a colour gradient. Black line denotes the mean optical density as a function of time in a 24 h experiment, with yellow areas representing the standard error over the mean ($N = 4$ for the co-cultures, $N = 7$ for the mono-cultures). (b) Maximum growth rate estimated from 24 h growth curves. Note that growth rate is maximized in co-culture, with strains in isolation exhibiting decreased growth. (c) Relative density (measured as ΔOD_{630}) as a function of initial abundances of different strains. Error bars represent the mean OD_{630} with standard error ($N = 8$). The shape of this plot indicates a mutualistic profile between ΔleuB and ΔtyrA , with maximum density achieved around 70% of ΔleuB . (d) Normalized fluorescence intensity as a function of initial frequency (CFP in blue and mCherry in orange).

to grow a dry weight of bacteria [70,71] (see Methods; 16.91 mg l^{-1} of leucine, 7.15 mg l^{-1} of tyrosine and 8.75 mg l^{-1} of phenylalanine). We performed amino acid checkerboards in triplicate for mono-cultures of ΔleuB , ΔtyrA and ΔpheA , as well as for two co-cultures $\Delta\text{leuB}-\Delta\text{tyrA}$ and $\Delta\text{leuB}-\Delta\text{pheA}$.

Figure 5a illustrates the relative density obtained for $\Delta\text{leuB}-\Delta\text{tyrA}$ growing under different concentrations of both amino acids (from 0 to a fourfold increase in the basal concentration of each amino acid). As anticipated by previous studies, cooperative growth increased when an amino acid was at a low concentration, independently of the concentration of the other metabolite. In particular, our data show that relative densities are maximized at low concentrations of tyrosine and intermediate concentrations of leucine, consistent with leucine being more costly than tyrosine in terms of the number of glucose molecules necessary to produce the amount of amino acids in a cell [69].

To validate that growth is indeed limited by the environmental concentration of the exchanged metabolite, we externally supplemented glucose and amino acid and estimated the resulting relative density. Data are summarized in table 3, showing significant differences between amino acid treatments (p -value < 0.001 for $\Delta\text{leuB}-\Delta\text{tyrA}$ co-culture and p -value < 0.001 for $\Delta\text{leuB}-\Delta\text{pheA}$ co-culture; Welch two sample t -test), but not between glucose treatments (p -value > 0.01 for $\Delta\text{leuB}-\Delta\text{tyrA}$ co-culture and p -value > 0.001 for $\Delta\text{leuB}-\Delta\text{pheA}$ co-culture; Wilcoxon rank sum test).

Moreover, to experimentally determine the relative abundances of strains in the consortia, we introduced constitutively expressed genes encoding for different fluorescent markers (mCherry and CFP, as detailed in table 4). This allowed us to estimate the final abundance of each strain from the normalized fluorescent intensity. Indeed, figure 4d shows the population exhibits high levels of mCherry fluorescence in co-cultures where ΔleuB is dominant, and in cyan for initial frequencies that contain mostly bacterial type ΔtyrA .

From these normalized fluorescent data, we estimated the relative abundance of each strain in an experiment inoculated with a 50-50 co-culture of both strains and evaluated the interaction between environmental conditions and population structure. For instance, the checkerboard depicted in figure 5b suggests that the concentration of tyrosine is an important factor driving the structure of the population; at high concentrations, both strains coexist at similar proportions, while at intermediate

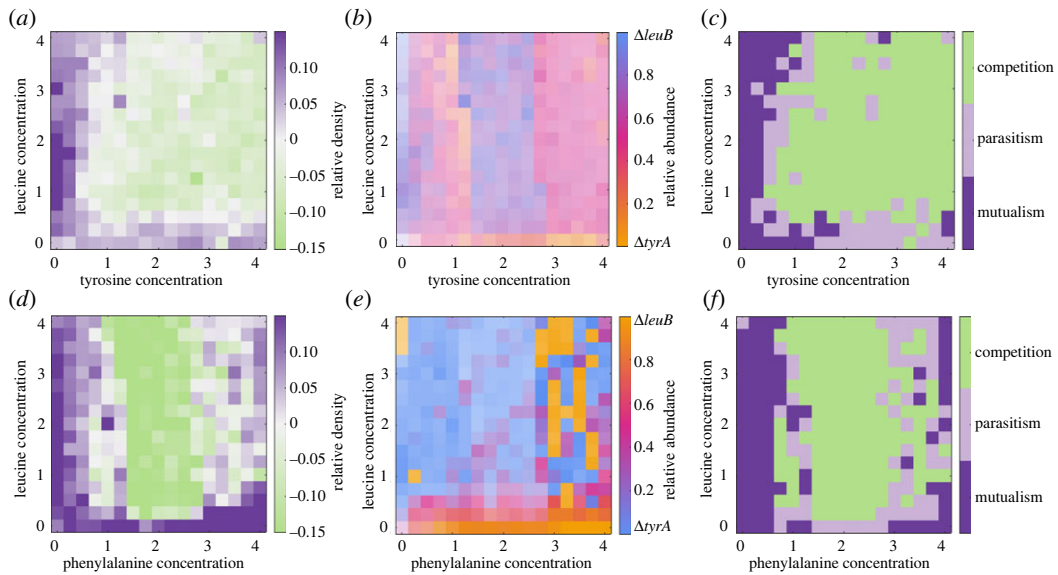


Figure 5. Amino acid checkerboard experiments. (a) Matrix of relative densities performed under different amino acid concentrations (leucine and tyrosine, in units of basal concentration). Purple boxes represent high relative density values, white if the interaction is additive, and green boxes correspond to negative relative densities. (b) Matrix of the relative abundances estimated using fluorescent intensity, in orange when a majority of the population is $\Delta tyrA$, and in blue when the population consists mainly of $\Delta leuB$ cells. (c) Interaction profiles for different amino acid concentrations (mutualism in purple, parasitism in light purple and competition in green). (d) Relative density checkerboard obtained by exposing a co-culture of $\Delta leuB$ and $\Delta pheA$ to a range of leucine (L) and phenylalanine (F). (e) Relative abundance between $\Delta leuB$ (in blue) and $\Delta pheA$ (in orange). (f) Interaction profile between $\Delta leuB$ and $\Delta pheA$ also shows that mutualism (in purple) is established mainly at low amino acid concentrations.

Table 3. Mean and standard deviation of final OD_{630} of the co-cultures $\Delta leuB-\Delta tyrA$ and $\Delta leuB-\Delta pheA$.

co-culture	treatment	mean OD_{630}	s.d.
$\Delta leuB - \Delta tyrA$	M9 2 g l ⁻¹ glucose	0.178250	0.009601
$\Delta leuB - \Delta tyrA$	M9 4 g l ⁻¹ glucose	0.202250	0.008496
$\Delta leuB - \Delta tyrA$	M9 6 g l ⁻¹ glucose	0.211000	0.011424
$\Delta leuB - \Delta tyrA$	high amino acids 2 g l ⁻¹ glucose	0.502000	0.069954
$\Delta leuB - \Delta tyrA$	high amino acids 4 g l ⁻¹ glucose	0.484750	0.054669
$\Delta leuB - \Delta tyrA$	high amino acids 6 g l ⁻¹ glucose	0.478750	0.025849
$\Delta leuB - \Delta pheA$	M9 2 g l ⁻¹ glucose	0.14475	0.05680
$\Delta leuB - \Delta pheA$	M9 4 g l ⁻¹ glucose	0.207500	0.008732
$\Delta leuB - \Delta pheA$	M9 6 g l ⁻¹ glucose	0.235250	0.016873
$\Delta leuB - \Delta pheA$	high amino acids 2 g l ⁻¹ glucose	0.570750	0.52875
$\Delta leuB - \Delta pheA$	high amino acids 4 g l ⁻¹ glucose	0.480500	0.019033
$\Delta leuB - \Delta pheA$	high amino acids 6 g l ⁻¹ glucose	0.026818	0.01630

tyrosine concentrations, the relative abundance of $\Delta leuB$ increases with respect to $\Delta tyrA$. By contrast, the concentration of leucine appears to be less relevant for the resulting population structure.

Based on the optical density and the relative abundance of each strain, we then estimated the density of each sub-population and compared its growth relative to the corresponding mono-culture under the same environmental conditions. This allowed us to characterize the pair-wise interaction of the community: *mutualistic* when both strains grow better together than in isolation, *parasitism* when one cell performs better in co-culture, at the expense of the other strain, and *competition* when both mono-cultures grow better than the mixed population. Figure 5c shows that competitive interactions are dominant at high levels of both amino acids, while parasitic interactions can be found at intermediate

Table 4. List of strains used in this study.

strain ID/ Δ gene	amino acid auxotrophy	source
$\Delta pheA$	phenylalanine	Keio collection
$\Delta glyA$	glycine	Keio collection
$\Delta hisB$	histidine	Keio collection
$\Delta ilvA$	isoleucine	Keio collection
$\Delta leuB$	leucine	Keio collection
$\Delta metA$	methionine	Keio collection
$\Delta thrC$	threonine	Keio collection
$\Delta trpC$	tryptophan	Keio collection
$\Delta tyrA$	tyrosine	Keio collection
$\Delta leuB - mCherry$	leucine	this study
$\Delta tyrA - eCyan$	tyrosine	this study
$\Delta pheA - mCherry$	phenylalanine	this study
$\Delta leuB - eCyan$	leucine	this study

amino acid concentrations. As expected, mutualistic interactions are prevalent at low concentrations of supplemented amino acids, particularly of tyrosine.

Finally, to evaluate the generality of this pattern, we performed another checkerboard experiment with the co-culture $\Delta leuB$ and $\Delta pheA$. Similar to the previous auxotrophic pair, [figure 5d–f](#) shows that, in this case, the region of coexistence appears to be smaller, with $\Delta leuB$ being more abundant than $\Delta pheA$ in environments where both amino acids were externally supplemented. Also, as with the $\Delta leuB$ – $\Delta tyrA$ pair, mutualistic interactions can be found predominantly in experiments with low amino acid concentrations (in this case, leucine and phenylalanine), while competitive interactions are established at intermediate amino acid concentration (due to glucose becoming the limiting nutrient).

6. Stringent response promotes metabolic cooperation, in theory

Our experimental data suggest the amino acid availability is the key factor driving the nature of pair-wise interactions. To evaluate if our multi-scale model exhibits qualitatively similar patterns, we simulated the addition of different concentrations of amino acid, and measured the resulting relative density when grown in mono-culture or in a mixed population. [Figure 6a](#) shows the density of each strain in a low-amino-acid environment. In this case, the benefit of metabolic cross-feeding is high and both strains grow better together than separately. As we increase the concentration of both amino acids, we transition from a parasitic interaction ([figure 6b](#)) whereby only B_y benefits from growth in co-culture to a competitive interaction where both strains grow better separately than in a mixed population ([figure 6c](#)).

This transition from mutualism to competition is also clear in the computational checkerboard experiment illustrated in [figure 6d](#). As in the experimental data, in environments saturated with amino acids, the benefit of metabolic cross-feeding diminishes and glucose becomes the limiting growth factor. As anticipated by previous studies [2,18,27–29], cooperative growth is maximized at low amino acid concentrations ([figure 6e](#)). Crucially, it is precisely at low amino acid concentrations where ppGpp reshapes the proteome to suppress growth, and regulate the metabolism to overcome nutrient starvation. In this context, we were interested in evaluating the effect of removing ppGpp-induced transcription at a cellular level in the profile of interaction exhibited by the population.

In our model, this can be achieved by reducing R-induced synthesis of ppGpp (θ_i). In particular, we evaluated how the profile of the interaction changed when considering a reduced induction of ppGpp by repeating the computational checkerboard experiment with $\theta_i=1.5$. As expected, the region of cooperativity presents a significant reduction in area ([figure 6f](#)). Similarly, the relative density of the co-culture also presents an overall reduction when reducing ppGpp-induction. [Figure 6g](#) shows that the region of positive values decreases considerably, producing competitive interactions in zones where the interaction was previously mutualistic.

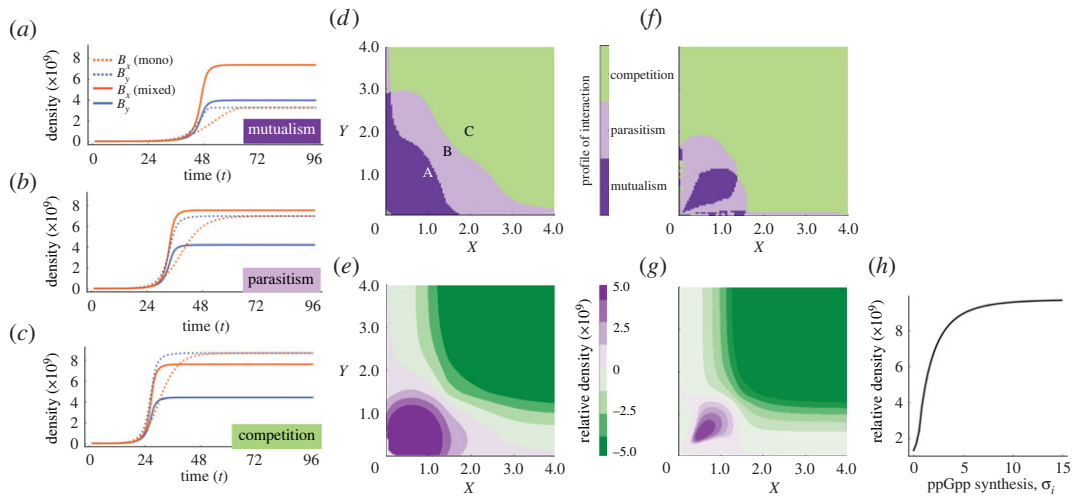


Figure 6. ppGpp modulates the profile of interaction in cross-feeding communities. (a) Bacterial densities obtained by simulating the multi-scale model in an environment with low glucose and amino acid concentrations ($S_0 = 1$, $X_0 = 1$, $Y_0 = 1$, with $\theta_i = 15.2$), and inoculated with a 50–50 co-culture (solid lines) or with each strain in isolation (dotted lines). Both strains (B_x and B_y , in blue and orange, respectively) exhibit increased growth than expected in isolation (mutualism). (b) At intermediate amino acid concentrations ($S_0 = 1$, $X_0 = 1.5$, $Y_0 = 1.5$), only B_y benefits from coexisting with B_x (parasitism). (c) In high amino acid environments ($S_0 = 1$, $X_0 = 2$, $Y_0 = 2$), both strains show reduced growth compared to the mono-cultures (competition). (d) Profile of interaction determined for a range of both amino acids (mutualism in dark purple, parasitism in light purple and competition in green). (e) Relative density for a range of both amino acids (positive interactions and negative interactions in gradients of purple and green, respectively). (f) Computational amino acid checkerboard generated with $\theta_i = 1.5$ shows that the region of mutualism and parasitism reduces when limiting induction of ppGpp. (g) Relative density under different initial amino acid conditions for strains with reduced ppGpp-induced synthesis. (h) Relative density as a function of ppGpp synthesis, θ_i , shows that dynamic proteome allocation promotes cooperative growth.

The relevance of ppGpp regulation in the community dynamics is twofold: (1) it reduces growth rate of any fast-growing strain and (2) it allocates more resources for production of the exchanged metabolite. Both of these effects are beneficial for the community, as illustrated by the increase in relative density as a function of θ_i shown in figure 6h. In the absence of ppGpp-induced regulation ($\theta_i = 0$), cooperative communities can be driven to collapse due to the over-production of ribosomal proteins and a general increase in gene transcription [30,72]. The community also collapses in environments with low amino acid concentrations if ppGpp regulation overcompensates to nutrient starvation and allocates too many resources for the synthesis of metabolites at the expense of growth. At high amino acid concentrations, the effect of ppGpp in the community dynamics is less evident as, independently of the value of θ_i , both strains grow better in isolation than in co-culture.

In principle, it would be possible to test this modelling prediction experimentally, for instance by engineering strains with modified ppGpp synthesis. This could be achieved with either genetic or post-translational modification that modifies the expression of *relA* and *spoT* [32,35]. It is important to mention, however, that previous studies have shown that strains with knockouts in *relA* and *spoT* are auxotrophic to multiple amino acids, mainly due to the role of ppGpp as a regulatory molecule in the transcription of genes involved in amino acid biosynthesis pathways.

7. Discussion

A benefit of living in a community is that populations can perform a wide range of functions that are not achievable by any member species alone, as observed in the microbiota of soil [73,74], water [20,75] and the human gut [76]. Metabolic interactions within microbial communities are mediated by the cellular state of each member, but also by the diversity and abundance of each species [77], as well as by the extracellular environmental conditions [78,79]. It has been shown that population dynamics and evolutionary dynamics occur at similar time scales, so drive community dynamics is also susceptible to be tuned by evolution [80,81]. On the one side, cross-feeding interactions can become unstable through the appearance of defectors, although adaptive evolution and precise environmental control present an opportunity for artificially selecting microbial communities with specific functions [61,82–84].

Moreover, recent studies have shown that ecological interactions are significantly modified by the metabolism of individual members of the community [42,85–87]. Bacteria can modify the local environment by secreting toxins or growth-promoting molecules, thus modulating the metabolism of other members of the community. Therefore, metabolic exchange results in a network of pair-wise interactions that can drive the stability and function of polymicrobial communities [29,88], as well as the community dynamics [82,89,90]. Crucially, the competitive or cooperative nature of these interactions depends upon the environmental conditions and the population structure.

For instance, mutualism can be beneficial when a secreted metabolite is toxic for some members of the community but is consumed by other individuals, thus promoting growth of the metabolite-producing population and reducing the toxin's detrimental effect on the community [9,91]. Other examples of mutualism can be found in spatially explicit [92] and fluctuating environments [93]. In this paper, we focus on studying a ubiquitous form of mutualistic interaction: the exchange of essential amino acids within mixed populations [94–96]. A previous experimental evolution study found that if amino acids are present in the environment in high concentrations, then bacterial populations rapidly lost the ability to autonomously synthesize the supplemented amino acids [97]. This strong selection for the loss of biosynthetic functions is a consequence of auxotrophic mutants exhibiting increased fitness over the prototrophic strain when the focal metabolite is present in the environment [98].

To overcome the complexity of natural microbial communities, previous studies have used synthetic microbial systems to evaluate a community's capacity to exchange metabolites in controlled environmental conditions [10,46], as well as to evaluate the functional diversity and the role of the environment in community assembly [60,99]. But even simple microbial consortia can present complex ecological dynamics and can be dominated by high-order interactions [59]. Furthermore, reducing community complexity in engineered synthetic consortia can be counter-productive, as a reduction in genetic diversity and functional redundancy can negatively impact the community's stability. Indeed, in the absence of functional redundancy, removing a member of the consortium can drive the entire population to extinction [21]. We believe this observation is fundamental for designing stable synthetic communities.

In this paper, we combined experiments with multi-scale modelling to evaluate the role of dynamic proteome allocation in the interaction profile exhibited by auxotrophic communities. Both our model and experimental data validate previous studies showing that cooperative interactions are prevalent under nutrient starvation, while competitive interactions are more common in rich environments. Furthermore, numerical simulations of our computational model suggest that suppressing dynamic proteome allocation has the effect of reducing yield of the community, a consequence of the rapid growth and consumption of exchanged metabolites when amino acids are rare. Altogether, we conclude that dynamic proteome allocation is an important factor driving the productivity and interaction profile of cross-feeding microbial communities.

8. Methods

8.1. Strains and media

All strains used in this study were obtained from the Keio collection [62], each one with different amino acid auxotrophy conferred by the deletion of the following genes: *glyA*, *hisB*, *ilvA*, *leuB*, *metA*, *pheA*, *thrC*, *trpC* and *tyrA*. The genotype of the strains was validated by colony PCR with two different strategies: (1) using for each strain primers located upstream (forward) and downstream (reverse) of the deletion site (band corresponding to the kanamycin resistance cassette) and (2) with the first forward of each gene and the first *k1* reported in the construction of the collection that it aligns within the kanamycin resistance cassette.

To estimate fluorescent intensities in co-culture, we transformed the strains Δ *tyrA*, Δ *pheA* and Δ *leuB* with a multicopy plasmid assembled by the Golden Gate Cloning technique [100], using the following bioparts from the MoClo kit: pTU1-A-lacZ (vector), pBP-J23100 (promoter), pBP_BB_a_B0034 (RBS), pBP-ORF-eCFP (eCyan fluorescent protein) or pBP-ORF-mCherry (mCherry fluorescent protein) and pBP-BB_a_B0015 (terminator).

For mono-cultures and co-culture experiments, we selected a single colony of each strain and grew them in LB medium for 16 h with 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of kanamycin, then harvested by centrifuging at 14 000 r.p.m. for 10 min, washed twice with M9 medium salts (7 g l^{-1} K_2HPO_4 , 2 g l^{-1} KH_2PO_4 , 0.58 g l^{-1}

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 1 g l^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.1 g l^{-1} MgSO_4) and suspended in M9 medium with glucose (2 g l^{-1}). Before inoculation all strains were adjusted at 0.3 of OD 630 nm (optical density was measured using a BioTek ELx808 plate reader in 96-well plates).

We determined critical amino acid concentrations using the metabolic model iML1515 [70,71]. To determine the amino acid concentration (AC) in milligrams per litre to grow a dry weight of bacteria (RDW) [70,71] we used the following expression: $\text{AC} [\text{mg l}^{-1}] = (\text{RDW} \cdot (0.295) \cdot \text{ACMW})$, where ACMW is the amino acid molecular weight.

8.2. Pair-wise interaction assays

To evaluate the growth of the strains (mono-cultures) in medium with the amino acid that compensates their auxotrophy we performed kinetic cultures using microplates with $20 \mu\text{l}$ of cells and $180 \mu\text{l}$ of M9-glucose media (M9 salts supplemented with 2, 4 or 6 g l^{-1} of glucose and each amino acid: 16.91 mg l^{-1} of leucine, 7.15 mg l^{-1} of tyrosine and 8.75 mg l^{-1} of phenylalanine [70,71]). Each amino acid was supplemented in 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 and 4 times the basal concentration for each amino acid (concentrations calculated according to iML1515 model [70]). All plates were incubated at 37°C with continuous shake for 24 h in a BioTek ELx808 plate reader. We measured OD₆₃₀ every 20 min. Using 0 and 3 times the basal concentration of leucine and tyrosine in minimal media with 2, 4 and 6 g l^{-1} of glucose we compared the final OD of our co-culture $\Delta\text{leuB}-\Delta\text{tyrA}$ (50–50) demonstrating growth differences between M9 and M9 supplemented with amino acids (table 3).

To characterize the profile of interaction, we estimated the final density of 36 co-cultures with 11 different initial frequencies between both strains: 200:0, 180:20, 160:40, 140:60, 120:80, 100:100, 80:120, 60:140, 40:160, 20:180 and 0:200 μl . Initial bacterial densities were adjusted in M9-glucose media without amino acids before inoculation, with experiments performed in 96-well plates and incubated at 37°C with 100 r.p.m. orbital shake. Optical density at 630 nm (OD₆₃₀) was measured at different time-points (24, 48 and 72 h). To measure difference in growth rate at the 11 initial frequencies, we evaluated the growth of the co-culture $\Delta\text{leuB}-m\text{Cherry}$ and $\Delta\text{tyrA}-e\text{Cyan}$ in minimal media with 0 amino acids, and measured the optical density every 20 min using a microplate reader (BioTek ELx808). Maximum growth rate was estimated with the slope of a linear fit performed to the exponential phase of the optical density plot ($\log(\text{OD}_{630})$).

For checkerboard experiments, we inoculated two 50–50 co-cultures, with $\Delta\text{leuB}-m\text{Cherry}$ and $\Delta\text{tyrA}-e\text{Cyan}$ and $\Delta\text{pheA}-m\text{Cherry}$ and $\Delta\text{leuB}-e\text{Cyan}$, into a 96-well plate with minimal medium supplemented with a range of leucine and tyrosine and a range of leucine and phenylalanine. For all amino acids, we used concentrations from 0 to 4 times, increasing each 0.25, according to the basal concentration for each amino acid. OD and fluorescence were measured at 0, 24 and 48 h using a fluorescent plate reader (BioTek Synergy H1). To estimate the relative frequency of different strains in co-culture, we used a flow cytometer (Beckman Coulter with 20 000 events in each environmental condition).

