



Universidad Nacional Autónoma de México
Doctorado en Ciencias Biomédicas.
Centro de Ciencias Genómicas

**Evolución de resistencia a antibióticos en ambientes con estructura
espacio-temporal**

Tesis que para optar por el grado de:
Doctor en Ciencias

Presenta:
Sandra Guadalupe Mayoral Álvarez

Director de tesis:
Dr. Rafael Peña-Miller
Centro de Ciencias Genómicas

Comité tutor:
Dr. Santiago Castillo
Centro de Ciencias Genómicas

Dr. Jesús Silva Sánchez
Instituto Nacional de Salud Pública

Tutora invitada:
Dra. Ayari Fuentes-Hernández
Centro de Ciencias Genómicas

Cuernavaca, Morelos, Marzo 2021



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.

Agradecimiento a CONACYT

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología de Sistemas y Biología Sintética del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rafael Peña-Miller en colaboración con la Dra. Ayari Fuentes-Hernández.

El presente trabajo fue financiado por CONACyT, organismo al que agradezco por haberme otorgado la beca (CVU/Becario): 737216/596192. Además del financiamiento otorgado por PAPIIT para término de proyecto y titulación, AFH Proyecto PAPIIT-UNAM IN215920.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis mentores, Ayari y Rafael por todo su apoyo, confianza y cada uno de sus consejos que fueron parte fundamental en mi formación académica y personal.

A mi comité tutor, Santiago Castillo y Jesús Silva por su colaboración en este proyecto, que mediante múltiples discusiones ampliaron mi visión y conocimiento en cada uno de los temas discutidos, dentro y fuera del aula.

A Luis Lozano Aguirre Beltrán por su apoyo y enseñanzas durante la elaboración de los análisis bioinformáticos, también a la Unidad de Apoyo de Tecnologías de Información (UATIs) por facilitarnos el uso y buen desempeño de los recursos informáticos.

A mis papás, Luis, que siempre me brinda los mejores consejos, mi gran muelle; y Elisa, que con su ejemplo de fortaleza me enseñó a no rendirme jamás.

A Betty y LuisMa, que además de ser mis hermanos son mis mejores amigos, siempre a mi lado, aún en la distancia.

A mi abuelita Chabelita y mi tía Conchita, por esas bellas vacaciones en la playa, que quedan en mi memoria para siempre.

A mis tíos y gran familia, especialmente a mi tío Héctor, que ha sido esencial en mi desarrollo personal y profesional.

A mis compañeros, Daniela, David, Bruno, Gustavo, Raúl, Charly, Fernando, Afra y Haydée, que entre risas, lágrimas y cervezas se han convertido en buenos amigos.

A mis amigos, por todo el tiempo y vivencias compartidas.

A todos ellos por su apoyo, confianza y cariño.
Gracias.

Índice general

1. Introducción	7
1.1. Evolución experimental	7
1.2. Secuenciación del genoma	12
1.3. Resistencia a antibióticos	14
2. La tasa de adaptación se correlaciona con la intensidad de la presión selectiva	22
3. La estabilidad de resistencia en ausencia de antibióticos depende de la velocidad de adquisición de resistencia previa	31
4. La aceleración de la resistencia a antibióticos depende de la historia evolutiva	39
5. El costo de la resistencia a antibióticos	47
6. La huella de la historia evolutiva	52
7. Conclusiones	57

Resumen

La mayor parte de nuestra comprensión sobre la evolución de resistencia a los antibióticos se basa en experimentos realizados en condiciones ambientales constantes. Sin embargo, los ambientes naturales son dinámicos y cambian continuamente, produciendo distintos nichos ecológicos generados por la presencia de diferentes concentraciones de antibiótico a los que están expuestas las poblaciones bacterianas y modificando la tasa de adquisición de resistencia. El camino evolutivo hacia la resistencia bajo diferentes concentraciones de antibióticos puede afectar la estabilidad de resistencia en ausencia de selección, así como dictar la respuesta bacteriana mientras transita de ambientes libres de antibióticos a ambientes que contienen antibióticos. Aquí combinamos un enfoque de evolución experimental con secuenciación del genoma completo para estudiar los cambios en las características fenotípicas y genotípicas de poblaciones isogénicas de *Escherichia coli* sometidas a distintas intensidades de selección impuesto por un antibiótico β -lactámico.

Los resultados principales de este estudio son: 1) las poblaciones evolucionadas bajo presión de selección fuerte mostraron tasas aceleradas de adaptación al antibiótico en comparación con las evolucionadas bajo una selección media, 2) Las poblaciones bacterianas expuestas a altas concentraciones de antibióticos desarrollaron mecanismos de resistencia altamente específicos, pero energéticamente costosos que afectan la adecuación en ausencia de selección. En contraste, las poblaciones bacterianas evolucionaron bajo selección media de antibióticos, adquirieron mecanismos de resistencia genéricos y más estables. Por consiguiente, al remover el antibiótico, los genes seleccionados en el régimen de selección media presentaron mayor estabilidad que aquellos seleccionados a dosis altas de antibiótico, y 3) al reintroducir el antibiótico, la tasa de adquisición de resistencia se aceleró a dosis intermedias, pero no así en una presión de selección fuerte.

En conjunto, nuestros resultados revelaron que la historia evolutiva es un factor determinante para la adquisición y estabilidad de la resistencia a los antibióticos.

Abstract

Most of our understanding of antibiotic resistance evolution is based on experiments performed under constant environmental conditions. Natural environments, however, are dynamic and continuously changing, these characteristics affect the range of concentrations of antibiotics that bacterial populations are exposed to. The evolutionary path to resistance under different antibiotic concentrations may affect the stability of the trait and dictate the bacterial response while transiting from antibiotic-free to antibiotic containing environments. Here, we used experimental evolution and whole-genome sequencing to study changes in phenotypic and genotypic characteristics of isogenic populations of *Escherichia coli* evolved under strong or mild antibiotic selection.

Our main results can be summarized as: 1) Populations evolved under strong selection showed accelerated rates of adaptation to antibiotic compared to those evolved under mild selection. 2) Bacterial populations exposed to high antibiotic concentrations evolved highly-specific, but energetically-costly resistance mechanisms that affect *fitness* in the absence of selection. In contrast, bacterial populations evolved under mild antibiotic selection acquired generic and more stable resistance mechanisms that were maintained in the population in