8.3. Computational experiments

Numerical simulations of the model were performed in Julia using DifferentialEquations.jl [101]. Unless stated otherwise, parameter values used are summarized in table 1. Data analysis was performed in Matlab and Python using standard libraries.

Data accessibility. All data and code used in this study are available in a public repository [102]. Data and relevant code for this research work are stored in GitHub: <https://github.com/ccg-esb-lab> and have been archived within the Zenodo repository: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6344915>.

Authors' contributions. D.R.-G.: conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, writing—original draft, writing—review and editing; H.d.L.-V.: conceptualization, formal analysis, investigation, software, visualization, writing—original draft, writing—review and editing; J.U.: investigation, writing—review and editing; M.S.: investigation, writing—review and editing; R.P.-M.: conceptualization, formal analysis, investigation, visualization, writing—original draft, writing—review and editing; A.F.-H.: conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, project administration, writing—original draft, writing—review and editing.

All authors gave final approval for publication and agreed to be held accountable for the work performed therein. Conflict of interest declaration. We declare we have no competing interests.

Funding. D.R.-G. is a doctoral student in Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and received fellowship 572373 from CONACYT. H.d.L.-V. is a graduate student in Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. H.d.L.-V. and R.P.-M. were supported by PAPIIT-UNAM (grant no. IN209419). R.P.-M. also received funding by CONACYT Ciencia

Básica (grant no. A1-S-32164). A.F.-H. was funded by PAPIIT-UNAM (grant no. IN215920) and CONACYT Ciencia de Frontera (grant no. FORDECYT-39589).

Acknowledgements. We thank D. Romero, A. Escalante, D. Hidalgo, F. Santos, M. Munguía and R. Domínguez for useful discussions. We are also grateful to A. Saralegui from Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada for assistance using the flow cytometer.

References

- Herren CM. 2020 Disruption of cross-feeding interactions by invading taxa can cause invasional meltdown in microbial communities. *Proc. R. Soc. B* **287**, 20192945. (doi:10.1098/rspb.2019.2945)
- Hoek TA, Axelrod K, Biancalani T, Yurtsev EA, Liu J, Gore J. 2016 Resource availability modulates the cooperative and competitive nature of a microbial cross-feeding mutualism. *PLoS Biol.* **14**, e1002540. (doi:10.1371/journal.pbio.1002540)
- Rodríguez-Verdugo A, Vulin C, Ackermann M. 2019 The rate of environmental fluctuations shapes ecological dynamics in a two-species microbial system. *Ecol. Lett.* **22**, 838–846. (doi:10.1111/ele.13241)
- Oña L, Kost C. 2020 Cooperation increases robustness to ecological disturbance in microbial cross-feeding networks. *bioRxiv.* (doi:10.1101/2020.05.15.098103)
- Bell T, Newman JA, Silverman BW, Turner SL, Lilley AK. 2005 The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* **436**, 1157–1160. (doi:10.1038/nature03891)
- Dal Co A, Brannon C, Ackermann M. 2018 Division of labor in bacteria. The emergence of subpopulations that perform distinct metabolic roles has been observed in populations of genetically identical bacteria. *eLife* **7**, e38578. (doi:10.7554/eLife.38578)
- Giri S, Waschina S, Kaleta C, Kost C. 2019 Defining division of labor in microbial communities. *J. Mol. Biol.* **431**, 4712–4731. (doi:10.1016/j.jmb.2019.06.023)
- Thommes M, Wang T, Zhao Q, Paschalidis IC, Segrè D. 2019 Designing metabolic division of labor in microbial communities. *MSystems* **4**, e00263–18. (doi:10.1128/mSystems.00263-18)
- Goldschmidt F, Regoes RR, Johnson DR. 2018 Metabolite toxicity slows local diversity loss during expansion of a microbial cross-feeding community. *ISME J.* **12**, 136–144. (doi:10.1038/ismej.2017.147)
- Pacheco AR, Moel M, Segrè D. 2019 Costless metabolic secretions as drivers of interspecies interactions in microbial ecosystems. *Nat. Commun.* **10**, 103. (doi:10.1038/s41467-018-07946-9)
- Amamath K *et al.* 2021 Stress-induced cross-feeding of internal metabolites provides a dynamic mechanism of microbial cooperation. *bioRxiv.* (doi:10.1101/2021.06.24.449802)
- Tipton L, Darcy JL, Hynson NA. 2019 A developing symbiosis: enabling cross-talk between ecologists and microbiome scientists. *Front. Microbiol.* **10**, 292. (doi:10.3389/fmicb.2019.00292)
- Wintermute EH, Silver PA. 2010 Emergent cooperation in microbial metabolism. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 407. (doi:10.1038/msb.2010.66)
- Fritts RK *et al.* 2020 Enhanced nutrient uptake is sufficient to drive emergent cross-feeding between bacteria in a synthetic community. *ISME J.* **14**, 2816–2828. (doi:10.1038/s41396-020-00737-5)
- MacLean RC, Fuentes-Hernandez A, Greig D, Hurst LD, Gudelj I. 2010 A mixture of ‘cheats’ and ‘co-operators’ can enable maximal group benefit. *PLoS Biol.* **8**, e1000486. (doi:10.1371/journal.pbio.1000486)
- Ratzke C, Barrere J, Gore J. 2020 Strength of species interactions determines biodiversity and stability in microbial communities. *Nat. Ecol. Evol.* **4**, 376–383. (doi:10.1038/s41559-020-1099-4)
- Freilich S *et al.* 2011 Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nat. Commun.* **2**, 589. (doi:10.1038/ncomms1597)
- Hammarlund SP, Chacón JM, Harcombe WR. 2019 A shared limiting resource leads to competitive exclusion in a cross-feeding system. *Environ. Microbiol.* **21**, 759–771. (doi:10.1111/1462-2920.14493)
- Gilbert JA *et al.* 2012 Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME J.* **6**, 298–308. (doi:10.1038/ismej.2011.107)
- Enke TN, Leventhal GE, Metzger M, Saavedra JT, Cordero OX. 2018 Microscale ecology regulates particulate organic matter turnover in model marine microbial communities. *Nat. Commun.* **9**, 1. (doi:10.1038/s41467-017-02088-w)
- Pacciani-Mori L, Giometto A, Suweis S, Maritan A. 2020 Dynamic metabolic adaptation can promote species coexistence in competitive microbial communities. *PLoS Comput. Biol.* **16**, e1007896. (doi:10.1371/journal.pcbi.1007896)
- Manhart M, Shakhnovich EI. 2018 Growth tradeoffs produce complex microbial communities on a single limiting resource. *Nat. Commun.* **9**, 3214. (doi:10.1038/s41467-018-05703-6)
- Monaco H, Sereno T, Liu K, Reagor C, Deforet M, Xavier JB. 2020 Spatial-temporal dynamics of a microbial cooperative behavior robust to cheating. *bioRxiv.* (doi:10.1101/2020.01.23.914481)
- Momeni B, Waite AJ, Shou W. 2013 Spatial self-organization favors heterotypic cooperation over cheating. *eLife* **2**, e00960. (doi:10.7554/eLife.00960)
- Sun Z, Koffel T, Stump SM, Grimaud GM, Klausmeier CA. 2019 Microbial cross-feeding promotes multiple stable states and species coexistence, but also susceptibility to cheaters. *J. Theor. Biol.* **465**, 63–77. (doi:10.1016/j.jtbi.2019.01.009)
- Zelezniak A, Sheridan S, Patil KR. 2014 Contribution of network connectivity in determining the relationship between gene expression and metabolite concentration changes. *PLoS Comput. Biol.* **10**, e1003572. (doi:10.1371/journal.pcbi.1003572)
- Shou W, Ram S, Vilar JM. 2007 Synthetic cooperation in engineered yeast populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 1877–1882. (doi:10.1073/pnas.0610575104)
- Harcombe WR *et al.* 2014 Metabolic resource allocation in individual microbes determines ecosystem interactions and spatial dynamics. *Cell Rep.* **7**, 1104–1115. (doi:10.1016/j.celrep.2014.03.070)
- Mee MT, Collins JJ, Church GM, Wang HH. 2014 Synthrophic exchange in synthetic microbial communities. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E2149–E2156. (doi:10.1073/pnas.1405641111)
- Steinchen W, Zegarra V, Bange G. 2020 (p) ppGpp: magic modulators of bacterial physiology and metabolism. *Front. Microbiol.* **11**, 2072. (doi:10.3389/fmicb.2020.02072)
- Haurlyuk V, Atkinson GC, Murakami KS, Tenson T, Gerdes K. 2015 Recent functional insights into the role of (p) ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 298–309. (doi:10.1038/nrmicro3448)
- Traxler MF *et al.* 2008 The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **68**, 1128–1148. (doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06229.x)
- Sanchez-Vazquez P, Dewey CN, Kitten N, Ross W, Gourse RL. 2019 Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **116**, 8310–8319. (doi:10.1073/pnas.1819682116)
- Paul BJ, Ross W, Gaal T, Gourse RL. 2004 rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 749–770. (doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.091347)
- Xiao H, Kalman M, Ikehara K, Zemel S, Glaser G, Cashel M. 1991 Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.* **266**, 5980–5990. (doi:10.1016/S0021-9258(19)67694-5)
- Bodriész E, Molenaar D, Teusink B, Bruggeman FJ. 2015 How fast-growing bacteria robustly tune their ribosome concentration to approximate growth-rate maximization. *FEBS J.* **282**, 2029–2044. (doi:10.1111/febs.13258)

37. Balakrishnan R, de Silva RT, Hwa T, Cremer J. 2021 Suboptimal resource allocation in changing environments constrains response and growth in bacteria. *Mol. Syst. Biol.* **17**, e10597. (doi:10.15252/msb.202110597)
38. Wu C, Balakrishnan R, Mori M, Manzanarez G, Zhang Z, Hwa T. 2021 Cellular perception of growth rate and the mechanistic origin of bacterial growth laws. *bioRxiv*. (doi:10.1101/2021.10.16.464649)
39. Schofield WB, Zimmermann-Kogadeeva M, Zimmermann M, Barry NA, Goodman AL. 2018 The stringent response determines the ability of a commensal bacterium to survive starvation and to persist in the gut. *Cell Host Microbe* **24**, 120–132. (doi:10.1016/j.chom.2018.06.002)
40. Scott M, Gunderson CW, Mateescu EM, Zhang Z, Hwa T. 2010 Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. *Science* **330**, 1099–1102. (doi:10.1126/science.1192588)
41. Liao C, Blanchard AE, Lu T. 2017 An integrative circuit–host modelling framework for predicting synthetic gene network behaviours. *Nat. Microbiol.* **2**, 1658–1666. (doi:10.1038/s41564-017-0022-5)
42. Pacciani-Mori L, Suweis S, Maritan A, Giometto A. 2021 Constrained proteome allocation affects coexistence in models of competitive microbial communities. *ISME J.* **15**, 1458–1477. (doi:10.1038/s41396-020-00863-0)
43. Schellenberger J *et al.* 2011 Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat. Protoc.* **6**, 1290–1307. (doi:10.1038/nprot.2011.308)
44. Stolyar S *et al.* 2007 Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 92. (doi:10.1038/msb4100131)
45. Taffs R *et al.* 2009 In silico approaches to study mass and energy flows in microbial consortia: a syntrophic case study. *BMC Syst. Biol.* **3**, 114. (doi:10.1186/1752-0509-3-114)
46. Klitgord N, Segrè D. 2010 Environments that induce synthetic microbial ecosystems. *PLoS Comput. Biol.* **6**, e1001002. (doi:10.1371/journal.pcbi.1001002)
47. Mahadevan R, Henson MA. 2012 Genome-based modeling and design of metabolic interactions in microbial communities. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **3**, e201210008. (doi:10.5936/CSBJ.201210008)
48. Zomorodi AR, Islam MM, Maranas CD. 2014 d-OptCom: dynamic multi-level and multi-objective metabolic modeling of microbial communities. *ACS Synth. Biol.* **3**, 247–257. (doi:10.1021/sb4001307)
49. Diener C, Gibbons SM, Resendis-Antonio O. 2020 MICOM: metagenome-scale modeling to infer metabolic interactions in the gut microbiota. *MSystems* **5**, e00606-19. (doi:10.1128/mSystems.00606-19)
50. Dukovski I *et al.* 2021 A metabolic modeling platform for the computation of microbial ecosystems in time and space (COMETS). *Nat. Protoc.* **16**, 5030–5082. (doi:10.1038/s41596-021-00593-3)
51. Saa P, Urrutia A, Silva-Andrade C, Martín AJ, Garrido D. 2021 Modeling approaches for probing cross-feeding interactions in the human gut microbiome. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **20**, 79–89. (doi:10.1016/j.csbj.2021.12.006)
52. Basan M *et al.* 2015 Overflow metabolism in *Escherichia coli* results from efficient proteome allocation. *Nature* **528**, 99–104. (doi:10.1038/nature15765)
53. Greulich P, Scott M, Evans MR, Allen RJ. 2015 Growth-dependent bacterial susceptibility to ribosome-targeting antibiotics. *Mol. Syst. Biol.* **11**, 796. (doi:10.15252/msb.20145949)
54. Greulich P, Dolezal J, Scott M, Evans MR, Allen RJ. 2017 Predicting the dynamics of bacterial growth inhibition by ribosome-targeting antibiotics. *Phys. Biol.* **14**, 065005. (doi:10.1088/1478-3975/aa8001)
55. Maitra A, Dill KA. 2016 Modeling the overproduction of ribosomes when antibiotic drugs act on cells. *Biophys. J.* **110**, 743–748. (doi:10.1016/j.bpj.2015.12.016)
56. MacArthur R. 1970 Species packing and competitive equilibrium for many species. *Theor. Popul. Biol.* **1**, 1–11. (doi:10.1016/0040-5809(70)90039-0)
57. Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. 2005 ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **13**, 236–242. (doi:10.1016/j.tim.2005.03.008)
58. Dennis PP, Bremer H. 1974 Differential rate of ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* **84**, 407–422. (doi:10.1016/0022-2836(74)90449-5)
59. Goldford JE *et al.* 2018 Emergent simplicity in microbial community assembly. *Science* **361**, 469–474. (doi:10.1126/science.aat1168)
60. Estrela S *et al.* 2021 Functional attractors in microbial community assembly. *Cell Syst.* **13**, 29–42. (doi:10.1016/j.cels.2021.09.011)
61. Chang CY *et al.* 2021 Engineering complex communities by directed evolution. *Nat. Ecol. Evol.* **5**, 1011–1023. (doi:10.1038/s41559-021-01457-5)
62. Baba T *et al.* 2006 Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006-0008. (doi:10.1038/msb4100050)
63. Finkelshtein A, Roth D, Ben Jacob E, Ingham CJ. 2015 Bacterial swarms recruit cargo bacteria to pave the way in toxic environments. *MBio* **6**, e00074-15. (doi:10.1128/mBio.00074-15)
64. Blasche S *et al.* 2021 Metabolic cooperation and spatiotemporal niche partitioning in a kefir microbial community. *Nat. Microbiol.* **6**, 196–208. (doi:10.1038/s41564-020-00816-5)
65. Kehe J, Ortiz A, Kulesa A, Gore J, Blainey PC, Friedman J. 2020 Positive interactions are common among culturable bacteria. *bioRxiv*. (doi:10.1101/2020.06.24.169474)
66. Tostado-Islas O *et al.* 2021 Iron limitation by transferrin promotes simultaneous cheating of pyoverdine and exoprotease in *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J.* **15**, 1–11. (doi:10.1038/s41396-021-00938-6)
67. García-Bayona L, Comstock LE. 2018 Bacterial antagonism in host-associated microbial communities. *Science* **361**, eaat2456. (doi:10.1126/science.aat2456)
68. Granato ET, Meiller-Legrand TA, Foster KR. 2019 The evolution and ecology of bacterial warfare. *Curr. Biol.* **29**, R521–R537. (doi:10.1016/j.cub.2019.04.024)
69. Kaleta C, Schäuble S, Rinas U, Schuster S. 2013 Metabolic costs of amino acid and protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. J.* **8**, 1105–1114. (doi:10.1002/biot.201200267)
70. Orth JD *et al.* 2011 A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 535. (doi:10.1038/msb.2011.65)
71. King ZA *et al.* 2016 BiGG Models: a platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models. *Nucleic Acids Res.* **44**, D515–D522. (doi:10.1093/nar/gkv1049)
72. Hernandez VJ, Bremer H. 1993 Characterization of RNA and DNA synthesis in *Escherichia coli* strains devoid of ppGpp. *J. Biol. Chem.* **268**, 10 851–10 862. (doi:10.1016/S0021-9258(18)82063-4)
73. Naylor D *et al.* 2020 Deconstructing the soil microbiome into reduced-complexity functional modules. *MBio* **11**, e01349-20. (doi:10.1128/mBio.01349-20)
74. Bastida F, Eldridge DJ, García C, Png GK, Bardgett RD, Delgado-Baquerizo M. 2021 Soil microbial diversity–biomass relationships are driven by soil carbon content across global biomes. *ISME J.* **15**, 1–11. (doi:10.1038/s41396-021-00906-0)
75. Pollak S, Gralka M, Sato Y, Schwartzman J, Lu L, Cordero OX. 2020 Public good exploitation in natural bacterioplankton communities. *bioRxiv*. (doi:10.1101/2020.12.13.422583)
76. Coyte KZ, Schluter J, Foster KR. 2015 The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability. *Science* **350**, 663–666. (doi:10.1126/science.aad2602)
77. Louca S *et al.* 2018 Function and functional redundancy in microbial systems. *Nat. Ecol. Evol.* **2**, 936–943. (doi:10.1038/s41559-018-0519-1)
78. Johns NI, Blazejewski T, Gomes AL, Wang HH. 2016 Principles for designing synthetic microbial communities. *Curr. Opin. Microbiol.* **31**, 146–153. (doi:10.1016/j.mib.2016.03.010)
79. Sanchez-Gorostiaga A, Bajić D, Osborne ML, Poyatos JF, Sanchez A. 2019 High-order interactions distort the functional landscape of microbial consortia. *PLoS Biol.* **17**, e3000550. (doi:10.1371/journal.pbio.3000550)
80. Sanchez A, Gore J. 2013 Feedback between population and evolutionary dynamics determines the fate of social microbial populations. *PLoS Biol.* **11**, e1001547. (doi:10.1371/journal.pbio.1001547)
81. Goyal A, Bittleston LS, Leventhal GE, Lu L, Cordero OX. 2021 Interactions between strains govern the eco-evolutionary dynamics of microbial communities. *bioRxiv*. (doi:10.1101/2021.01.04.425224)
82. Xie L, Shou W. 2021 Steering ecological-evolutionary dynamics to improve artificial selection of microbial communities. *Nat. Commun.* **12**, 1. (doi:10.1038/s41467-020-20314-w)
83. Arias-Sánchez FI, Vessman B, Mitri S. 2019 Artificially selecting microbial communities: if we can breed dogs, why not microbiomes? *PLoS Biol.* **17**, e3000356. (doi:10.1371/journal.pbio.3000356)

84. Shibasaki S, Mitri S. 2020 Controlling evolutionary dynamics to optimize microbial bioremediation. *Evol. Appl.* **13**, 2460–2471. (doi:10.1111/eva.13050)
85. Bajic D, Sanchez A. 2020 The ecology and evolution of microbial metabolic strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **62**, 123–128. (doi:10.1016/j.copbio.2019.09.003)
86. Zelezniak A, Andrejev S, Ponomarova O, Mende DR, Bork P, Patil KR. 2015 Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 6449–6454. (doi:10.1073/pnas.1421834112)
87. Rivett DW, Bell T. 2018 Abundance determines the functional role of bacterial phylotypes in complex communities. *Nat. Microbiol.* **3**, 767–772. (doi:10.1038/s41564-018-0180-0)
88. Niehaus L *et al.* 2019 Microbial coexistence through chemical-mediated interactions. *Nat. Commun.* **10**, 2052. (doi:10.1038/s41467-019-10062-x)
89. Turner PE, Souza V, Lenski RE. 1996 Tests of ecological mechanisms promoting the stable coexistence of two bacterial genotypes. *Ecology* **77**, 2119–2129. (doi:10.2307/2265706)
90. Abreu CI, Andersen Woltz VL, Friedman J, Gore J. 2020 Microbial communities display alternative stable states in a fluctuating environment. *PLoS Comput. Biol.* **16**, e1007934. (doi:10.1371/journal.pcbi.1007934)
91. Piccardi P, Vessman B, Mitri S. 2019 Toxicity drives facilitation between 4 bacterial species. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **116**, 15 979–15 984. (doi:10.1073/pnas.1906172116)
92. Pande S, Kaftan F, Lang S, Svatoš A, Germerodt S, Kost C. 2016 Privatization of cooperative benefits stabilizes mutualistic cross-feeding interactions in spatially structured environments. *ISME J.* **10**, 1413–1423. (doi:10.1038/ismej.2015.212)
93. Dal Co A, Ackermann M, Van Vliet S. 2019 Metabolic activity affects the response of single cells to a nutrient switch in structured populations. *J. R. Soc. Interface* **16**, 20190182. (doi:10.1098/rsif.2019.0182)
94. Hosoda K *et al.* 2011 Cooperative adaptation to establishment of a synthetic bacterial mutualism. *PLoS ONE* **6**, e17105. (doi:10.1371/journal.pone.0017105)
95. Johnson WM *et al.* 2020 Auxotrophic interactions: a stabilizing attribute of aquatic microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **96**, fiae115. (doi:10.1093/femsec/fiae115)
96. Zengler K, Zaramela LS. 2018 The social network of microorganisms: how auxotrophies shape complex communities. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 383–390. (doi:10.1038/s41579-018-0004-5)
97. D'Souza G, Kost C. 2016 Experimental evolution of metabolic dependency in bacteria. *PLoS Genet.* **4**, 1006364. (doi:10.1371/journal.pgen.1006364)
98. D'Souza G, Waschina S, Pande S, Bohl K, Kaleta C, Kost C. 2014 Less is more: selective advantages can explain the prevalent loss of biosynthetic genes in bacteria. *Evolution* **68**, 2559–2570. (doi:10.1111/evo.12468)
99. Marsland III R, Cui W, Goldford J, Sanchez A, Korolev K, Mehta P. 2019 Available energy fluxes drive a transition in the diversity, stability, and functional structure of microbial communities. *PLoS Comput. Biol.* **15**, e1006793. (doi:10.1371/journal.pcbi.1006793)
100. Moore SJ *et al.* 2016 EcoFlex: a multifunctional MoClo kit for *E. coli* synthetic biology. *ACS Synth. Biol.* **5**, 1059–1069. (doi:10.1021/acssynbio.6b00031)
101. Rackauckas C, Nie Q. 2017 DifferentialEquations.jl: a performant and feature-rich ecosystem for solving differential equations in Julia. *J. Open Res. Softw.* **5**, 15. (doi:10.5334/jors.151)
102. Reyes-González D, Luna HD, Utrilla J, Sieber M, Peña R, Fuentes-Hernández A. 2022 Dynamic proteome allocation regulates the profile of interaction of auxotrophic bacteria consortia. *Zenodo Repository.* (doi:10.5281/zenodo.6344915)



Research article

Optimal control and Bayes inference applied to complex microbial communities

Jhoana P. Romero-Leiton^{1,2,*}, **Kernel Prieto**², **Daniela Reyes-Gonzalez**³ and **Ayari Fuentes-Hernandez**³

¹ Engineering Faculty, Cesmag University, Pasto, Colombia

² Design and Visual Arts Department, Georgian College, Barrie, Canada

³ Center for Genomic Sciences, National Autonomous University of Mexico, Cuernavaca, Mexico

* **Correspondence:** Email: jpatirom3@gmail.com, JhoanaPatricia.RomeroLeiton@mygeorgian.ca;
Tel: +14388368866.

Abstract: Interactions between species are essential in ecosystems, but sometimes competition dominates over mutualism. The transition between mutualism-competition can have several implications and consequences, and it has hardly been studied in experimental settings. This work studies the mutualism between cross-feeding bacteria in strains that supply an essential amino acid for their mutualistic partner when both strains are exposed to antimicrobials. When the strains are free of antimicrobials, we found that, depending on the amount of amino acids freely available in the environment, the strains can exhibit extinction, mutualism, or competition. The availability of resources modulates the behavior of both species. When the strains are exposed to antimicrobials, the population dynamics depend on the proportion of bacteria resistant to the antimicrobial, finding that the extinction of both strains is eminent for low levels of the resource. In contrast, competition between both strains continues for high levels of the resource. An optimal control problem was then formulated to reduce the proportion of resistant bacteria, which showed that under cooperation, both strains (sensitive and resistant) are immediately controlled, while under competition, only the density of one of the strains is decreased. In contrast, its mutualist partner with control is increased. Finally, using our experimental data, we did parameters estimation in order to fit our mathematical model to the experimental data.

Keywords: antimicrobials; sensitive bacteria; resistant bacteria; amino acids; cross-feeding bacteria; mutualism; competition; experimental data; parameter estimation

1. Introduction

The rapid surge of resistant strains and the void in discovering of new antimicrobials has made antimicrobial resistance one of the most critical problems in public health nowadays. There has been a great effort from the scientific community to understand the basic mechanisms by which bacteria become resistant to several antibiotics; almost all efforts have focused on the study of a single strain, and it is just in recent times that we have been looking at how the interaction between members of complex communities are shaping the susceptibility profile.

In nature, microbes co-exist in multi-species communities with ecological dynamics driven by the complex interaction between individual strains and the environment. Syntrophic interactions, whereby bacterial cells exchange costly metabolites for the benefit of both interacting partners, are pervasive in bacterial communities as they enhance bacterial survival in hostile environments.

Availability of resources affects the nature of the interactions between members of a microbial consortium [1]. These interactions can be determinants of the stability of the consortia. Based on two-pair interactions, there are typically three outcomes; cooperation where both members of the community are beneficial to the other one; competition where the presence of one member is detrimental to the other one and neutral interaction; where the members of the community have no interaction.

Typically competitive interactions end up in competitive exclusion, decreasing the diversity of the consortia. For syntrophic interactions, if the competition for resources is very strong, one community member's collapse could collapse the total population.

The effect of changes in interactions have on the control of antibiotic resistance is unknown. There are some examples where cooperation can help a community to survive in stressful environments [2]. We model a synthetic community composed of two different strains; both are auxotrophic to an amino acid, an essential metabolite. This condition makes them incapable of growing on their own in an environment without amino acids. In contrast, they can grow in a minimal media when they are together due to the leak of all the other amino acids from their partner [3]. Auxotroph cells are essential for natural communities [4], they shape the composition and can be determinant of the stability of a microbial community. For instance, they have been found in aquatic communities [5], microbial soil communities [6] and the human microbiome [7, 8]. Although auxotrophies could increase the dependence of individuals in the communities, they could also increase fitness by reducing the nutrient requirements of an environment, which means that a community could support growth in a poorer context.

In the past years, auxotrophic strains have been used to study metabolic cross-feeding interactions in particular environmental context [1, 9, 10]. Pair-wise interactions are useful to determine changes in the interaction and to study division of labor inside the community, such as public goods. A relevant example of public goods is the production of enzymes able to degrade antibiotics.

Cross-feeding interactions in natural environments are important to increase diversity in the population by decreasing the fitness of the individual and increasing the fitness of the community [11]. It has been shown that these interactions are dynamic and can change with respect to the environment. Auxotrophies are a particular example of this. It has also been shown that auxotrophic phenotypes appear very fast in a population growing in a rich nutrient environment [10]. This feature can be crucial in diverse communities, like the microbiota, particularly when an

antimicrobial is present, which disrupts the community members [4]. If auxotrophic phenotypes appear, having functional redundancies could help preserve general function in a community. For this reason, understanding what is the effect of an antimicrobial in a syntrophic consortium could be of great value.

This paper explores a population-based model and control theory to understand the effect of antimicrobials in microbial communities with syntrophic interactions and how the environment minimizes resistant bacteria in the system.

We first propose an optimal control problem based on Hoek et al. in [1] of an auxotrophic consortium of two bacteria competing for the same resources in the presence of a gradient of antibiotic. Then we described our experimental data and performed numerical experiments. Finally, using Bayesian Inference, we estimate some interesting mathematical model parameters using our experimental data. Numerical experiments validate all theoretical results.

2. Optimal control formulation

In order to better understand the different types of interaction between cross-feeding bacteria, we formulate a similar mathematical model to the proposed by Hoek et al. In [1], two strains of yeast, one auxotrophic to tryptophan (*trp*-) and the other auxotrophic to leucine (*leu*-) interact in an environment with different resource availability. In this formulation, we assume that strain *trp*- (X) and strain *leu*- (Y) are divided into susceptible and resistant bacteria (X_s , X_r and Y_s , Y_r , respectively). We assume both strains interact with a bacterial infection in an individual's body. We are interested in modeling the dynamics of bacterial resistance acquisition through antimicrobial resistance induced by antibiotic-mediated selection. Thus, the following hypothesis is considered for the strain X (similar assumptions can be considered for the strain Y): sensitive bacteria grows at a rate proportional to resistant bacteria (if a is the growth rate of sensitive bacteria, then $a\bar{\gamma}_x$ is the growth rate of resistant bacteria) following the logistic equation with a carrying capacity K . \bar{F} is the amount of supplemented amino acids, \bar{k} represents an effective Monod constant, and β is a parameter that quantifies the asymmetry of benefit that each bacteria receives from its partner. The density of sensitive bacteria become resistant by antibiotic-mediated selection is given through the term $\epsilon q\lambda X_s$, where ϵ is the efficacy of the antimicrobial, λ is the antimicrobial supply rate, q is the proportion of mutation (therefore $(1-q)$ represents the proportion of elimination). Both population turnover at a constant dilution rate $\bar{\delta}$. Thus, the per capita growth rate of both bacteria is adjusted by the mutualistic partner as well as the supplemented amino acids:

$$\begin{aligned}
 \dot{X}_s &= \bar{\gamma}_x(X_s + X_r) \left(\frac{Y_s + Y_r + \bar{F}}{Y_s + Y_r + \bar{F} + \bar{k}} \right) \left(1 - \frac{X_s + X_r + Y_s + Y_r}{K} \right) - \epsilon q\lambda X_s - \epsilon(1-q)\lambda X_s - \bar{\delta}X_s \\
 \dot{X}_r &= a\bar{\gamma}_x(X_s + X_r) \left(\frac{Y_s + Y_r + \bar{F}}{Y_s + Y_r + \bar{F} + \bar{k}} \right) \left(1 - \frac{X_s + X_r + Y_s + Y_r}{K} \right) + \epsilon q\lambda X_s - \bar{\delta}X_r \\
 \dot{Y}_s &= \bar{\gamma}_y(Y_s + Y_r) \left(\frac{\beta(X_s + X_r) + \bar{F}}{\beta(X_s + X_r) + \bar{F} + \bar{k}} \right) \left(1 - \frac{X_s + X_r + Y_s + Y_r}{K} \right) - \epsilon q\lambda Y_s - \epsilon(1-q)\lambda Y_s - \bar{\delta}Y_s \\
 \dot{Y}_r &= a\bar{\gamma}_y(Y_s + Y_r) \left(\frac{\beta(X_s + X_r) + \bar{F}}{\beta(X_s + X_r) + \bar{F} + \bar{k}} \right) \left(1 - \frac{X_s + X_r + Y_s + Y_r}{K} \right) + \epsilon q\lambda Y_s - \bar{\delta}Y_r.
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

A complete description of the parameters involved in Model (2.1) can be found on Table 1.

Table 1. Definition and dimension of the parameters involved in Model (2.1).

Parameter	Definition	Unit
a	Cost of the resistance	Dimensionless
$\bar{\gamma}_x$	Growth rate of strain X	1/time
$\bar{\gamma}_y$	Growth rate of strain Y	1/time
β	Asymmetry constant	Dimensionless
\bar{F}	Amount of supplementary amino acid	Population
$\bar{\kappa}$	Monod constant	Population
ϵ	Antimicrobial efficacy	1/time
λ	Supply concentration of the antimicrobial	Dimensionless
q	Mutation proportion	Dimensionless
$\bar{\delta}$	Dilution rate	1/time
K	Carry capacity	Dimensionless

Now, we define $\boldsymbol{\mu} = (\mu_1(t), \mu_2(t))$ as a control variable associated with the mutations. Thus, both strains of susceptible bacteria mutate at a rate $(1 - \mu_1(t))\epsilon q \lambda X_s$ and $(1 - \mu_2(t))\epsilon q \lambda Y_s$, respectively, where for $i = 1, 2$, $\mu_i(t) \in [0, 1]$ ($\mu_i = 0$ represents no efficacy of the control, while $\mu_i = 1$ indicates that the use of the control is completely effective). Thus, we have that each control variable $\mu_i(t)$ provides information about the amount of bacteria that must not mutate at time t . To minimize the number of resistant bacteria, we define the cost function:

$$J[\boldsymbol{\mu}] = \int_0^T \left(\bar{c}_1 X_r + \bar{c}_2 Y_r + \frac{1}{2} \mu_1(t)^2 + d_2 \frac{1}{2} \mu_2(t)^2 \right) dt,$$

where the parameters c_1 and c_2 represent social cost and the parameters d_1 and d_2 represent relative weights associated to the controls. Additionally, we define the boundary conditions:

$$\mathbf{X}(0) = (X_{s_0}, X_{r_0}, Y_{s_0}, Y_{r_0}) = \mathbf{X}_0$$

$$\mathbf{X}(T) = (X_{s_f}, X_{r_f}, Y_{s_f}, Y_{r_f}) = \mathbf{X}_f,$$

and we assume that the final time T is a fixed implementation time of the control strategies, the final state \mathbf{X}_f is variable, and the initial state \mathbf{X}_0 is a coexistence equilibrium of System (2.1). We suppose that each control is in the set of Lebesgue measurable functions with $0 \leq \mu(t) \leq 1$, $t \in [0, T]$ (\mathcal{U} called the set of admissible controls).

Let us define ω as a rescaling parameter with dimension $1/\text{population} \times \text{time}$. To obtain a dimensionless formulation of System (2.1), the state variables have been divided by the carrying capacity of the environment, the parameters and the time have also been adjusted to be dimensionless as follows

$$S_x = \frac{X_s}{K}, R_x = \frac{X_r}{K}, S_y = \frac{Y_s}{K}, R_y = \frac{Y_r}{K} \text{ and } \tau = \omega K t,$$

and

$$c_1 = \frac{\bar{c}_1}{K}, c_2 = \frac{\bar{c}_2}{K}, F = \frac{\bar{F}}{K}, \kappa = \frac{\bar{\kappa}}{K}, \gamma_x = \frac{\bar{\gamma}_x}{\omega K}, \gamma_y = \frac{\bar{\gamma}_y}{\omega K}, c = \frac{\epsilon \lambda}{\omega K} \text{ and } \delta = \frac{\bar{\delta}}{\omega K}.$$

Thus, our optimal control problem can be written in the following dimensionless form

$$\left\{ \begin{array}{l} \min J[\boldsymbol{\mu}] = \int_0^T \left(c_1 R_x + c_2 R_y + d_1 \frac{1}{2} \mu_1(t)^2 + d_2 \frac{1}{2} \mu_2(t)^2 \right) dt \\ \frac{dS_x}{d\tau} = \gamma_x(S_x + R_x) \left(\frac{S_y + R_y + F}{S_y + R_y + F + \kappa} \right) \left[1 - (S_x + R_x + S_y + R_y) \right] - (1 - \mu_1(t))qcS_x - (1 - q)cS_x - \delta S_x \\ \frac{dR_x}{d\tau} = a\gamma_x(S_x + R_x) \left(\frac{S_y + R_y + F}{S_y + R_y + F + \kappa} \right) \left[1 - (S_x + R_x + S_y + R_y) \right] + (1 - \mu_1(t))qcS_x - \delta R_x \\ \frac{dS_y}{d\tau} = \gamma_y(S_y + R_y) \left(\frac{\beta(S_x + R_x) + F}{\beta(S_x + R_x) + F + \kappa} \right) \left[1 - (S_x + R_x + S_y + R_y) \right] - (1 - \mu_2(t))qcS_y - (1 - q)cS_y - \delta S_y \\ \frac{dR_y}{d\tau} = a\gamma_y(S_y + R_y) \left(\frac{\beta(S_x + R_x) + F}{\beta(S_x + R_x) + F + \kappa} \right) \left[1 - (S_x + R_x + S_y + R_y) \right] + (1 - \mu_2(t))qcS_y - \delta R_y \\ \mathbf{X}(0) = (S_{x_0}, R_{x_0}, S_{y_0}, R_{y_0}) = \mathbf{X}_0 \\ \mathbf{X}(T) = (S_{x_f}, R_{x_f}, S_{y_f}, R_{y_f}) = \mathbf{X}_f. \end{array} \right. \quad (2.2)$$

2.1. Theoretical results

Let us set as $\mathbf{X} = (S_x, R_x, S_y, R_y)$ the vector of states, $\mathbf{Z} = (z_1, z_2, z_3, z_4)$ the vector of adjoint variables and $f_0(t, \mathbf{X}, \boldsymbol{\mu})$ the integrand of the cost function. We will use the Pontryagin principle for bounded controls to compute the optimal control of Problem (2.2). First of all, following the classical results given in the references [12, 13] it is easy to verify the existence of optimal controls (it is enough to check that the properties (i)–(iii) of Section 3.4 from reference [14] are fulfilled). Now, the Hamiltonian H associated with the Problem (2.2) is defined by $H(t, \mathbf{X}(t), \boldsymbol{\mu}(t), \mathbf{Z}(t)) = f_0(t, \mathbf{X}, \boldsymbol{\mu}) + \mathbf{Z}(t) \cdot f(\mathbf{X}, t, \boldsymbol{\mu})$, that is

$$\begin{aligned} H = & c_1 R_x + c_2 R_y + d_1 \frac{1}{2} \mu_1^2 + d_2 \frac{1}{2} \mu_2^2 + \\ & z_1 \left[\gamma_x(S_x + R_x) \left(\frac{S_y + R_y + F}{S_y + R_y + F + \kappa} \right) \left[1 - (S_x + R_x + S_y + R_y) \right] - (1 - \mu_1)qcS_x - (1 - q)cS_x - \delta S_x \right] + \\ & z_2 \left[a\gamma_x(S_x + R_x) \left(\frac{S_y + R_y + F}{S_y + R_y + F + \kappa} \right) \left[1 - (S_x + R_x + S_y + R_y) \right] + (1 - \mu_1)qcS_x - \delta R_x \right] + \\ & z_3 \left[\gamma_y(S_y + R_y) \left(\frac{\beta(S_x + R_x) + F}{\beta(S_x + R_x) + F + \kappa} \right) \left[1 - (S_x + R_x + S_y + R_y) \right] - (1 - \mu_2)qcS_y - (1 - q)cS_y - \delta S_y \right] + \\ & z_4 \left[a\gamma_y(S_y + R_y) \left(\frac{\beta(S_x + R_x) + F}{\beta(S_x + R_x) + F + \kappa} \right) \left[1 - (S_x + R_x + S_y + R_y) \right] + (1 - \mu_2)qcS_y - \delta R_y \right]. \end{aligned} \quad (2.3)$$

The adjoint system and state equations define the optimal system. The following theorem summarizes the main result of this section.

Theorem 2.1. *There is an optimal solution $X^*(t)$ that minimize $J[\mu]$ in $[0, T]$. Moreover, there exists a vector of adjoint variables Z such that*

$$\begin{aligned} \dot{z}_1 = & \gamma_x \left(\frac{(S_y + R_y + F)(-1 + 2S_x + S_y + 2R_x + R_y)}{(S_y + R_y + F + \kappa)} \right) (z_1 + az_2)c \\ & + \gamma_y \left(\frac{F^2 + F\kappa - \beta\kappa + \beta(\beta R_x^2 + \kappa R_y + 2R_x(F + \kappa + \beta S_x))}{(\beta(S_x + R_x) + F + \kappa)^2} \right) (z_3 + az_4) \\ & + \gamma_y \left(\frac{S_x(2(F + \kappa) + \beta S_x) + \kappa S_y(S_y + R_y)}{(\beta(S_x + R_x) + F + \kappa)^2} \right) (z_3 + az_4) \\ & + cq\mu_1(z_2 - z_1) - c(qz_2 - z_1) + \delta z_1 \\ \dot{z}_2 = & \gamma_x \left(\frac{(S_y + R_y + F)(-1 + 2S_x + S_y + 2R_x + R_y)}{(S_y + R_y + F + \kappa)} \right) (z_1 + az_2) \\ & + \gamma_y \left(\frac{F^2 + F\kappa - \beta\kappa + \beta(\beta R_x^2 + \kappa R_y + 2R_x(F + \kappa + \beta S_x))}{(\beta(S_x + R_x) + F + \kappa)^2} \right) (z_3 + az_4) \\ & + \gamma_y \left(\frac{S_x(2(F + \kappa) + \beta S_x) + \kappa S_y(S_y + R_y)}{(\beta(S_x + R_x) + F + \kappa)^2} \right) (z_3 + az_4) \\ & - c_1 + \delta z_2 \\ \dot{z}_3 = & \gamma_y \left(\frac{(\beta(S_x + R_x) + F)(-1 + S_x + 2S_y + R_x + 2R_y)}{(\beta(S_x + R_x) + F + \kappa)} \right) (z_3 + az_4) \\ & + \gamma_x \left(\frac{F^2 + (-1 + F)\kappa + \kappa R_x + R_y^2 + \kappa S_x + 2(F + \kappa)S_y}{(S_y + R_y + F + \kappa)^2} \right) (z_1 + az_2) \\ & + \gamma_x \left(\frac{S_y^2 + 2R_y(F + \kappa + S_y)(S_y + R_y)}{(S_y + R_y + F + \kappa)^2} \right) (z_1 + az_2) \\ & + cq\mu_2(z_4 - z_3) - c(qz_4 - z_3) + \delta z_3 \\ \dot{z}_4 = & \gamma_y \left(\frac{(\beta(S_x + R_x) + F)(-1 + S_x + 2S_y + R_x + 2R_y)}{(\beta(S_x + R_x) + F + \kappa)} \right) (z_3 + az_4) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& + \gamma_x \left(\frac{F^2 + (-1 + F)\kappa + \kappa R_x + R_y^2 + \kappa S_x + 2(F + \kappa)S_y}{(S_y + R_y + F + \kappa)^2} \right) (z_1 + az_2) \\
& + \gamma_x \left(\frac{S_y^2 + 2R_y(F + \kappa + S_y)(S_y + R_y)}{(S_y + R_y + F + \kappa)^2} \right) (z_1 + az_2) \\
& - c_2 + \delta z_4,
\end{aligned} \tag{2.4}$$

with transversality condition $z_i(t) = 0$ for $i = 1, 2, 3, 4$ which satisfies:

$$\begin{aligned}
\mu_1^* &= \frac{qcS_x(z_2 - z_1)}{d_1} \\
\mu_2^* &= \frac{qcS_y(z_4 - z_3)}{d_2}.
\end{aligned} \tag{2.5}$$

To see a detailed proof of the previous theorem see Appendix A.

3. Experimental data

We used *Escherichia coli* strains from the Keio collection containing either $\Delta ilvA$ or $\Delta tyrA$ deletions [15], each strain was transformed with the plasmid pBGT-1 [16] carrying blaTEM-1 gene that confers resistance to ampicillin and a GFP fluorescent marker inducible with arabinose, pBGT-1 is a non-conjugative plasmid with around 20 copies in average per cell. Strains were grown in LB medium (Lysogeny Broth) with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of kanamycin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ampicillin (for those with plasmid) at 30°C for 16 hours after incubation strains were washed with M9 salts and re-suspended in M9 minimal medium supplemented with glucose.

To measure susceptibility to the antimicrobial, we performed dose-response experiments in 96-well plates. The ampicillin concentrations used were 0, 6, 15, 36, 89, 220, 540, 1326, 3257 and 8000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, each well was inoculated with 20 μL of clean cells for a total of 200 μL per well and incubated in an ELx808 plate reader at 30°C with continuous shaking, OD630 was measured every 20 minutes for 24 hours, data not shown.

Co-cultures were performed in 96-well plates with 180 μL of LB media with 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ampicillin, and 20 μL of cells with 80% of susceptible cells ($\Delta ilvA$ or $\Delta tyrA$) and 20% of resistant cells ($\Delta tyrA$ -pBGT or $\Delta ilvA$ -pBGT). Two equal plates were grown in a ELx808 plate reader at 30°C with eight replicates for condition in each plate, OD630 was measured every 20 minutes for 24 hours, one plate was used for growth rate analysis, and the second one was used to measure colony forming units (CFU), relative abundance and cell viability, every 2 hours we collected one of the replicates of the second plate and divided the sample, as we had to open the well, this procedure was destructive to the sample, to have sampled every 2 hours, we completely used one of the plates, the other one was kept in the plate reader.

For relative abundance and cell viability, one replicate was collected every 2 hours and supplemented with 20 μL of arabinose (0.5%), incubated at 30°C for 4 hours, and stored at 4°C for

one day to induce GFP fluorescence. After storage, 100 μL of each sample was frozen, 5 μL from a 1:1000 dilution were incubated for 2 days at 30°C in selective agar with M9 minimal media, supplemented with 10.9 mg/L isoleucine and 7.15 mg/L tyrosine and 0.5% of arabinose for CFU counting, the rest of the sample was used to measured abundance of resistant cells using a CytoFLEX S cytometer (20,000 events per sample).

For experimental data, we performed 16 replicas in total, 8 were kept at a plate reader to measure OD shown in Figure 1A, the other eight replicas were used to measured abundance of cells and viability, the experimental data measured in the flux cytometer every 2 hours splitting resistance and susceptible bacteria are shown in Figure 1B.

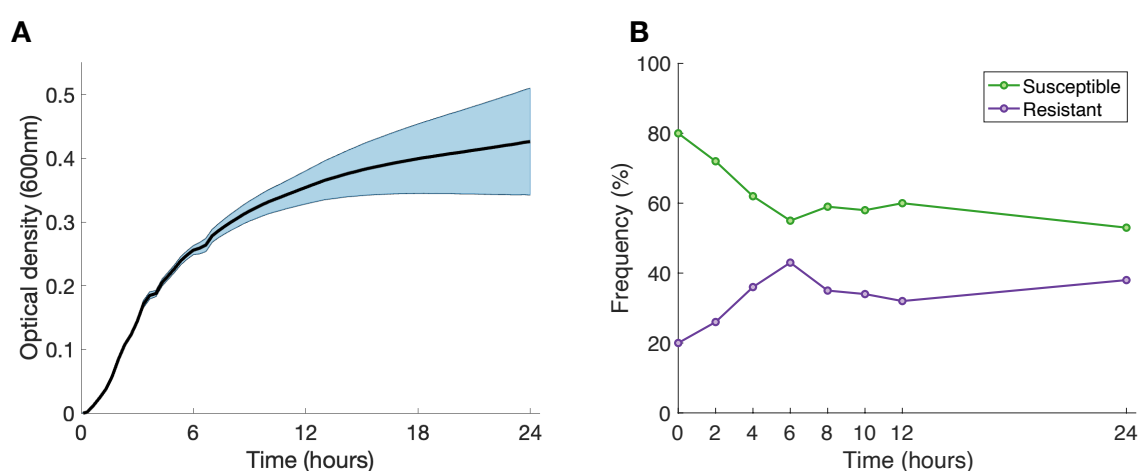


Figure 1. Experimental data from co-cultures of cells with 80% of susceptible cells ($\Delta ilvA$ or $\Delta tyrA$) and 20% of resistant cells ($\Delta tyrA$ -pBGT or $\Delta ilvA$ -pBGT) grown in LB media with 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ampicillin (low concentration). In **A** we showed the optical density of eight replicas of the co-culture in 24 hours, solid line represent the average of the 8 replicas and shadows showed standard error for each data point, measurements taken every 20 minutes. **B** shows the frequency of susceptible and resistant bacteria, dots represents data point every 2 hours measured in the flux cytometer, all data processed with Matlab.

4. Numerical simulations

In order to performed the optimal control numerical experiments, we used the *Backward-Forward Sweep Method* described on Lenhart et al. [13] in Matlab interface, and also we used our experimental data given in Section 3 and some data collected in the reference [1], from two non-mating budding yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* that were designed to be deficient in the biosynthesis of an essential amino acid and also to overproduce the amino acid required by the ir partner. In such

laboratory experiments, the auxotrophic strain of leucine (*leu-*) overproduces tryptophan, while the auxotrophic strain of tryptophan (*trp-*) overproduces leucine. According to reference [1], these strains have previously been shown to form a cross-feeding mutualism when grown on solid agar, with each strain losing the amino acid needed by its partner. We assume that the carrying capacity $K = 0.1 \times 10^6$ and the temporal value is $\omega = 0.3 \times 10^{-5}$. The values of the other parameters taken in this study are given in Table 2.

Table 2. Values of the parameters involved in Models (2.1) and (2.2). Some of them were taken from the reference [1], whereas other from our experimental data.

Parameter	Dimensional model	Dimensionless model
Growth rate of bacteria X	0.3	1
Growth rate of bacteria Y	0.288	0.96
Asymmetry constant	2	2
Dilution rate	0.15	0.5
Monod constant	12,000	0.12
Cost of resistance	0.01	0.01
Antimicrobial concentration	$\lambda = 10$	$c = 16.67$
Antimicrobial efficacy	$\epsilon = 0.5$	

In these experiments we consider that the amount of supplementary amino acids and the proportion of mutations are variables. The mutation portion (q) values used were 0.1, 0.5 and 0.9, parameters for the amount of amino acids used are shown in Table 3.

Table 3. Values for the amount of supplementary amino acids.

Dimensional model (\bar{F})	Dimensionless model (F)
1000	0.01
5000	0.05
150,000	1.5

In Figure 2 we show some numerical experiments of sensitive bacteria (X and Y) of Model (2.2), when there are no antimicrobials, for different values of F . From this figure, we can see that when F is small enough ($F = 0.01$) there is the extinction of both strains. When F grows ($F = 0.05$) there is cooperation or mutualism between both strains, whereas, for large values of F (1.5), there is competition between both strains, being evident in the increase in the strain X and the extinction of the strain Y .

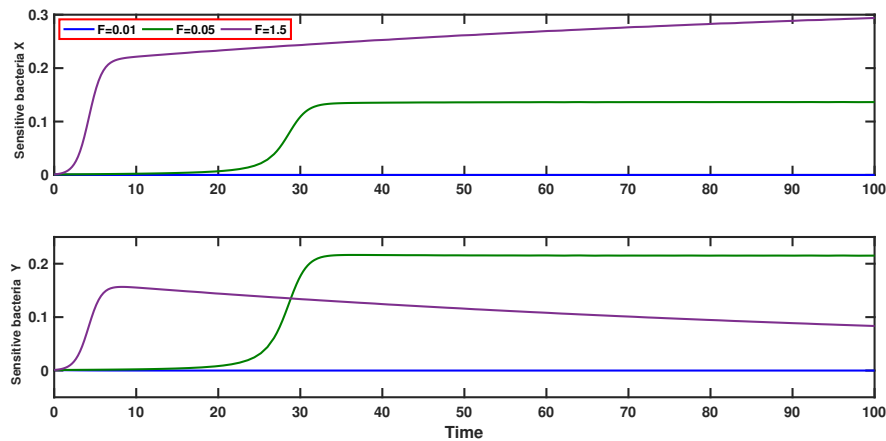


Figure 2. Simulations of sensitive strains X and Y of Model (2.2), when there are no antimicrobials, for different values of supplementary amino acids (F). When F is small, there is extinction, when F grows, there is mutualism, whereas, for large values of F , there is competition.

In Figure 3, we supply antimicrobials in our system, we keep fixed the value of $F = 0.01$ (where the is the extinction of both bacteria), and vary the values of the mutation proportion q (0.1, 0.5 and 0.9). In this case, we can see that the sensitive strains tend to zero regardless of the value of q , whereas for large values of q , the resistant bacteria of both types (X and Y) increase in density at the beginning of the time.

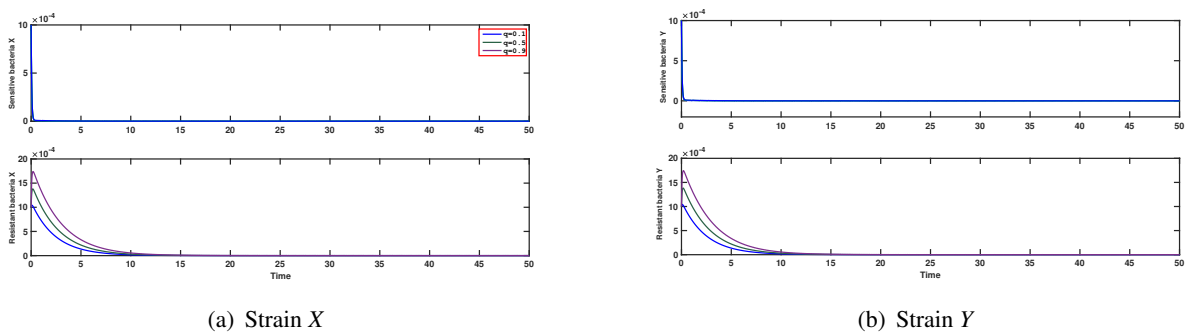


Figure 3. Simulations of the state equations of Model (2.2) for $F = 0.01$ and different values of q . Here, the sensitive strains tend to zero regardless of the value of q , whereas for large values of q , the resistant bacteria of both phenotypes increase in density at the beginning of the time.

A different scenario occurs for $F = 0.05$ (where there is cooperation between both strains), which can be evident in Figure 4. Here we can see that both strains become extinct only for small values of q ($q = 0.5$ or less), while if q increases (0.9), they coexist in density over time.

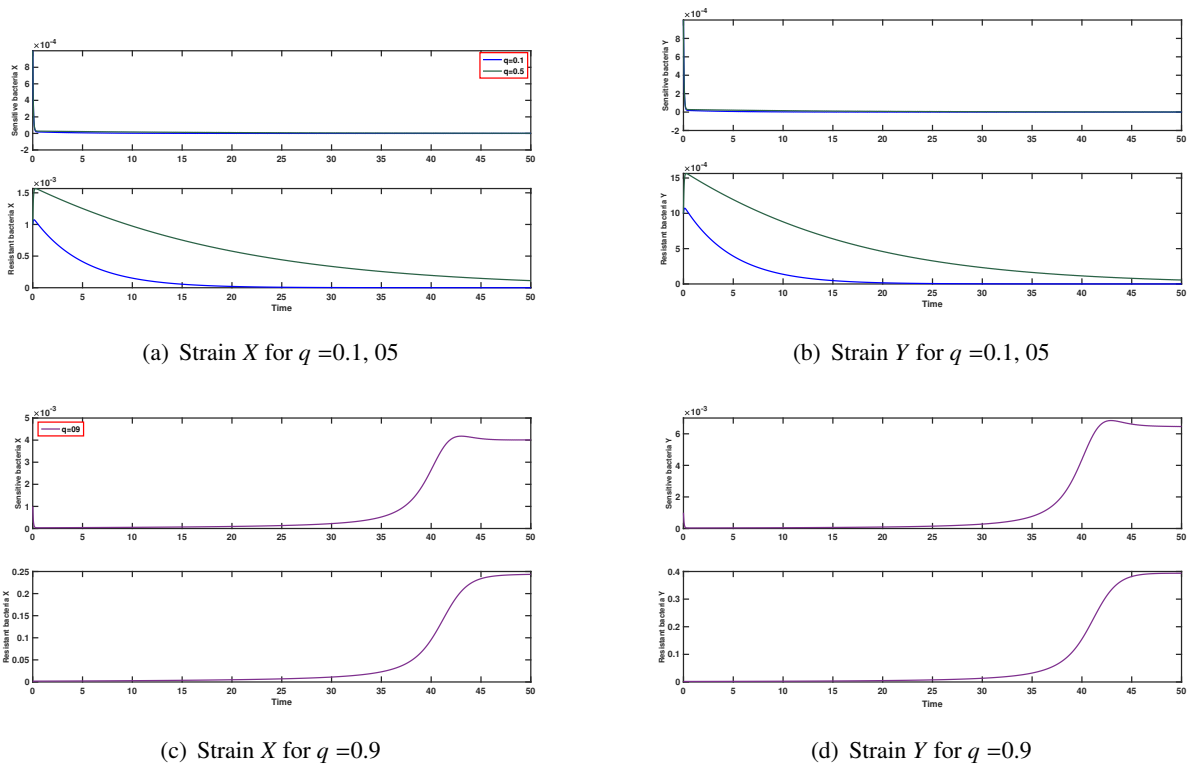


Figure 4. Simulations of the state equations of Model (2.2) for $F = 0.05$ and different values of q . Here, both strains become extinct only for small values of q ($q = 0.5$ or less), while if q increases, they coexist in density over time.

Finally, for $F = 1.5$ (see Figure 5), we can see that the strain Y decreases no matter what value of q is taken. On the other hand, the strain X stabilizes at increasing densities as the value of q changes.

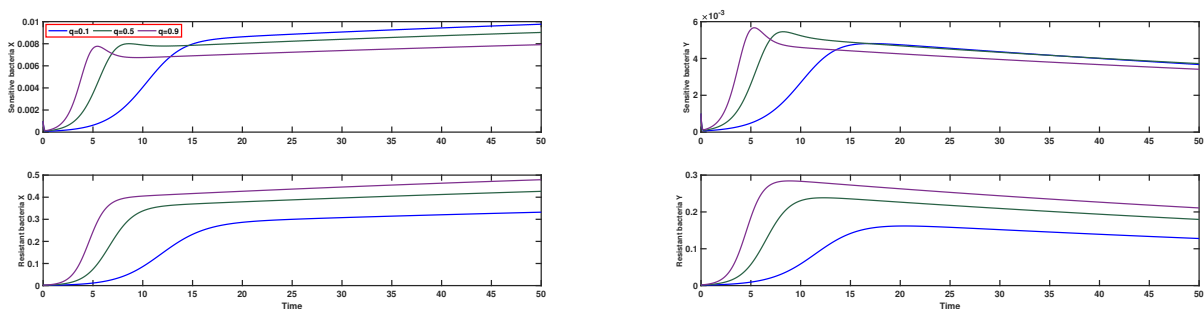


Figure 5. Simulations of the state equations of Model (2.2) for $F = 1.5$ and different values of q . The strain Y decreases no matter what value of q is taken. The strain X stabilizes at increasing densities as the value of q changes.

To observe the effect of controlling the antimicrobial resistance in the system where the strains X and Y interact in an environment with antimicrobials, we use the *Forward-Backward Sweep Method* proposed by Lenhart and Workman [13]. The values of the parameters associated with Problem (2.2) are shown in Table 4. We only introduce the control variables for the cases where there is a high

proportion of mutation ($q = 0.9$) and for the mutualism ($F = 0.05$) and competition ($F = 1.5$). In Figure 6 we show the results of control when $F = 0.05$ and $q = 0.9$ (where there is cooperation). In this case, with controls, both populations of bacteria are controlled immediately, maintaining the two controls at their maximum effort during the first 40 days and then rapidly decreasing to zero during the rest of the control campaign. In Figure 8 we show the results when $F = 1.5$ and $q = 0.9$ (when there is competition). Here, it can be seen that only the strain X is controlled from the first day of the campaign. But the strain Y increases with the control. The effort is only made for the first control at 100%, while the second control remains at zero throughout the campaign.

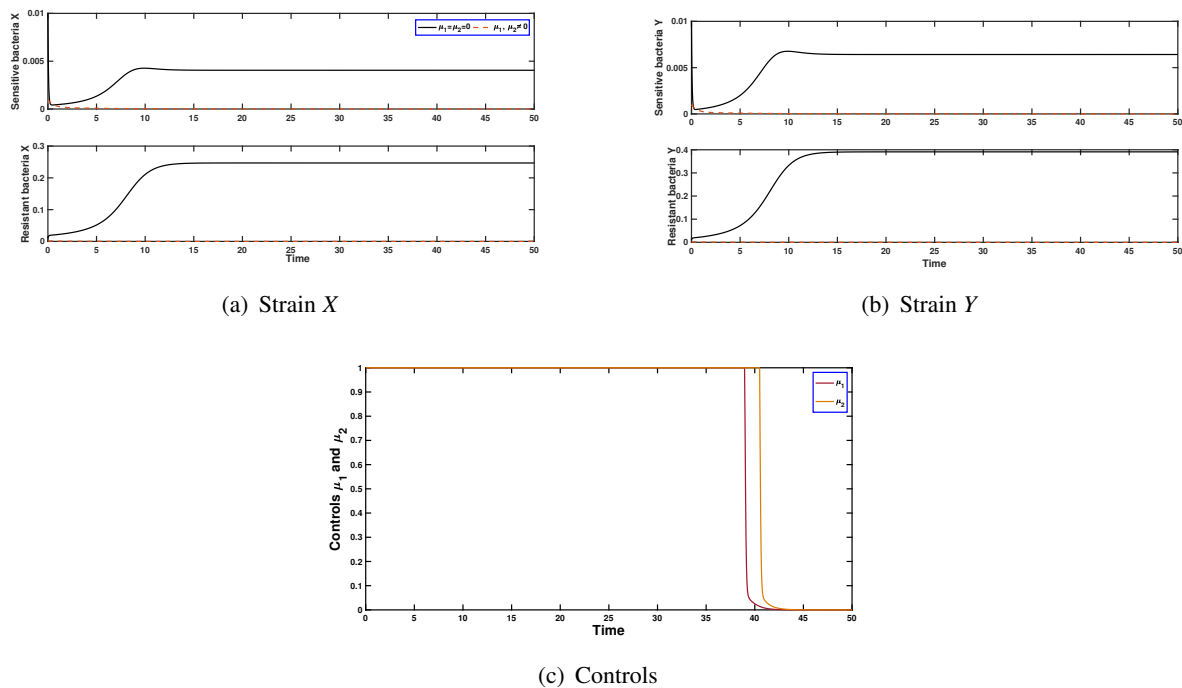


Figure 6. Simulations of the Optimal Control (2.2) under mutualism ($F = 0.05$ and $q = 0.9$). With controls, both bacteria are controlled immediately.

Table 4. Values of the parameters associated with the optimal control problem (2.2).

	Parameter	Value
Weights	d_1	0.0001
	d_2	0.0001
Social costs	c_1	0.001
	c_2	0.001

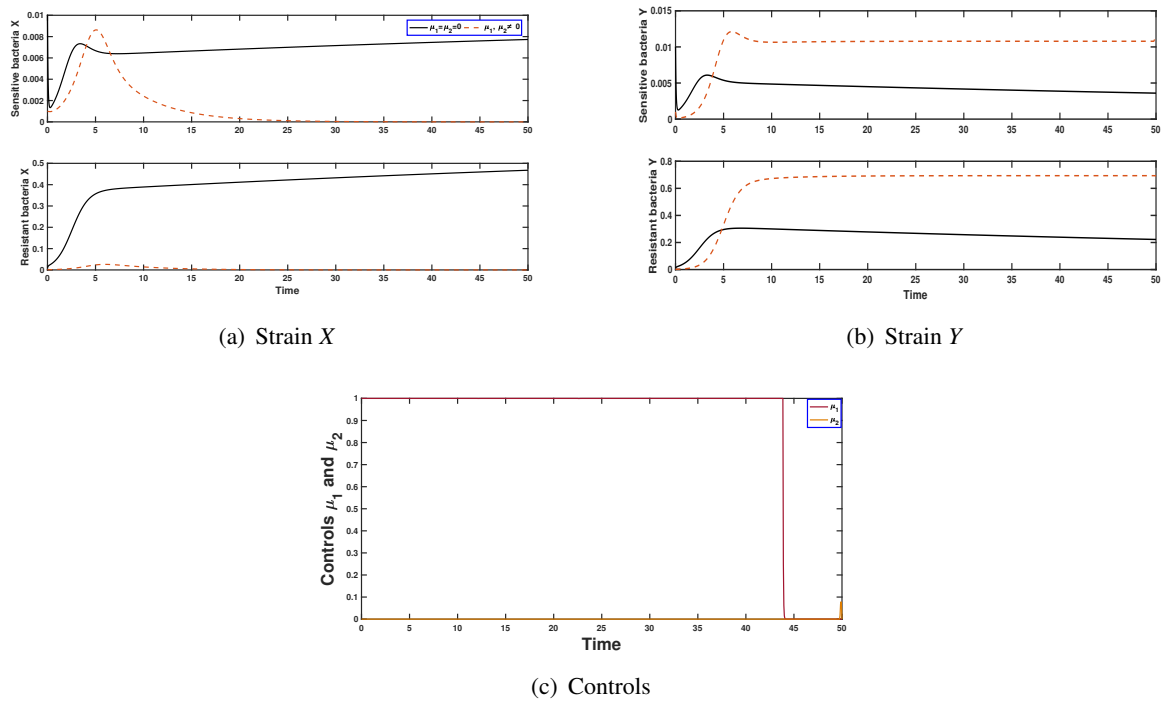


Figure 7. Simulations of the Optimal Control (2.2) under competition ($F = 1.5$ and $q = 0.9$). Only the strain X is controlled from the first day of the campaign. But the strain Y increases with the control.

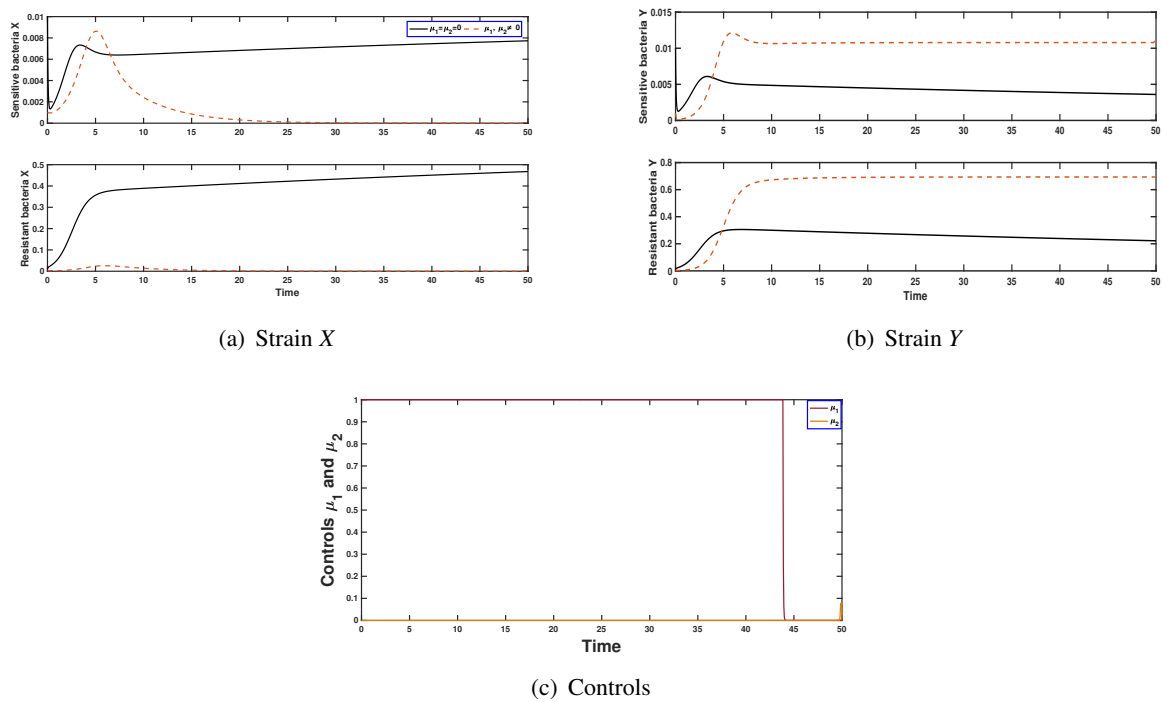


Figure 8. Simulations of the Optimal Control (2.2) under competition ($F = 1.5$ and $q = 0.9$). Only the strain X is controlled from the first day of the campaign. But the strain Y increases with the control.

5. Parameter estimation

For the parameter estimation of Model (2.1) we used the experimental data described in Section 3. To simplify notation, we will drop the bar symbol on the parameters from here. The experimental data is shown in Figure 9. Since the data size is very low, i.e., we have just six point for each time series of type of bacteria, we have implemented a re-sample with an interpolation for the values of odd hours in order to increase the data size. Specifically, we used a rich media called LB, and low ampicillin concentration. The values are described in Table 5.

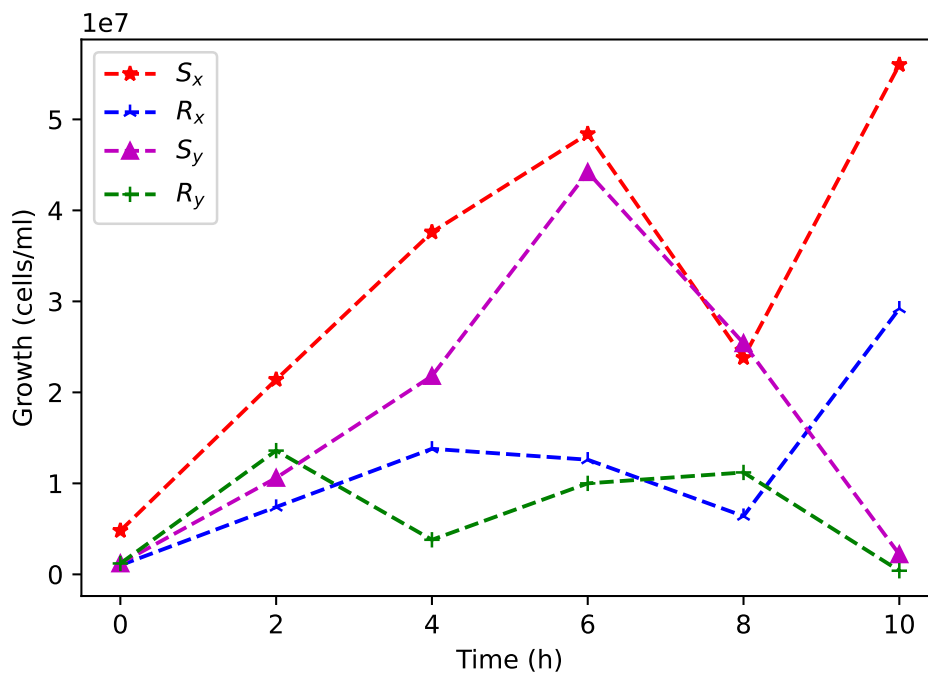


Figure 9. Experimental data: a rich media (LB) and low ampicillin concentration.

The fitting curve or estimation of the parameters of a model is considered an inverse problem. Some references of works using Bayesian inference are available in references [17–21]. Let $F : \mathbb{R}^m \rightarrow \mathbb{R}^{s \times k}$, denoted by $F(\theta)$ be the forward problem, where θ are the parameters of Model (2.1) to estimate, m the number of parameter to estimate, and k the number of state variables. The inverse problem is formulated as a standard optimization problem

$$\min_{\theta \in \mathbb{R}^m} \|F(\theta) - y_{\text{obs}}\|^2, \quad (5.1)$$

with y_{obs} . Given $y_{\text{obs}} = (\tilde{I}, \tilde{A})$, which correspond to strain *tyrA*- (X) and strain *ilvA*- (Y) are divided into susceptible and resistant bacteria (X_s, X_r and Y_s, Y_r , respectively), the conditional probability distribution $\pi(\theta|y_{\text{obs}})$, called the posterior distribution of θ is given by the Bayes' theorem:

$$\pi(\theta|y_{\text{obs}}) \propto \pi(y_{\text{obs}}|\theta)\pi(\theta). \quad (5.2)$$

All the available information regarding the unknown parameter θ is codified into the prior distribution $\pi(\theta)$, which specifies our belief in a parameter before observing the data. All the available information regarding the way of how was obtained the measured data is codified into the likelihood distribution $\pi(y_{\text{obs}}|\theta)$. This likelihood can be seen as an objective or cost function, as it punishes deviations of the model from the data. A Poisson distribution, $\mathcal{P}(y|\mu)$, with respect to the time, is typically used to account for the discrete nature of these counts, where μ is the mean of the random variable y , i.e., $\mathbb{E}[Y] = \mu$. We assume independent Poisson distributed noise η , i.e., all dependency in the data is codified into the model (2.1). In other words, the positive definite noise covariance matrix η is assumed to be diagonal. The posterior distribution $\pi(\theta|y_{\text{obs}})$ given by (5.2) does not have an analytical closed form since the likelihood function, which depends on the solution of the non-linear model (2.1), does not have an explicit solution. Then, we explore the posterior distribution using the Stan Statistics package [22]. We have used the Automatic Differentiation Variational Inference method (ADVI), which is based on the automatic variational inference algorithm. Specifically, we have used the Full-Rank submethod of ADVI. We have used the interface in Python (PyStan) [22], for more details see this Github link. Table 5 shows the posterior mean, quantiles of all estimated parameters of model (2.1). Table 6 shows the prior distributions summary of the estimated parameters of Model (2.1) using the experiment data set. Gamma distributions were used for parameters $\kappa, \gamma_x, \gamma_y$ and q . Uniform distribution were used for the initial conditions $S_{x_0}, R_{x_0}, S_{y_0}, R_{y_0}$. Figure 11 shows the joint probability density distributions of the estimated parameters within 95% (HPD) using the experimental data. The blue lines represent the medians. Figure 12 shows Model fit for sensitive and resistant bacteria of Model (2.1) using the experiment data. Blue and red dot points represent strain *ilvA* (X) data, i.e., the susceptible and resistant bacteria, called S_x and R_x , respectively. Orange and purple solid lines represent the median of posterior distribution of the sensitive and resistant bacteria (*ilvA-pBGT* (X)), respectively. Shaded area represent the 95% probability bands for the expected value of sensitive (orange line), resistant bacteria (blue line). Figure 13 shows Model fit for sensitive and resistant bacteria of the model (2.1) using the experiment data. Blue and red dot points represent strain *tyrA* (Y) data, i.e., the susceptible and resistant bacteria, called S_y and R_y , respectively. Orange and purple solid lines represent the median of the posterior distribution of the sensitive and resistant bacteria strain *tyrA-pBGT* (Y), respectively. Shaded area represent the 95% probability bands for the expected value of sensitive (orange line), resistant bacteria (blue line).

Table 5. Posterior mean and quantiles of all the estimated parameters of Model (2.1) using the experimental data described in Section 3.

Parameter	Mean	Std	Min	25%	50%	75%
κ	6332296.7333	107726.2128	5970880.0000	6257630.0000	6332720.0000	6407300.0000
γ_x	7.4709	0.0481	7.3150	7.4371	7.4713	7.5055
γ_y	5.9583	0.0909	5.6493	5.9035	5.9557	6.0205
q	0.0199	0.0008	0.0175	0.0194	0.0199	0.0205

Table 6. Prior distributions summary of the estimated parameters of model (2.1) using the experiment data set. Gamma distributions were used for parameters κ , γ_x , γ_y and q . Uniform distribution were used for the initial conditions S_{x_0} , R_{x_0} , S_{y_0} , R_{y_0} .

Parameter	Support	Prior distribution
κ	$[5 \times 10^3, 5 \times 10^7]$	Gamma, $a = 2.5, b = 1$
γ_x	$[0, 10]$	Gamma, $a = 2.5, b = 1$
γ_y	$[0, 10]$	Gamma, $a = 2.5, b = 1$
q	$[0, 0.2]$	Gamma, $a = 2.5, b = 1$
S_{x_0}	$[1 \times 10^5, 5 \times 10^7]$	Uniform
R_{x_0}	$[1 \times 10^5, 5 \times 10^7]$	Uniform
S_{y_0}	$[1 \times 10^5, 5 \times 10^7]$	Uniform
R_{y_0}	$[1 \times 10^5, 5 \times 10^7]$	Uniform

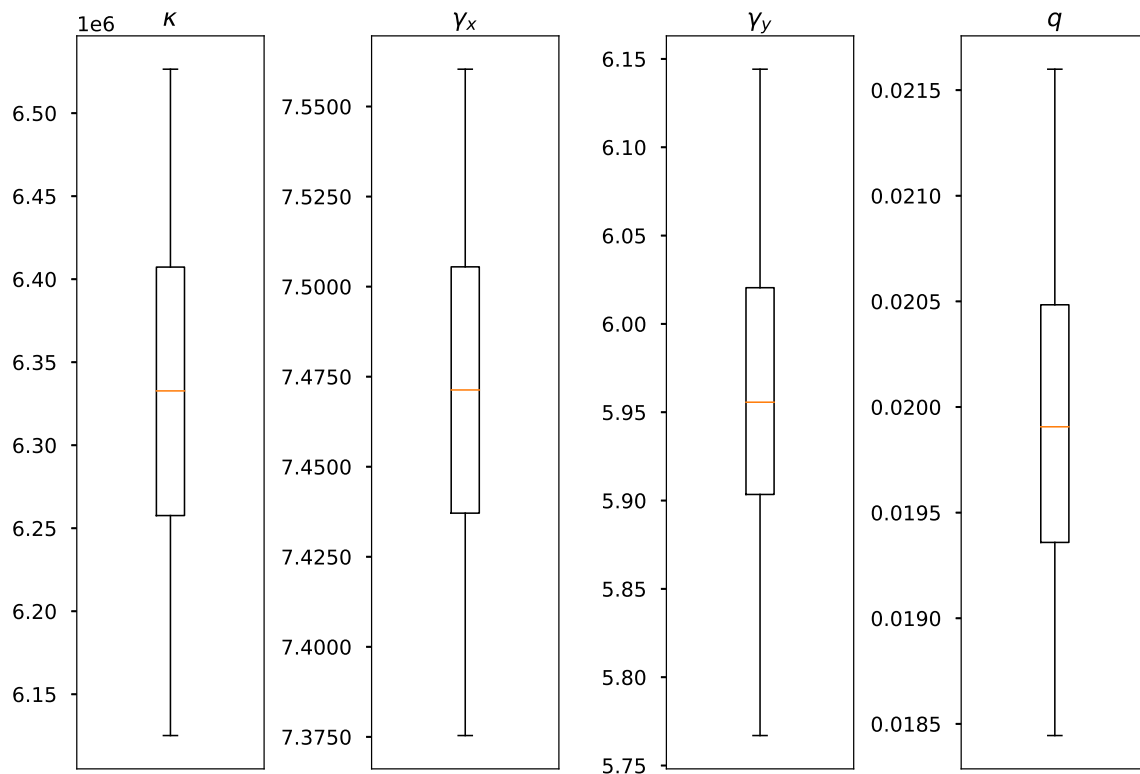


Figure 10. Credible intervals of the parameters of the model (2.1) within 95% Highest-Posterior Density (HPD).

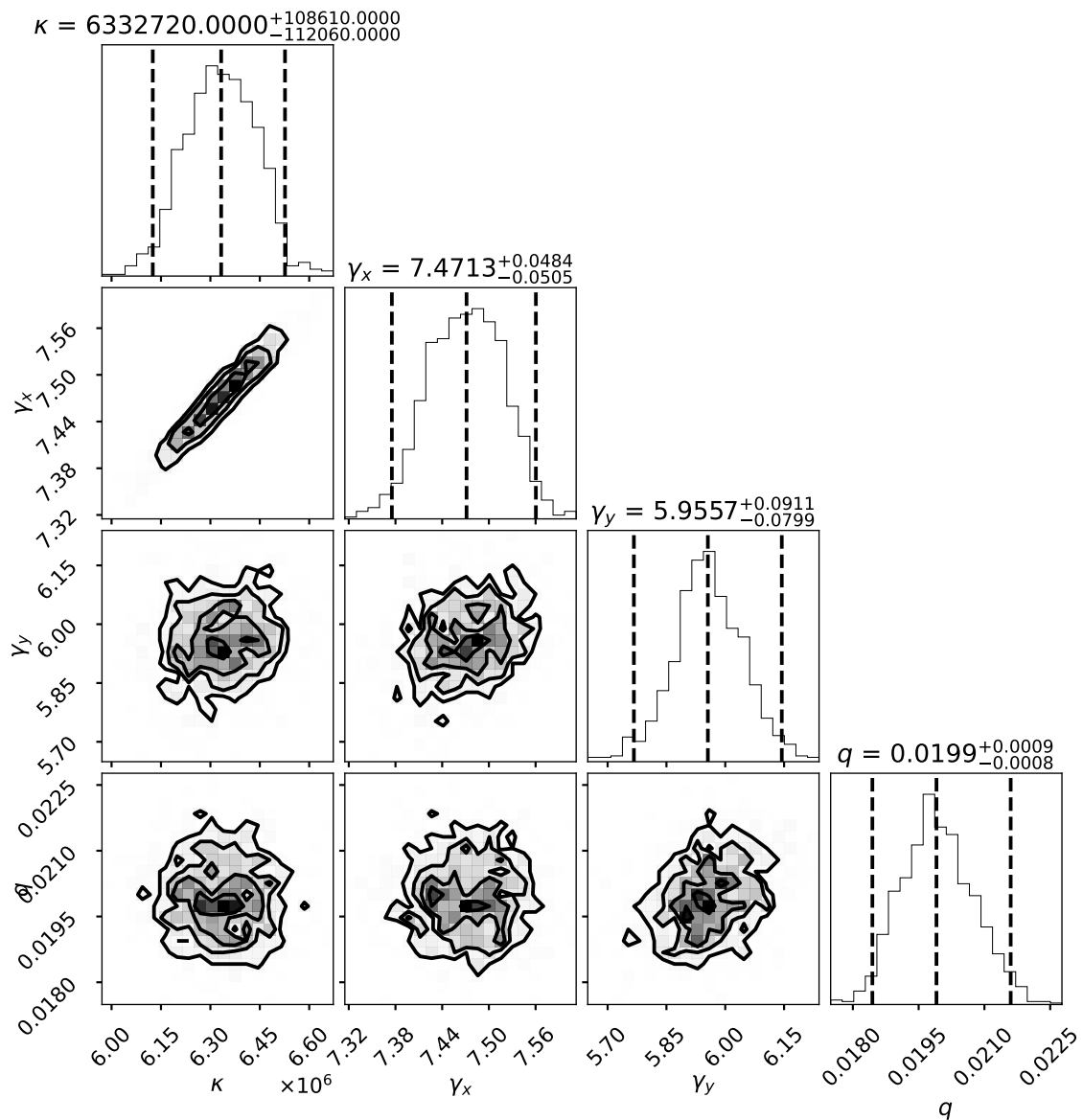


Figure 11. Joint probability density distributions of the estimated parameters within 95% (HPD) using the experimental data. The blue lines represent the medians.

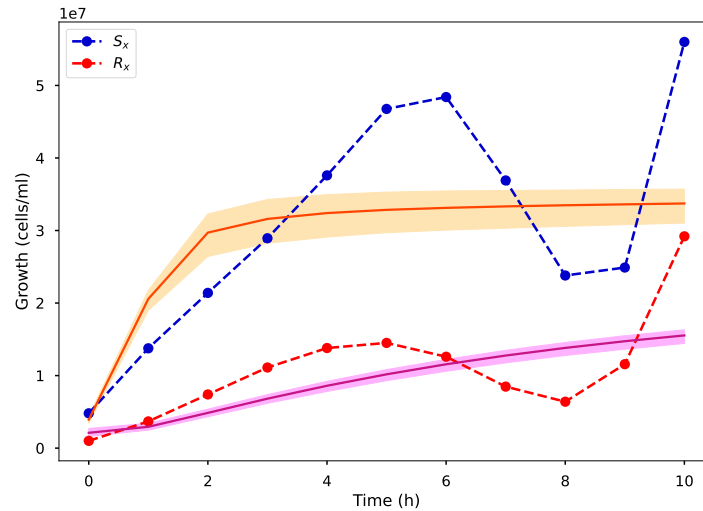


Figure 12. Model fit for sensitive and resistant bacteria of Model (2.1) using the experiment data. Blue and red dot points represent strain *ilvA* (X) data, i.e., the susceptible and resistant bacteria, called S_x and R_x , respectively. Orange and purple solid lines represent the median of the posterior distribution of the sensitive and resistant bacteria (*ilvA-pBGT* (X)), respectively. Shaded area represent the 95% probability bands for the expected value of sensitive (orange line), resistant bacteria (blue line).

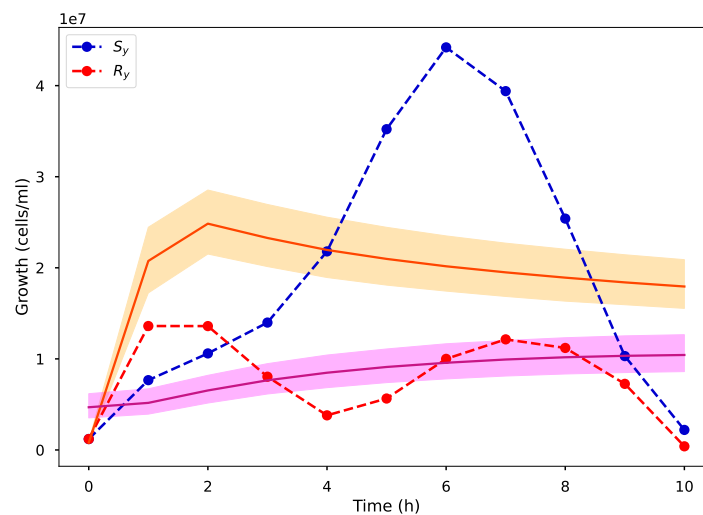


Figure 13. Model fit for sensitive and resistant bacteria of the model (2.1) using the experiment data. Blue and red dot points represent strain *tyrA* (Y) data, i.e., the susceptible and resistant bacteria, called S_y and R_y , respectively. Orange and purple solid lines represent the median of the posterior distribution of the sensitive and resistant bacteria strain *tyrA-pBGT* (Y), respectively. Shaded area represent the 95% probability bands for the expected value of sensitive (orange line), resistant bacteria (blue line).

6. Discussion

In this work, we attempted to explain the ecological interactions between cross-feeding bacteria in strains that supply an essential amino acid for their mutualistic partner when they are exposed to antimicrobials. Although from the ecological point of view, the microbial interaction can occur between multiple bacteria, for illustration and ease of handling mathematical equations, we considered the interaction between two bacteria. We formulated a mathematical model using ODEs assuming that both strains interact in an environment with different resources availability. We assumed both strains are divided into susceptible and resistant. After that, we estimated the most important parameters of the ODEs model using Bayesian Inference.

To validate our theoretical results with numerical experiments, we used our experimental data and other data available in the literature. More specifically, we used *Escherichia coli* strains from the Keio collection containing either $\Delta ilvA$ or $\Delta tyrA$ deletions, where each strain was transformed with a plasmid that confers resistance to ampicillin. For some parameters, we also used data from Hoek et al. in [1] of auxotrophic consortia of two microbes competing for the same resources.

The theoretical and numerical results showed that when the strains are free of the antimicrobial, depending on the amount of amino acids freely available in the environment, the strains can exhibit extinction, mutualism, or competition, the availability of resources modulates the behavior of both species. In contrast, if the strains are exposed to antimicrobials, the population dynamics depends on the proportion of bacteria that presents resistance to the antimicrobial, finding that for low levels of the resource, the two species become extinct, whereas, for high levels of the resource, competition between both strains is given.

The optimal control results showed that both strains (sensitive and resistant) are immediately controlled under cooperation, while under competition, only the density of one of the strains decreases, whereas its mutualist partner with control increases. Finally, the growth rates of both strains ($\bar{\gamma}_x$ and $\bar{\gamma}_y$), the Monod constant ($\bar{\kappa}$) the mutation proportion (q) and the initial conditions of Model (2.1) were estimated using Bayesian Inference and the data set described in Section 3. From Figures 12 and 13, we could observe that the fitting is not entirely accurate. This could be due to the lack of data and/or also because Model (2.1) should be adjusted.

The results obtained with this study corroborated that the antimicrobial resistance phenomenon is a complex problem worldwide that the scientific community has extensively studied. This problem is not only related to biological aspects of microorganisms but also other aspects, including socioeconomic and governance factors of countries [23]. Even, some authors claim that a novel approach to antibiotic discovery would be based on the analysis of microbial consortia in their ecological context (see [24, 25]). Others discuss the potential of microbial interactions to target and improve microbial dysbiosis as a strategy for the prevention or treatment of cancer [26]. Additionally, some of them affirm that exposure to sublethal concentrations of antimicrobials can indeed alter microbial metabolism and even change the behavior in beneficial ways, triggering reactions such as fleeing or hiding within the protective environment of a microbial aggregate [27].

Therefore, research questions are left open. A fundamental challenge will be to generate more laboratory experiments to obtain more data to allow better adjustments to the model, and probably adjust the model assuming additional hypotheses.

Acknowledgements

J. Romero thanks the support of Fundación Ceiba, Colombia. We thank A. San Millan for the plasmid p-BGT. D. Reyes-Gonzalez is a doctoral student in Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and received fellowship 572373 from CONACYT. A. Fuentes-Hernandez was funded by PAPIIT-UNAM (grant IN215920).

Conflict of interest

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

1. T. A. Hoek, K. Axelrod, T. Biancalani, E. A. Yurtsev, J. Liu, J. Gore, Resource availability modulates the cooperative and competitive nature of a microbial cross-feeding mutualism, *PLoS Biol.*, **14** (2016), e1002540. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002540>
2. E. Toby Kiers, T. M. Palmer, A. R. Ives, J. F. Bruno, J. L. Bronstein, Mutualisms in a changing world: an evolutionary perspective, *Ecol. Lett.*, **13** (2010), 1459–1474. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01538.x>
3. A. R. Figueiredo, R. Kümmerli, Microbial mutualism: Will you still need me, will you still feed me?, *Curr. Biol.*, **30** (2020), R1041–R1043. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.002>
4. K. Zengler, L. S. Zaramela, The social network of microorganisms - how auxotrophies shape complex communities, *Nat. Rev. Microbiol.*, **16** (2018), 383–390. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0004-5>
5. W. M. Johnson, H. Alexander, R. L. Bier, D. R. Miller, M. E. Muscarella, K. J. Pitz, et al., Auxotrophic interactions: a stabilizing attribute of aquatic microbial communities?, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **96** (2020), fiae115. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae115>
6. X. Jiang, C. Zerfaß, S. Feng, R. Eichmann, M. Asally, P. Schäfer, et al., Impact of spatial organization on a novel auxotrophic interaction among soil microbes, *ISME J.*, **12** (2018), 1443–1456. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0095-z>
7. X. Zhu, S. Campanaro, L. Treu, R. Seshadri, N. Ivanova, P. G. Kougias, et al., Metabolic dependencies govern microbial syntrophies during methanogenesis in an anaerobic digestion ecosystem, *Microbiome*, **8** (2020), 22. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0780-9>
8. A. E. Douglas, The microbial exometabolome: ecological resource and architect of microbial communities, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **375** (2020), 20190250. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0250>
9. A. Dal Co, C. Brannon, M. Ackermann, Division of labor in bacteria, *Elife*, **7** (2018), e38578. <https://doi.org/10.7554/eLife.38578>
10. G. D'Souza, C. Kost, Experimental evolution of metabolic dependency in bacteria, *PLoS Genet.*, **12** (2016), e1006364. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006364>

11. M. A. Henson, P. Phalak, Suboptimal community growth mediated through metabolite crossfeeding promotes species diversity in the gut microbiota, *PLoS Comput. Biol.*, **14** (2018), e1006558. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006558>
12. W. H. Fleming, R. W. Rishel, *Deterministic and stochastic optimal control*, Springer Science and Business Media, 2012.
13. S. Lenhart, J. T. Workman, *Optimal control applied to biological models*, Chapman and Hall/CRC, 2007.
14. H. Mena, L. M. Pfuerscheller, J. P. Romero-Leiton, Random perturbations in a mathematical model of bacterial resistance: Analysis and optimal control, *Math. Biosci. Eng.*, **17** (2020), 4477–4499, <https://doi.org/10.3934/mbe.2020247>
15. T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, et al., Construction of escherichia coli k-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the keio collection, *Mol. Syst. Biol.*, **2**, <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
16. A. San Millan, J. A. Escudero, D. R. Gifford, D. Mazel, R. C. MacLean, Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria, *Nat. Ecol. Evol.*, **1** (2016), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0010>
17. O. Stojanović, J. Leugering, G. Pipa, S. Ghozzi, A. Ullrich, A Bayesian Monte Carlo approach for predicting the spread of infectious diseases, *PLoS ONE*, **14** (2019), e0225838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225838>
18. T. Luzyanina, G. Bocharov, Markov chain Monte Carlo parameter estimation of the ODE compartmental cell growth model, *Math. Biol. Bioinform.*, **13** (2018), 376–391.
19. G. Brown, A. Porter, J. Oleson, J. Hinman, Approximate Bayesian computation for spatial SEIR(S) epidemic models, *Spat. Spatiotemporal Epidemiology*, **24** (2018), 2685–2697, <https://doi.org/10.1016/j.sste.2017.11.001>
20. E. Ibarguen-Mondragon, K. Prieto, S. Hidalgo-Bonilla, A model on bacterial resistance considering a generalized law of mass action for plasmid replication, *J. Biol. Syst.*, **29** (2021), 375–412. <https://doi.org/10.1142/S0218339021400118>
21. K. Prieto, J. P. Romero–Leiton, Current forecast of HIV/AIDS using Bayesian inference, *Nat. Resour. Model.*, **34** (2021), e12332, <https://doi.org/10.1111/nrm.12332>
22. B. Carpenter, A. Gelman, D. Hoffman, B. Goodrich, M. Betancourt, M. Brubaker, et al., Stan: A probabilistic programming language, *J. Stat. Softw.*, **76** (2017), 1–32. <https://doi.org/10.18637/jss.v076.i01>
23. J. Riaño-Moreno, J. P. Romero-Leiton, K. Prieto, Contribution of governance and socioeconomic factors to the *P. aeruginosa* MDR in Europe, *Antibiotics*, **11** (2022), 212. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020212>
24. T. Netzker, M. Flak, M. K. Krespach, M. C. Stroe, J. Weber, V. Schroeckh, et al., Microbial interactions trigger the production of antibiotics, *Curr. Opin. Microbiol.*, **45** (2018), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.002>
25. C. Zhang, P. D. Straight, Antibiotic discovery through microbial interactions, *Curr. Opin. Microbiol.*, **51** (2019), 64–71, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.06.006>

-
26. T. Van Raay, E. Allen-Vercoe, Microbial interactions and interventions in colorectal cancer, *Microbiol. Spectr.*, **5** (2017). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0004-2016>
 27. W. C. Ratcliff, R. F. Denison, Alternative actions for antibiotics, *Science*, **332** (2011), 547–548. <https://doi.org/10.1126/science.1205970>

Appendix A. Proof of Theorem 2.1

By the Pontryagin principle, we can guarantee the existence of adjoint variables z_i , $i = 1, 2, 3, 4$ that satisfy:

$$\begin{aligned} \dot{z}_i &= \frac{dz_i}{dt} = -\frac{\partial H}{\partial x_i} \\ z_i(T) &= 0, \quad i = 1, 2, 3, 4 \\ H(\mathbf{X}(t), \boldsymbol{\mu}^*(t), \mathbf{Z}(t), t) &= \max_{\boldsymbol{\mu} \in \mathcal{U}} H(\mathbf{X}(t), \boldsymbol{\mu}(t), \mathbf{Z}(t), t). \end{aligned}$$

From above, the adjoint system can be written as:

$$\begin{aligned} \dot{z}_1 &= -\frac{\partial H}{\partial S_x}, \quad z_1(T) = 0 & \dot{z}_3 &= -\frac{\partial H}{\partial S_y}, \quad z_3(T) = 0 \\ \dot{z}_2 &= -\frac{\partial H}{\partial R_x}, \quad z_2(T) = 0 & \dot{z}_4 &= -\frac{\partial H}{\partial R_y}, \quad z_4(T) = 0. \end{aligned}$$

By doing the respective calculations in the previous equations, we obtain System (2.4). Now, the optimality condition for the Hamiltonian is $\partial H / \partial \boldsymbol{\mu}^*$, or equivalently:

$$\begin{aligned} \frac{dH}{d\mu_1} &= qcS_x(z_1 - z_2) + d_1\mu_1 \\ \frac{dH}{d\mu_2} &= qcS_y(z_3 - z_4) + d_2\mu_2. \end{aligned}$$

From the above, we obtain the characterization given on (2.5). In consequence, μ_1^* satisfies:

$$\mu_1^* = \begin{cases} 1 & \text{if } \frac{qcS_x(z_2 - z_1)}{d_1} > 0 \\ \frac{qcS_x(z_2 - z_1)}{d_1} & \text{if } \frac{qcS_x(z_2 - z_1)}{d_1} \leq 1 \\ 0 & \text{if } \frac{qcS_x(z_2 - z_1)}{d_1} < 0, \end{cases}$$

or equivalently:

$$\mu_1^* = \min \left\{ \max \left\{ 0, \frac{qcS_x(z_2 - z_1)}{d_1} \right\}, 1 \right\}.$$

Similar calculations can be done for μ_2 , and then we obtain the characterization given on Eq (2.5) which completes the proof.



AIMS Press

©2022 the Author(s), licensee AIMS Press. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

BAFFLE: A 3D printable device for macroscopic quantification of fluorescent bacteria in space and time

Carles Tardío Pi¹, Daniela Reyes-González², Andrea Fernández-Duque¹,
Ayari Fuentes-Hernández², Fernando Santos-Escobar¹, and Rafael Peña-Miller^{1,*}

¹Laboratorio de Biología de Sistemas, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210, Cuernavaca, Mexico.

²Laboratorio de Biología Sintética, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210, Cuernavaca, Mexico.

*Corresponding author: rpm@ccg.unam.mx

Abstract

Despite the ubiquity and importance of microbial communities, understanding the population dynamics of mixed cultures in structured environments remains a fundamental problem in microbial ecology. Identifying bacterial strains within a complex microbial community represents a challenging technical problem. We describe a low-cost optomechanical device designed to acquire multi-channel time-lapse images of bacterial colonies growing in agar plates. This device uses a system of addressable LEDs and fluorescence filters to estimate the spatio-temporal distribution of different fluorescently-tagged cells from time-lapse images obtained using a standard DSLR camera with a macro lens. We demonstrate the potential of this device with a range of applications from experimental microbiology.

Metadata Overview

Main design files: <https://github.com/ccg-esb-lab/baffle>

Target group: school or academic staff, engineering and technical staff of charity associations, NGOs and scientific staff.

Skills required for building the device: 3D printing – intermediate; mechanical assembly – intermediate; electrical assembly – intermediate;

Replication: No builds known to the authors so far.

Keywords

microbiology; fluorescence imaging; macro photography

Introduction

An extensive collection of low-cost open-source imaging systems is nowadays available for microscopic image capture [37, 28, 29, 41]. These devices are developed following an open philosophy, and therefore code and hardware design are openly shared so that a broader range of researchers can build, modify, and improve existing projects [9]. However, only a narrow range of such devices is oriented towards the acquisition of systematic spatio-temporal information within the macroscopic cellular scale between millimeter to centimeter range [12], an arena in which bacterial spatial structure manifests itself and becomes relevant due, for example, to biofilm structure formation during colony growth [19].

*BAFFLE acronym stands for "Bionic Apparatus For Fluorescent Light Estimation" and it was coined in relation to the first version of the device encased inside a wooden speaker box.

27 In this manuscript, we detail the construction, assembly, and operational guide of a tunable low-cost and
 28 open-source programmable imaging system established for *in vivo* multi-fluorescence macro-photography
 29 capture of Petri dish cultures under controlled environmental conditions. As illustrated in [Figure 1](#),
 30 the design is modular with a temperature and humidity controlled incubator chamber combined with
 31 a customizable mechanical switching 4 fluorescent exciter and filter wheel coupled to a macro-camera
 32 with controlled focus through a z-axis step motor. Moreover, the system can capture high quality dark
 33 and bright field macro-images using a led flash-lighting system mounted inside the incubator chamber
 34 compartment, which can modulate R, G, B, and alpha light parameters and its incidence angle to achieve
 35 different light and shadow characteristics helpful in revealing 3D bacterial structure through image stack-
 36 ing techniques. The device is controlled through a dedicated GUI browser application, which allows
 37 the selection of the desired optical, camera, light, temperature and humidity, and time-lapse sequence
 38 configurations and settings.

39 We report and demonstrate the usefulness and robustness of the system with a range of applications
 40 where a combination of image acquisition and analysis can be used to obtain quantitative data on the
 41 distribution of fluorescently tagged bacteria during surface colonization. We will show that, by estimating
 42 the frequency of different strains in time and space, we can estimate fitness of each strain and obtain quan-
 43 titative information about the ecological interactions that result from multiple microbial subpopulations
 44 interacting through the environment.

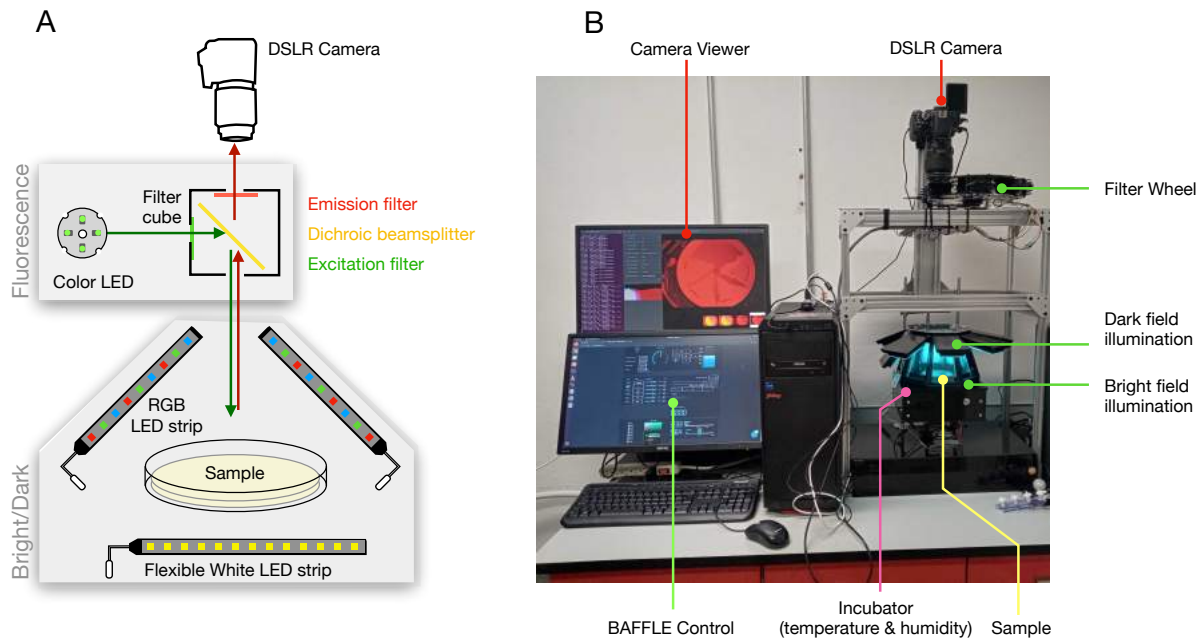


Figure 1: A) Schematic diagram of the device illustrating the fluorescent excitation and emission filters, as well as the bright and dark fields. B) Photograph of device (modules are color-coded: image acquisition and analysis in red, illumination in green, and incubator in pink).

45 Overall Implementation and design

46 The device described here was built using Open Hardware components and a standard DSLR camera.
 47 We use low-cost electronics to interface with all analog and digital inputs/outputs (e.g. sensors, switches
 48 and LEDs), as well as to control the Nema-17 stepper motors moving the filter wheel and the vertical
 49 axis. When possible, we used OpenBuilds aluminum extrusion V-slot profiles, with standard screws, nuts
 50 and joints (a complete list of components can be found in the project's repository). The device also
 51 contains acrylic elements (cut using a GlowForge laser CNC) and 3D-printed parts (printed in PLA using
 52 a Ultimaker 3). All files necessary to cut acrylic and print PLA parts are provided as supplementary files.

53 The system is composed of the following modules: incubation, illumination, fluorescence, and image
54 acquisition. All these modules are managed via a browser GUI (coded in Python-Dash [38]), that allows
55 control and configuration over the set of parameters within each module. In that sense, the overall system
56 can function “on the fly” in a simple sample inspection mode or, as in the primary mode, as a long-term
57 image acquisition system with a selected set of personalized parameters. The latter can be inserted into
58 the GUI by the use of a customizable template.

59 (2) Quality control

60 Safety

61 The only safety issues relevant to the overall system are the ones regarding the incubator module. The
62 peltier module used for the air heating can reach up to a very high temperature. To maintain the
63 temperature within the standard user-defined values the temperature detector is coupled to a relay
64 system that switches off once the nominal temperature is reached within the incubator. Moreover, the
65 peltier module is inserted into an aluminum heater dissipator and encased within the incubator module
66 which remains isolated to prevent any kind of direct physical contact. As well the 12V-30A power supply
67 that powers most of the system is secluded.

68 Calibration

69 To calibrate our fluorescent-based approach to identify bacterial genotypes in space, we used a library of
70 *Escherichia coli* K12 bacteria carrying a multicopy plasmid encoding for different fluorescent proteins[4]:

- 71 • **Red:** DsRed (excitation 558 nm/emission 584 nm)
- 72 • **Red:** E2Crimson (558 nm/583 nm)
- 73 • **Green:** GFPmut3 (500 nm/513 nm)
- 74 • **Yellow:** mVenus (515 nm/527 nm)
- 75 • **Cyan:** sCFP-A3 (433 nm/474 nm)
- 76 • **Non-fluorescent control.**

77 We streaked each strain (see Table 2 for details) into a Petri dish filled with semi-solid LB agar and
78 incubated overnight. Figure 2A illustrates the acquired images using Bright and Dark fields (white light,
79 with back and front illumination, respectively). We also acquired images using different filters and LED
80 configurations (hereafter referred to as *fluorescent channels*): red (excitation 559 nm/emission 630 nm),
81 green (469 nm/525 nm), cyan (434 nm/479 nm) and yellow (497 nm/535 nm).

82 Normalized fluorescent intensities for each channel were obtained by subtracting the background and
83 dividing the intensity of each pixel by the maximum fluorescence intensity of the whole image (ImageJ
84 macros used for image analysis can be downloaded from the project’s GitHub repository). Figure 2B
85 shows the multi-channel image and Figure 2C the resulting composite image. Note how each strain emits
86 light at a specific wavelength that is detectable by a combination of channels. In the following section
87 we will illustrate how this information can be used to estimate the temporal and spatial distribution of
88 fluorescent strains.

89 (3) Application

90 Although microbial communities have a direct impact in human health [2] and ecosystem sustainability [1],
91 as well as bio-engineering applications [24], understanding the ecological dynamics that emerges between
92 different individuals within a complex microbial community remains a challenging problem[13]. Actually,
93 it has even been suggested that the key limitation of applying ecological theory to study microorganisms
94 is the difficulty of observing microbial communities in ecological settings [33].

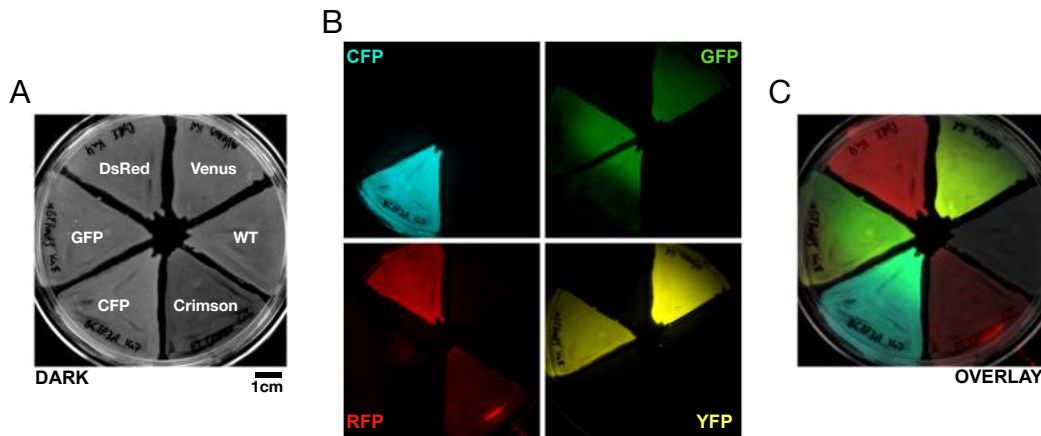


Figure 2: A) Dark-field image of a Petri dish inoculated with different fluorescent strains of *E. coli* (see Table 2 for a complete list of strains). B) Montage of images acquired using different fluorescent channels: CFP (cyan), GFP (green), YFP (yellow) and RFP (red). C) Overlay image produced by blending different fluorescent channels over the dark-field image.

95 A previous study showed that fluorescent microscopy can be used to evaluate the spatial arrangement
 96 of different fluorescent strains within the millimeter range [20]. Here we use a similar approach, but
 97 using a standard DSLR camera instead of a stereomicroscope, to obtain data on growth and morphology
 98 of expanding bacterial colonies from time-lapse images. From these multi-channel images we can then
 99 quantify fitness of different fluorescent subpopulations growing in spatially-explicit environments. To
 100 illustrate its capabilities, we will describe a series of examples where multi-channel images obtained
 101 with our device are used to characterize multiple aspects of the population dynamics resulting from the
 102 complex spatial arrangement exhibited during surface colonization.

103 Use case: Quantifying bacterial fitness from pair-wise competition assays

104 There are multiple methods to estimate *fitness* of bacterial populations [42]. For instance, many exper-
 105 imental studies quantify bacterial fitness by growing strains separately and comparing their maximum
 106 growth rate, a quantity that can be obtained from the optical density of a well-mixed culture [18]. A clear
 107 benefit of this approach is that it can be performed in high-throughput using microwell plate readers, thus
 108 obtaining periodic measurements of hundreds of samples while growing under controlled temperature and
 109 humidity conditions. However, this approach also has many limitations, as it ignores any growth promo-
 110 tion or inhibition compounds produced by other strains when grown in co-culture and, more importantly,
 111 only measures one component of fitness.

112 An alternative approach to quantify fitness is to grow multiple strains in co-culture and directly measure
 113 their relative abundances. This method is based on a pair-wise competition between different strains
 114 for limited resources and therefore can be used to determine whether one strain has a fitness advantage
 115 over another, thus providing a relative fitness measure instead of absolute fitness. There are, of course,
 116 limitations associated with this approach, mainly because we need to be able to identify different cells
 117 in a mixed culture. In some cases, specific members of the community can be identified through their
 118 morphology in agar plates or by their ability to grow in selective media, although this approach is not
 119 always reliable and only works in specific cases.

120 Another possibility is to use fluorescent markers to identify target subpopulations within multi-species
 121 microbial communities. Figure 3A shows an experiment that consists of a co-culture of two *E. coli* strains
 122 [3], one of the strains was transformed with a well-characterized plasmid containing a gene encoding for a
 123 green fluorescent protein (GFP) [35]. After 24 hours of growth in rich media, the co-culture was diluted
 124 and plated in semi-solid agar with rich media. We incubated the Petri dishes at $37^{\circ}C$ and estimated the
 125 abundance of each phenotype by counting the colony-forming units (CFUs) of each strain.

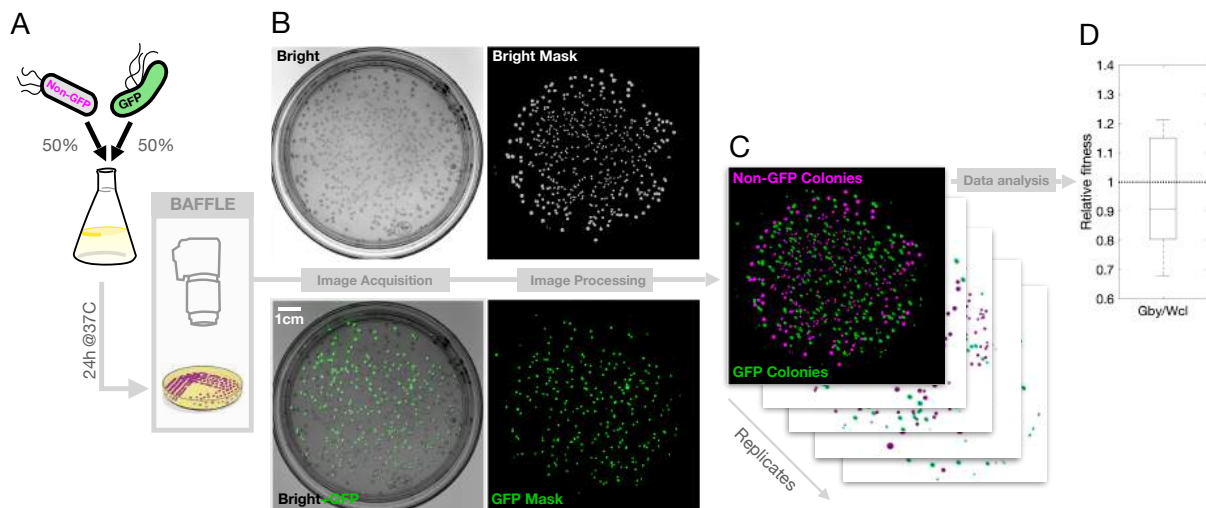


Figure 3: Diagram illustrating a pair-wise competition experiment. A) A 50-50 culture of fluorescent and non-fluorescent strains is inoculated into rich medium. After growing 24 hours under constant temperature and agitation, a sample is obtained, diluted and spread onto a Petri dish with semi-solid media. B) Images obtained using Bright and GFP channels can be used to obtain binary masks. C) By evaluating the fluorescence of each colony identified in the masks, we estimate the number of colony forming units (CFUs) of each strain. D) Replicating this protocol multiple times allows us to estimate the relative fitness between the fluorescent and non-fluorescent strains.

126 [Figure 3B](#) illustrates how image processing can be used to analyze multi-channel images (GFP and Bright
 127 channels). In particular, here we use image segmentation to obtain binary masks whereby black pixels
 128 belong to the background and white pixels correspond to a bacterial colony. By comparing Bright and
 129 GFP images, we then determine which colonies correspond to each strain, as illustrated in [Figure 3C](#).
 130 Finally, a colony counting algorithm can be used to estimate the proportion of fluorescent colonies with
 131 respect to the total number of colonies. This information is very useful, as it enables us to estimate the
 132 Malthusian growth ratio between both strains (see [Figure 3D](#)), a fundamental quantity in experimental
 133 microbiology referred to as *relative fitness* [42].

134 Use case: Evaluating bacterial fitness in a gradient environment

135 A limitation of the competition assay discussed previously is that it is performed under a single envi-
 136 ronmental condition. In many circumstances, it is important to simultaneously evaluate the fitness of
 137 a bacterial population under a range of environmental conditions. For instance, to determine the crit-
 138 ical concentration that suppresses the growth of clinically-relevant pathogens, a quantity known as the
 139 Minimum Inhibitory Concentration. This can be estimated with parallel competition assays in liquid
 140 media or using disk-diffusion assays in agar plates [21]. In the latter approach, bacterial susceptibility is
 141 determined by quantifying the zone of inhibition around an antibiotic source. Another benefit of this ap-
 142 proach is that it allows to characterize the resistance profile of a bacterial isolate to multiple antimicrobial
 143 substances in a single Petri dish.

144 A series of laboratory studies have also used spatially-explicit environments to evaluate microbial evolu-
 145 tionary dynamics [5, 8] and to study gene expression in response to environmental gradients [17, 40]. To
 146 identify different genotypes from mixed cultures, a common approach is to isolate bacterial clones and
 147 perform an analysis of DNA sequences of specific target genes that allow differentiating between different
 148 bacterial genotypes[22]. If using fluorescently-tagged strains, then the relative and absolute abundances
 149 of different strains can be estimated using spectrophotometry and flow cytometry [32, 25]. Note, however,
 150 that both of these approaches are invasive techniques that do not allow for dynamic measurements and
 151 long-term observations.

152 As our device allows us to evaluate the spatial distribution of bacteria with different fluorescent markers,
 153 then we can study the consequences of heterogeneous environments on the community dynamics. For
 154 example, antibiotic gradients produce a range of selective pressures for (and against) resistant (and
 155 susceptible) bacterial genotypes in different spatial locations, so we can use a drug gradient to evaluate
 156 the relative fitness between two strains. In a previous study, we designed a bespoke experimental system
 157 consisting of a spatially-explicit culture device built using 3D printing [16] whereby cells are immobilized in
 158 specific locations, but with antibiotics diffusing between neighboring compartments. Figure 4A illustrates
 159 another gradient device built from acrylic, whereby both cells and chemical substances can diffuse through
 160 space (SVG files used by the laser engraver can be obtained from the GitHub repository).

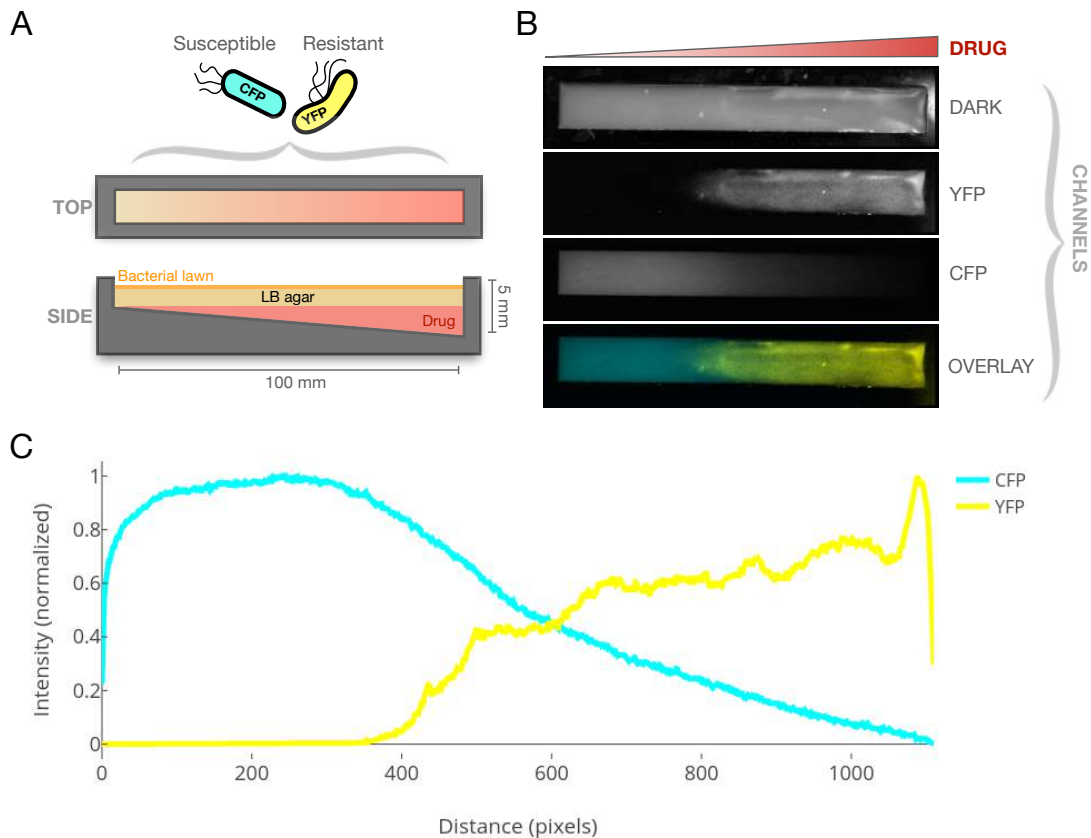


Figure 4: A) Diagram illustrating an antibiotic gradient experiment consisting in a co-culture of susceptible and resistant bacteria. A 50-50 culture of Cyan (susceptible) and Yellow (resistant) fluorescently-tagged bacteria are inoculated homogeneously in the surface of the agar. B) Multi-channel image acquisition is performed after 48h of incubation, from top to bottom: Dark, YFP, CFP and an overlay image of both fluorescent channels. C) Relative population abundance can be quantified in space based on the normalized fluorescent intensity detected in each channel.

161 We filled the bottom part of the gradient device with semi-solid agar supplemented with a lethal dose of
 162 antibiotic ($50\mu\text{g}/\text{ml}$ of *kanamycin*, an aminoglycoside bactericidal drug), and once it has solidified, we
 163 then pour drug-free LB agar medium on top. After storing for a couple of days at 4°C , an antibiotic
 164 gradient is formed, and we inoculate with a co-culture of *E. coli* bacteria uniformly over the agar surface.
 165 We denote our strains Gby and Wcl, which are susceptible and resistant to the antibiotic, respectively.
 166 Both strains encode different fluorescent markers (YFP in Gby, CFP in Wcl) [10, 11], so we estimated the
 167 spatial distribution of each strain by analyzing multi-channel fluorescent images obtained after 48 hours
 168 of incubation at 37°C (see Figure 4B). As expected, a consequence of a drug gradient is the formation
 169 of a landscape of selective pressures that modulates the spatial distribution of each strain. Indeed,
 170 Figure 4C shows that, at high drug concentrations, the population consists exclusively of drug-resistant
 171 cells (yellow), while at low antibiotic concentrations the resistant subpopulation is outcompeted by the
 172 susceptible strain, and thus the population consists of drug-sensitive cells (cyan).

173 **Use case: Evaluating colony expansion within a 3-strain bacterial consortium**

174 To illustrate that multi-channel images acquired with this device can be used to estimate the spatial
 175 distribution of different bacterial strains within a multi-species community, we use a previously char-
 176 acterized resistance-motility microbial consortia[14]. *Paenibacillus sp.* is a soil bacterium with a social
 177 organization based on physical and chemical signaling [7, 34]. Some *Paenibacillus sp.* (e.g. *P. vortex* and
 178 *P. lautus*) are known to generate complex spatial patterns consisting of vortices of thousands of cells that
 179 serve as building blocks for new colonies [23, 39]. To maintain cohesion of the vortices, flagella of *Paeni-*
 180 *bacillus sp.* tend to intertwine with the flagella of neighboring cells [15]. As a result, other organisms are
 181 dragged with the rapidly expanding colony. For instance, it has been reported that *P. vortex* is capable
 182 of transporting photosynthetic algae when food resources are scarce in order to consume them later, as
 183 well as transporting recombinant *E. coli* with useful properties, such as the expression of β -galactosidases
 184 and cellulases that enhance resource uptake from the environment [7, 31].

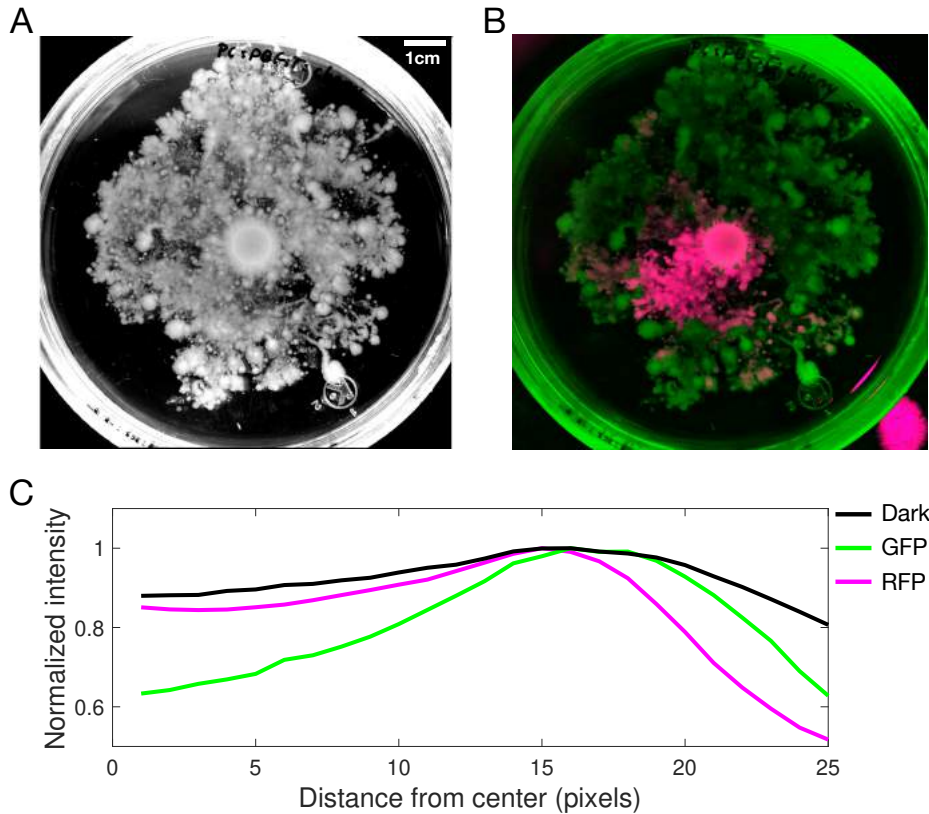


Figure 5: Multi-channel image illustrating a 3-strain bacterial co-culture in an agar plate containing LB medium (1.5g/l) and a lethal dose of antibiotic (50 μ g/ml of ampicillin). A) Dark field image showing a swirling-tree morphology. B) Fluorescent channel overlay image showing the spatial distribution of both *E. coli* strains: resistant in green and susceptible in magenta. C) Plot showing the normalized intensity in concentric rings around the center: dark field in black (*P. lautus*), GFP in green (resistant *E. coli*), and RFP in magenta (susceptible).

185 In particular, we use a bacterial consortium composed of a non-motile drug-susceptible *E. coli* (magenta),
 186 a non-motile drug-resistant *E. coli* (green), and a motile drug-susceptible *P. lautus* (non-fluorescent). In
 187 the presence a β -lactam antibiotic [30], a mutualistic interaction emerges between the resistant *E. coli*
 188 and *P. lautus*; the previous produces a β -lactamase that locally degrades the antibiotic, thus allowing
 189 the latter to expand its growing domains. Figure 5A shows that the spatial pattern produced by this
 190 resistance-motility consortium are concentric rings resulting from periods of reduced and accelerated
 191 expansion, coinciding respectively with the detoxification of the medium by *E. coli* and the subsequent
 192 swarming of *P. lautus*. Figure 5B shows that, during colony expansion, both types of *E. coli* cells (green
 193 and red) are dragged short distances, but only the resistant strain can be found in the colony edges, as
 194 shown in Figure 5C.

Use case: Quantifying spatio-temporal changes in colony morphology

Within the dark field configuration, the system can also be used as a macro and extreme macro photography studio platform with other biological specimens than bacterial colonies, as it allows the performance of image stacking techniques via a micrometric control of the stage position with respect to the camera by the use of a stepper motor and a customized lightning setup.

Figure 6A shows a time-lapse obtained from an experiment consisting on the growth of a bacterial colony of *Paenibacillus dendritiformis* (type T) in an agar plate. This swarming strain is known to develop a diversity of patterns mostly affected by the nutrient level and hardness of the medium [6]. In our experiment, we used a peptone nutrient medium that contained NaCl (5 g/liter), K₂HPO₄ (5 g/liter), Bacto peptone (1 g/liter), and finally Difco agar was added at a concentration of 1.5% (wt/vol).

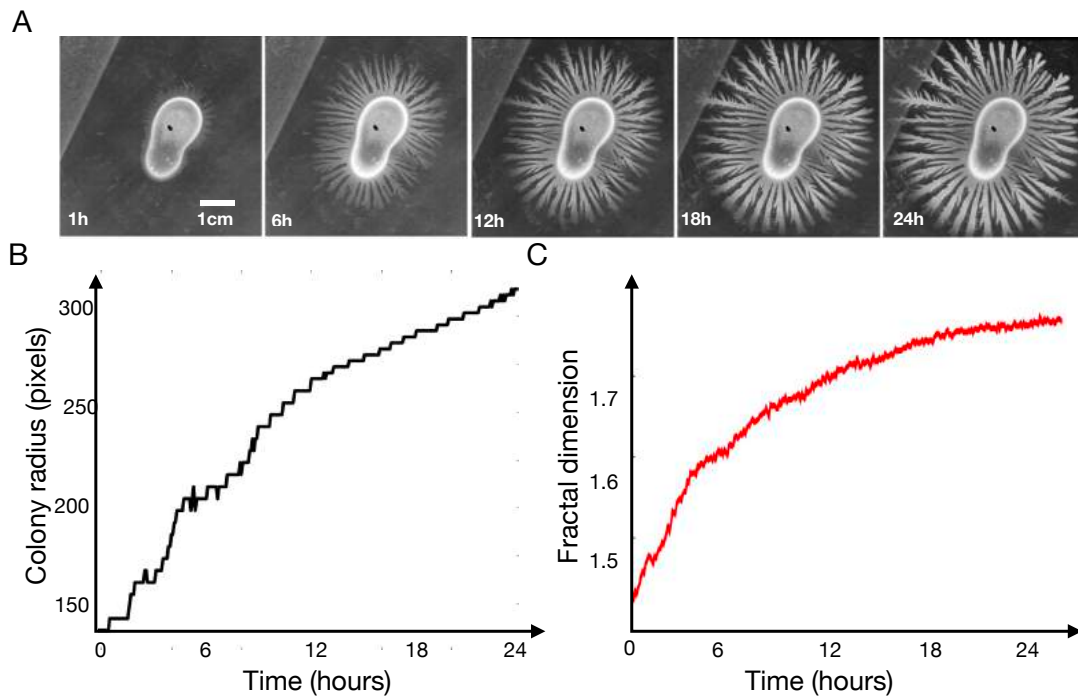


Figure 6: Figure illustrating the growth of the pattern-forming bacteria *Paenibacillus dendritiformis*. A) Selected time-lapse frames along its growth showing that the extrusion of the main branches over the inoculum initial contour remains fixed over time, while its tips expand radially and form more branches in a self-similar way. B) Colony expansion quantified as the maximum distance achieved by the colony in time. C) Plot of the evolution of the computed fractal dimension during growth, smoothly converging towards an expected $D=1.767$ value.

Time-lapse images can also be used to analyze expansion of a growing colony. Figure 6B shows how the colony radius (here defined as the maximum distance reached by a dendrite to the center of the colony) increases in time. Moreover, within this low nutrient and hard medium regime, the bacterial colony is known to produce a self-similar branching morphology through a diffusion-limited process, which can be quantified using fractal dimension methods. By using a box counting algorithm, we obtained a fractal dimension of the colony patterns of $D = 1.767$, very close to that of the two-dimensional DLA model and previous experimental reports around $D = 1.73$ [27] (see Figure 6C).

Reuse potential and adaptability

In our device, we used four specific excitation/emission filters and LEDs. To detect different fluorescent proteins, the appropriate filters and LEDs would need to be acquired.

215 (4) Build Details

216 Fluorescence excitation

217 The fluorescent excitation module is build around a commercial design composed of filter cubes (Figure
218 7A). Each one of the four cubes holds a fluorescence filter set, including an excitation filter (Figure 7C in
219 blue), emission filter (Figure 7C in purple), dichroic mirror (Figure 7B top) and finally an illumination
220 source.

221 The fluorescent illumination consists in high-intensity Rebel 23mm Quad LEDs with specific wave-lengths:
222 Red (627nm), Amber (590nm), Cyan (505nm) and Blue (470nm). The four fluorescent channels as seen
223 in Figure 7C include excitation filters (mounted in the blue lateral part), and emission filters (mounted
224 in the purple top side): Red (excitation 559 nm/emission 630 nm), Green (469 nm/525 nm), Cyan (434
225 nm/479 nm) and Yellow (497 nm/535 nm).

226 As seen in Figure 7B the filter wheel holds all four fluorescence cubes equally spaced together with a hole
227 (seen in the top red and bottom green acrylic layers) that is used for the dark/bright field illumination.
228 A Nema17 stepper motor slowly rotates the filter around its central axis, clockwise or counterclockwise
229 according the time-lapse setup.

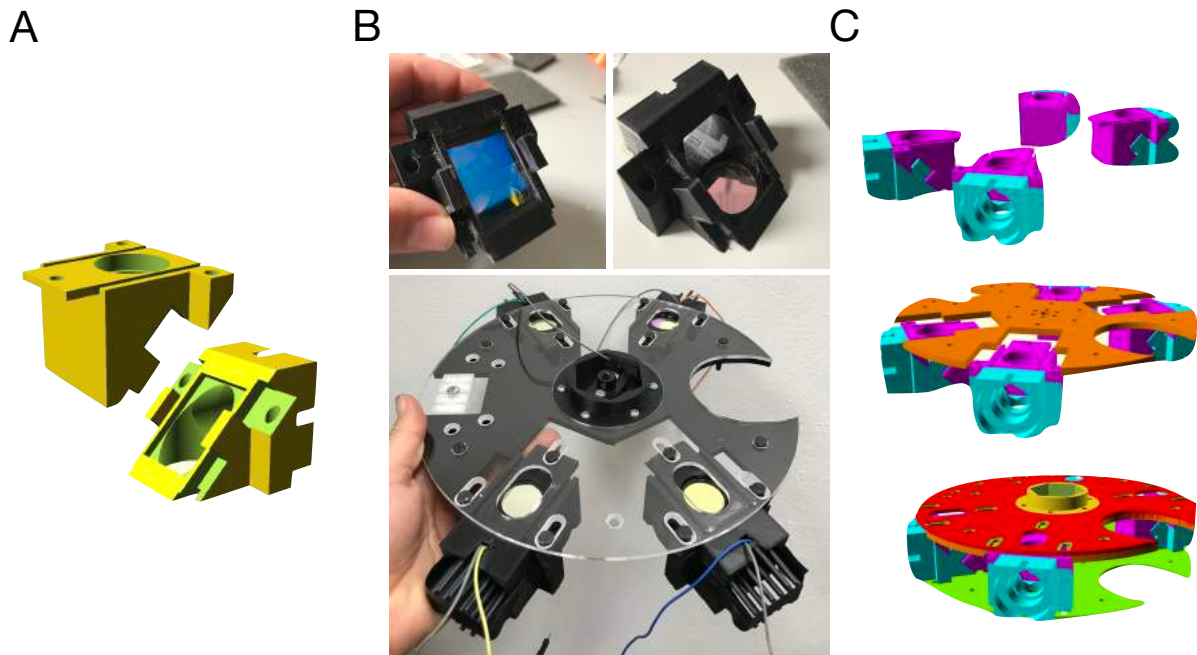


Figure 7: Fluorescence wheel module. A) CAD file of the filters cubes which hold on top the emission filter and on the lateral the excitation filter. B) Photography of the dichroic mirror placement in between the two parts of the fluorescent cubes. C) CAD design of the filter wheel system containing the four fluorescent cubes.

230 Image acquisition and analysis

231 To acquire high-resolution images, we used a standard DSLR camera (Canon T6i) with a macro
232 lens (100mm). Support for the camera is based on a 3D-printed FlexTILT head by Edelkrone
233 (<https://edelkrone.com/products/flextilt-head-v3>). Camera is controlled from a computer through the
234 open-source software Entangle (<https://entangle-photo.org/>). We also have a remote control to shoot
235 from our software. Focus is achieved by moving the stage vertically through a linear actuator.

236 Semi-automated image analysis can be performed using any image processing software. In particular, we
237 used ImageJ [36] to produce Figures 3-6, with scripts that can be downloaded from the project's GitHub
238 repository.

239 **Incubation**

240 In order to maintain temperature in ideal conditions for bacterial growth (usually 30 deg C or 37 deg C),
241 we use an Arduino-based (Arduino Mega2560 + Shield) thermostat build around a system that contains a
242 temperature and humidity sensor (Grove - Temperature and Humidity Sensor (High-Accuracy and Mini)
243 v1.0) and a relay that controls a heat source attached to a series of heat dissipators. Hot air is then
244 introduced into the incubation chamber through 8cm fans. The incubation box is made of 5mm acrylic
245 attached to a V-slot frame through 3D-printed joints. Temperature data from the sensor is continuously
246 read by the GUI, which compares it regularly with the user-selected temperature to active or deactivate
247 the relay connected to the heat source. Similarly, we implemented a humidity control system that actuates
248 an ultrasonic mist maker once the humidity goes below the humidity parameter value selected by the
249 user.

250 **Illumination**

251 For the dark field illumination setup, we use an 8-segment addressable LED strip with 48 light points
252 in total (6 LED's x 8 segments) directed towards the sample with different incident light angles in a
253 diffused manner via a semi-transparent acrylic sheet. These standard 12 Volt WS2812 low-cost LED
254 fixtures are programmed through FastLED Arduino library (<https://fastled.io/>). This allows us to define
255 RGB and alpha characteristics of the light in a customizable way for each of the 8 segments according
256 to the user's preferences using serial communication through Python scripting between the GUI and the
257 Arduino controller. For the bright field setup, we use standard white LED non-addressable fixtures which
258 are situated under the semi-transparent acrylic plate that holds the sample.

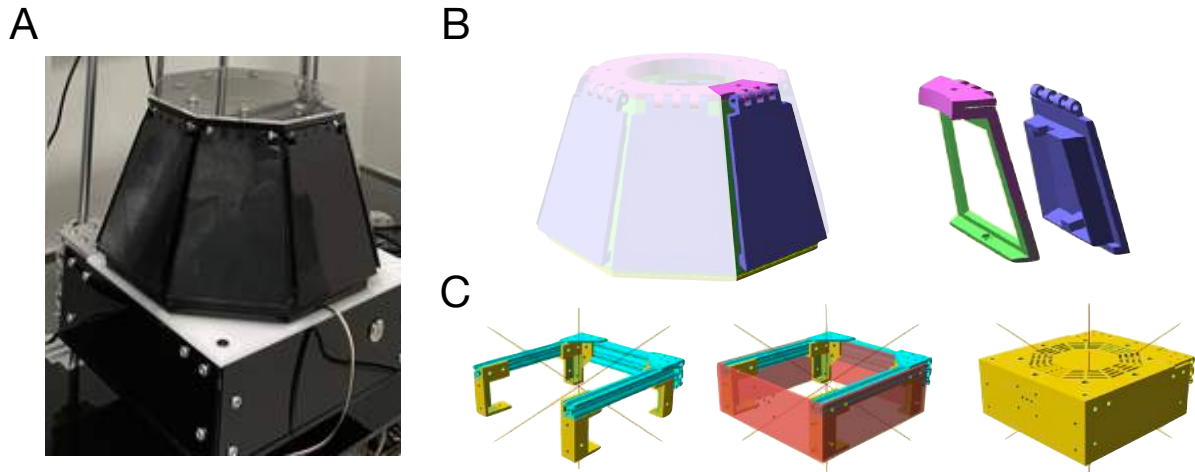


Figure 8: A) Photo of incubation/illumination chamber. B) The illumination chamber is composed of eight segments with addressable LEDs that can be controlled independently. C) Structure of the incubation chamber where the heat source and fan are contained. This box also contains the white LEDs used for back illumination (bright field).

259 **Operating software**

260 We developed a Python-based GUI using DASH components (<https://dash.plotly.com/dash-core-components>), allowing us to control the device through a standard web browser. This software allows
261 to separately control color and intensity of each segment in the dark light module, as well as of the
262 fluorescent LEDs and the position of the filter wheel.
263

264 To trigger the camera shutter we use a standard remote control shutter release cable. So, by setting the
265 camera to Bulb, we then control each individual optical configuration speed by setting the exposure time
266 into the slider position.

267 This system allow us to work with multiple independent optical configurations within the same time-lapse
 268 experiment. For instance, one can define a setup composed of 5 instances:

- 269 • Bright Field (1 sec exposure)
- 270 • Dark Field (white #f0f8ff color, 0.01 sec exposure)
- 271 • Dark Field (yellow #fdff00 color, 0.5 sec exposure)
- 272 • Cyan Fluorescence (5 sec exposure)
- 273 • Red Fluorescence (20 sec exposure)

274 These instances are going to be performed sequentially each time interval defined within the time-lapse
 275 box timer and with the temperature and humidity set at the subsequent sliders. In order to interface the
 276 digital camera to the computer we use the mentioned open-source software Entangle, which provides live
 277 image preview and a graphical interface for tethered shooting.

278 Moreover, some of the most relevant internal processes performed during the duration of the experiment,
 279 such as temperature and humidity readouts and motor movements, are printed into the terminal log in
 280 order to maintain a time-stamp register of all the actions. Finally, the device runs an Ubuntu 20.04.3
 281 LTS Linux 64 bits OS with an Intel Core i7-11700 @ 2.50GHz x 16 processor, 62GiB of memory and 2TB
 282 of disk capacity.

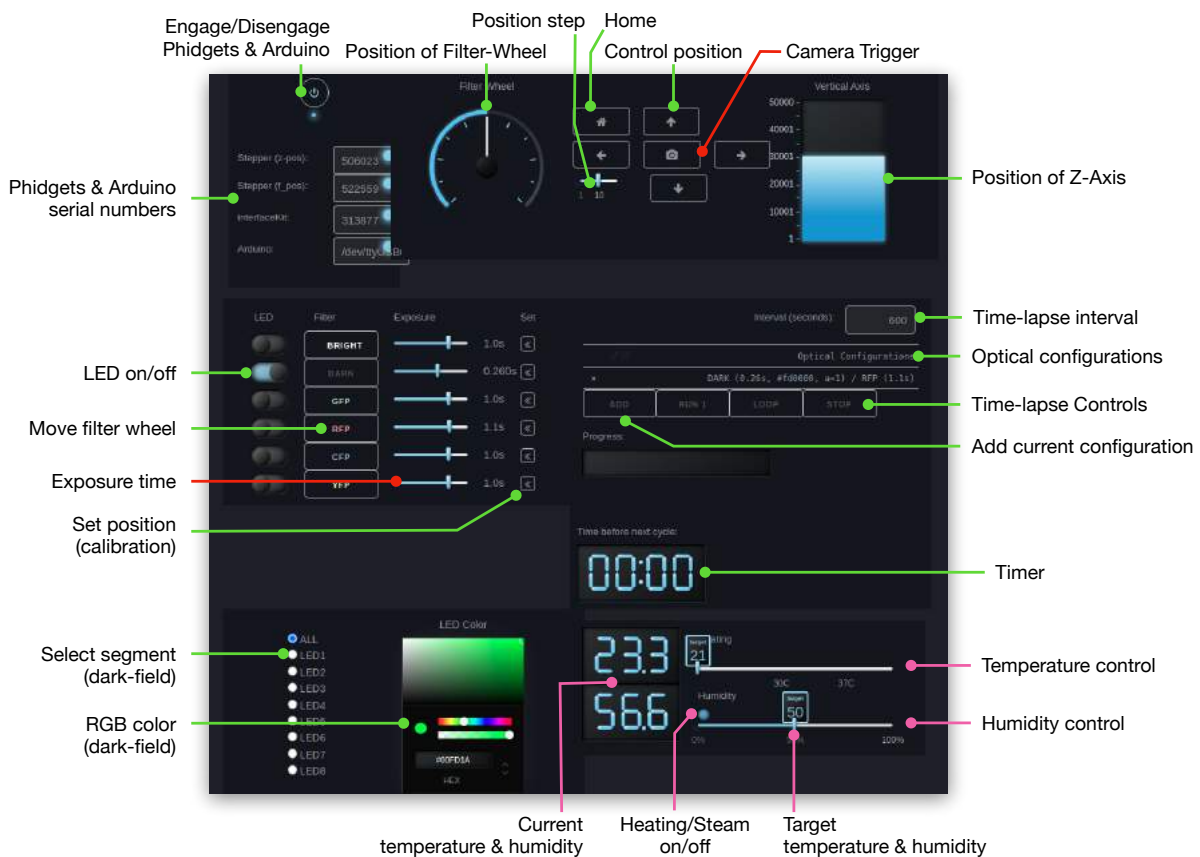


Figure 9: Screenshot of the graphical browser user interface that provides an interactive method to control the device settings and preferences. The green arrows point to the illumination controls, red arrows to the camera and in pink arrows to the incubator module.

283 Dependencies

284 In order to 3D print the designs a slicing software such as Ultimaker Cura2 is required to convert the
285 provided .stl files into g-code. All .stl files for 3D printing were created through parametric modeling and
286 can be modified using OpenScad [26].

287 The GUI was written in Python and depends on various common libraries (pandas, numpy,
288 time). We use a Plotly-based framework to display the web app (Dash and Dash Core Com-
289 ponents; <https://github.com/plotly/dash>). Phidget22 is used to control the stepper motors
290 (<https://pypi.org/project/Phidget22/>). FastLED is used to control the addressable LED strip
291 (<https://github.com/FastLED/FastLED>).

292 Hardware documentation and files location

293 Name: GitHub

294 Persistent identifier: <https://github.com/ccg-esb-lab/BAFFLE/>

295 Licence: MIT License

296 Publisher: Rafael Peña-Miller

297 Date published: 28/02/2022

298 (5) Discussion

299 The use of dark/bright field and fluorescent macroscopic imaging techniques in controlled environments
300 and within the millimeter range constitutes an essential tool in order to develop studies focused on
301 bacterial colony growth and biofilm formation in spatially explicit environments. Yet, hardware and
302 software instrumentation within microbiology research domains is often expensive and restricted, lead-
303 ing to a narrow use outside wealthy research institutions and academic labs. On the other hand, the
304 increasing availability of open source microcontrollers and customizable manufacturing technologies has
305 facilitated the development of inexpensive scientific devices and laboratory equipment both inside and
306 outside traditional microbiology lab environments, such as in high schools, DIY-DIWO movements, am-
307 ateur microscopy groups, maker spaces and biofablabs, and within ecology and bioart collectives.

308 By following this open hardware and open source software ethos, we have developed an image acquisition
309 device with the aim of acquiring time-lapse macro images of Petri dishes by the use of an inexpensive,
310 reliable and tunable system. In that sense our system can be used to function both in a single-channel or
311 multi-channel configuration, and both in a dark field or multi-fluorescence light arrangement. Moreover,
312 in order to allow for controlled growth conditions that permit to obtain reproducible observations in long
313 term duration experiments, the system allows to set-up different environmental configurations that can
314 also be variable in time.

315 In order to test our imaging system overall functionalities, we have investigated its scope and limitations on
316 several experimental cases that had the need of spatio-temporal tracking and quantification of both non-
317 fluorescence and multiple fluorescence signals. Besides those explored trials we think that the modularity
318 of our systems may allow to perform other type of non bacterial growth experiments such as the tracking
319 of plasmodium filaments in amoebzoa organisms, the formation of mycelium fungal networks or even
320 root system architectures in plants.

321 A last thought, regarding the overall building experience of such a device, goes into acknowledging its
322 entangled multi-disciplinary technical aspects and human expertise sides. By gathering a collaborative
323 group effort made of individual know-how insights, ranging from DIY building designs to synthetic biology
324 plasmid transformation techniques, what finally emerges is represented, as greater than the sum of the
325 parts, not as the device itself but rather as an horizontal transfer of knowledge's along a shared path.
326 Being so, this kind of projects can be framed not only as empowering observational tools to be used by
327 underrepresented (academic and non-academic) collectives but also as experimental educational practices
328 shaped within the community.

329 **Future Work**

330 One of the difficulties encountered while using the humidity control of the incubator via the mist maker
331 is the formation of water condensation droplets upon the transparent acrylic cover resulting in blurred
332 images. In order to prevent this issue, we are currently working in the use of an anti-fog coating sheet
333 layer that removes the fog once a small current is applied to it.

334 The aperture control system of the DSLR camera that we use it is not allowed to vary along each time-
335 lapse optical configuration. This turns out to be not optimal when working for instance with combined
336 dark/bright field and fluorescent modes, since the former requires a small aperture in order to improve
337 the depth of field of the image and the latter requires a big aperture in order the capture the fluorescent
338 light which is fainter. Some remote control hacks could be implemented in order to circumvent this issue.

339 Last but not least, we find important to mention that even we tagged the device as being "low-cost" by
340 comparing it to similar commercial versions, the use of a DSLR camera and it's optics together with
341 an state-of-the-art computer makes the overall system out of the budget for a wide proportion of users.
342 For all that, all the software can in fact run into tiny and affordable computers, such as Raspberry Pi
343 models, and its corresponding Raspberry Pi High Quality Cameras, which ultimately turns out to drop
344 the general price of the device.

345 **Paper author contributions**

346 CTP and RPM designed and assembled this device. CTP, DRG, FS, AFD and RPM performed exper-
347 iments and analysed the data. RPM and AFH assembled and tested earlier versions of this device. All
348 authors contributed to discussions and writing of the manuscript.

349 **Acknowledgements**

350 We thank Michael Sieber, Fernán Federici, Remi Chait and Rob Beardmore for inspiration and useful
351 discussions. We also thank Christian Sohlenkamp, David Zamorano, Juan Keymer and Lourdes Girard
352 for providing bacterial strains and advice. We also appreciate the help and input from past and present
353 members of the Systems and Synthetic Laboratory at CCG-UNAM.

354 **Funding statement**

355 This work was supported by CONACYT (Ciencia Básica grant A1-S-32164) and by PAPIIT-UNAM
356 (grants IN209419). DRG is a doctoral student in Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas,
357 Universidad Nacional Autónoma de México, and received fellowship 572373 from CONACYT.

358 **Competing interests**

359 The authors declare that they have no competing interests.

References

- [1] E Abatenh, Birhanu Gizaw, Z Tsegaye, and Genene Tefera. Microbial function on climate change—a review. *Open Journal of Environmental Biology*, 3(1):001–007, 2018.
- [2] Virginia Robles Alonso and Francisco Guarner. Linking the gut microbiota to human health. *British Journal of Nutrition*, 109(S2):S21–S26, 2013.
- [3] Tomoya Baba, Takeshi Ara, Miki Hasegawa, Yuki Takai, Yoshiko Okumura, Miki Baba, Kirill A Datsenko, Masaru Tomita, Barry L Wanner, and Hirotada Mori. Construction of escherichia coli k-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the keio collection. *Molecular systems biology*, 2(1), 2006.
- [4] Enrique Balleza, J Mark Kim, and Philippe Cluzel. Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. *Nature methods*, 15(1):47–51, 2018.
- [5] Michael Baym, Tami D Lieberman, Eric D Kelsic, Remy Chait, Rotem Gross, Idan Yelin, and Roy Kishony. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science*, 353(6304):1147–1151, 2016.
- [6] Avraham Be’er, Rachel S Smith, HP Zhang, E-L Florin, Shelley M Payne, and Harry L Swinney. Paenibacillus dendritiformis bacterial colony growth depends on surfactant but not on bacterial motion. *Journal of bacteriology*, 191(18):5758–5764, 2009.
- [7] Eshel Ben-Jacob. My encounters with bacteria—learning about communication, cooperation and choice. *Physical biology*, 11(5):053009, 2014.
- [8] Jesús Blázquez, Alejandro Couce, Jerónimo Rodríguez-Beltrán, and Alexandro Rodríguez-Rojas. Antimicrobials as promoters of genetic variation. *Current opinion in microbiology*, 15(5):561–569, 2012.
- [9] André Maia Chagas. Haves and have nots must find a better way: The case for open scientific hardware. *PLoS biology*, 16(9):e3000014, 2018.
- [10] Remy Chait, Allison Craney, and Roy Kishony. Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature*, 446(7136):668–671, 2007.
- [11] Remy Chait, Shreya Shrestha, Aakash Kaushik Shah, Jean-Baptiste Michel, and Roy Kishony. A differential drug screen for compounds that select against antibiotic resistance. *PloS one*, 5(12):e15179, 2010.
- [12] Maria Peñil Cobo, Silvia Libro, Nils Marechal, David D’Entremont, David Peñil Cobo, and Mehmet Berkmen. Visualizing bacterial colony morphologies using time-lapse imaging chamber mocha. *Journal of bacteriology*, 200(2), 2018.
- [13] Sylvie Estrela, Jean C.C. Vila, Nanxi Lu, Djordje Bajić, Maria Rebolleda-Gómez, Chang-Yu Chang, Joshua E. Goldford, Alicia Sanchez-Gorostiaga, and Álvaro Sánchez. Functional attractors in microbial community assembly. *Cell Systems*, 13(1):29–42.e7, 2022.
- [14] Alin Finkelshtein, Dalit Roth, Eshel Ben Jacob, and Colin J Ingham. Bacterial swarms recruit cargo bacteria to pave the way in toxic environments. *MBio*, 6(3):e00074–15, 2015.
- [15] Alin Finkelshtein, Alexandra Sirota-Madi, Dalit Roth, Colin J Ingham, and Eshel Ben Jacob. Paenibacillus vortex—a bacterial guide to the wisdom of the crowd. In *Biocommunication: sign-mediated interactions between cells and organisms*, pages 257–283. World Scientific, 2017.
- [16] Ayari Fuentes-Hernández, Anastasia Hernández-Koutoucheva, Alán F Muñoz, Raúl Domínguez Palestino, and Rafael Peña-Miller. Diffusion-driven enhancement of the antibiotic resistance selection window. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(158):20190363, 2019.
- [17] Ee-Been Goh, Grace Yim, Wayne Tsui, JoAnn McClure, Michael G Surette, and Julian Davies. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26):17025–17030, 2002.
- [18] Barry G Hall, Hande Acar, Anna Nandipati, and Miriam Barlow. Growth rates made easy. *Molecular biology and evolution*, 31(1):232–238, 2014.
- [19] Raimo Hartmann, Hannah Jeckel, Eric Jelli, Praveen K Singh, Sanika Vaidya, Miriam Bayer, Daniel KH Rode, Lucia Vidakovic, Francisco Díaz-Pascual, Jiunn CN Fong, et al. Quantitative image analysis of microbial communities with biofilmq. *Nature microbiology*, 6(2):151–156, 2021.
- [20] Theresa Hölscher, Anna Dragoš, Ramses Gallegos-Monterrosa, Marivic Martin, Eisha Mhatre, Anne Richter, and Ákos T Kovács. Monitoring spatial segregation in surface colonizing microbial populations. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (116):e54752, 2016.

- 410 [21] RA Howe and JM Andrews. Bxac standardized disc susceptibility testing method (version 11). *Journal of*
411 *antimicrobial chemotherapy*, 67(12):2783–2784, 2012.
- 412 [22] Luisa W Hugerth and Anders F Andersson. Analysing microbial community composition through amplicon
413 sequencing: from sampling to hypothesis testing. *Frontiers in microbiology*, 8:1561, 2017.
- 414 [23] Colin J Ingham and Eshel Ben Jacob. Swarming and complex pattern formation in paenibacillus vortex
415 studied by imaging and tracking cells. *BMC microbiology*, 8(1):1–16, 2008.
- 416 [24] Nathan I Johns, Tomasz Blazejewski, Antonio LC Gomes, and Harris H Wang. Principles for designing
417 synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 31:146–153, 2016.
- 418 [25] Christin Koch, Susanne Günther, Adey F Desta, Thomas Hübschmann, and Susann Müller. Cytometric
419 fingerprinting for analyzing microbial intracommunity structure variation and identifying subcommunity
420 function. *Nature protocols*, 8(1):190–202, 2013.
- 421 [26] Felipe Machado, Norberto Malpica, and Susana Borromeo. Parametric cad modeling for open source scientific
422 hardware: Comparing openscad and freecad python scripts. *Plos one*, 14(12):e0225795, 2019.
- 423 [27] Mitsugu Matsushita and Hiroshi Fujikawa. Diffusion-limited growth in bacterial colony formation. *Physica*
424 *A: Statistical Mechanics and its Applications*, 168(1):498–506, 1990.
- 425 [28] Andrew R Miller, Gregory L Davis, Z Maria Oden, Mohamad Reza Razavi, Abolfazl Fateh, Morteza Ghaz-
426 anfari, Farid Abdolrahimi, Shahin Poorazar, Fatemeh Sakhaie, Randall J Olsen, et al. Portable, battery-
427 operated, low-cost, bright field and fluorescence microscope. *PloS one*, 5(8):e11890, 2010.
- 428 [29] Isaac Nuñez, Tamara Matute, Roberto Herrera, Juan Keymer, Timothy Marzullo, Timothy Rudge, and
429 Fernán Federici. Low cost and open source multi-fluorescence imaging system for teaching and research in
430 biology and bioengineering. *PloS one*, 12(11):e0187163, 2017.
- 431 [30] Michael I Page. The mechanisms of reactions of. beta.-lactam antibiotics. *Accounts of Chemical Research*,
432 17(4):144–151, 1984.
- 433 [31] Mark Polikovskiy, Eshel Ben-Jacob, and Alin Finkelshtein. P. vortex-mediated strategies for polysaccharides
434 decomposition. *Technology*, 3(02n03):80–83, 2015.
- 435 [32] Ruben Props, Pieter Monsieurs, Mohamed Mysara, Lieven Clement, and Nico Boon. Measuring the bio-
436 diversity of microbial communities by flow cytometry. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11):1376–1385,
437 2016.
- 438 [33] James I Prosser, Brendan JM Bohannon, Tom P Curtis, Richard J Ellis, Mary K Firestone, Rob P Freckleton,
439 Jessica L Green, Laura E Green, Ken Killham, Jack J Lennon, et al. The role of ecological theory in microbial
440 ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5):384–392, 2007.
- 441 [34] Dalit Roth, Alin Finkelshtein, Colin Ingham, Yael Helman, Alexandra Sirota-Madi, Leonid Brodsky, and
442 Eshel Ben-Jacob. Identification and characterization of a highly motile and antibiotic refractory subpopu-
443 lation involved in the expansion of swarming colonies of p aenibacillus vortex. *Environmental microbiology*,
444 15(9):2532–2544, 2013.
- 445 [35] Alvaro San Millan, Jose Antonio Escudero, Danna R Gifford, Didier Mazel, and R Craig MacLean. Multicopy
446 plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria. *Nature ecology & evolution*, 1(1):1–8,
447 2016.
- 448 [36] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch,
449 Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, et al. Fiji: an open-source platform
450 for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7):676–682, 2012.
- 451 [37] James P Sharkey, Darryl CW Foo, Alexandre Kabla, Jeremy J Baumberg, and Richard W Bowman. A
452 one-piece 3d printed flexure translation stage for open-source microscopy. *Review of Scientific Instruments*,
453 87(2):025104, 2016.
- 454 [38] Carson Sievert. *Interactive web-based data visualization with R, plotly, and shiny*. CRC Press, 2020.
- 455 [39] Alexandra Sirota-Madi, Tsviya Olender, Yael Helman, Colin Ingham, Ina Brainis, Dalit Roth, Efrat Hagi,
456 Leonid Brodsky, Dena Leshkowitz, Vladimir Galatenko, et al. Genome sequence of the pattern forming
457 paenibacillus vortex bacterium reveals potential for thriving in complex environments. *BMC genomics*,
458 11(1):1–16, 2010.
- 459 [40] Thuy Do Thi, Elena López, Alexandro Rodríguez-Rojas, Jerónimo Rodríguez-Beltrán, Alejandro Couce,
460 Javier R Guelfo, Alfredo Castañeda-García, and Jesús Blázquez. Effect of reca inactivation on mutagenesis of
461 escherichia coli exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,
462 66(3):531–538, 2011.

- 463 [41] Bas Wijnen, Emily E Petersen, Emily J Hunt, and Joshua M Pearce. Free and open-source automated 3-d
464 microscope. *Journal of microscopy*, 264(2):238–246, 2016.
- 465 [42] Michael J Wisner and Richard E Lenski. A comparison of methods to measure fitness in escherichia coli. *PloS*
466 *one*, 10(5):e0126210, 2015.

467 **Copyright notice**

468 This work is licensed under an MIT License. Hardware is licensed under the CERN license.

469 **Supplementary Figures**

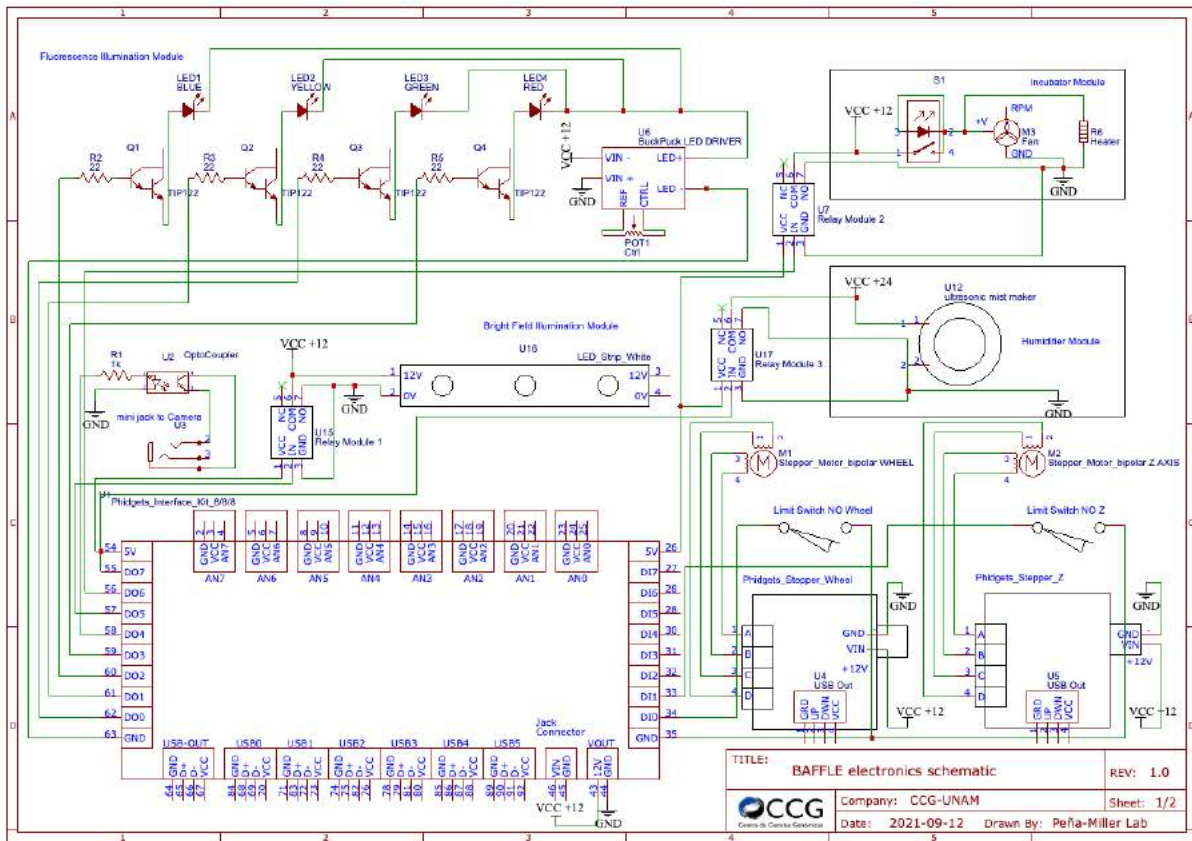


Figure 10: Electronic schematic diagram of the fluorescence and bright field illumination modules. Stepper control is achieved with a Phidgets Stepper Bipolar HC. Analog and digital inputs/outputs are controlled through a Phidgets Interface Kit.

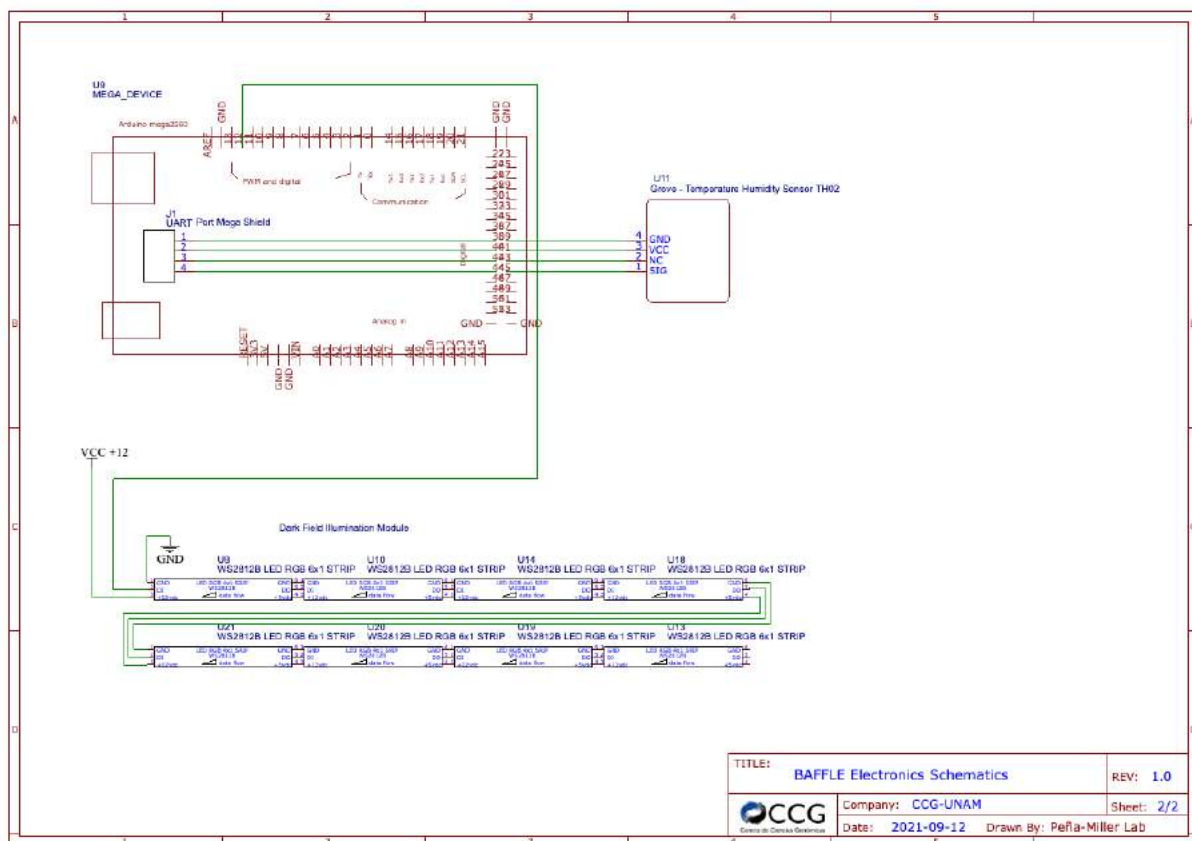


Figure 11: Electronic schematics of the humidity and temperature sensors, and dark field illumination module.

Strain	Phenotype	Fluorescence	Experiment	Source
<i>Escherichia coli</i> BW25113	Wild-Type	No	Calibration	[3]
<i>E. coli</i> MG1655-Crimson	Plasmid encoding E2Crimson protein	Red	Calibration	[4]
<i>E. coli</i> MG1655-DsRed	Plasmid encoding DsRed protein	Red	Calibration	[4]
<i>E. coli</i> MG1655-GFPmut3	Plasmid encoding GFPmut3 protein	Green	Calibration	[4]
<i>E. coli</i> MG1655-mVenus	Plasmid encoding mVenus protein	Yellow	Calibration	[4]
<i>E. coli</i> MG1655-Cyan	Plasmid encoding sCFPA3 protein	Cyan	Calibration	[4]
<i>E. coli tyrA-</i>	Tyrosine auxotrophy	No	Colony counts	[3]
<i>E. coli tyrA-pBGT-1</i>	Tyrosine auxotrophy encoding TEM-1 β -lactamase	Green	Colony counts	[3, 35]
<i>E. coli</i> Gby	Kanamycin resistance & YFP protein	Yellow	Gradient	[10, 11]
<i>E. coli</i> Wcl	Kanamycin susceptible & CFP protein	Cyan	Gradient	[10, 11]
<i>E. coli</i> -mCherry	MG1655 and mCherry protein	Red	Expansion	This study
<i>E. coli</i> pBGT-1	Mg1655 with pBGT-1 plasmid	Green	Expansion	[35]
<i>Paenibacillus lautus</i>	Pattern forming	No	Expansion	F. Federici
<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	T morphotype 30A1	No	Morphology	Bacillus Stock Center (OSU)

Table 2: Strains used in the experiments presented in this study.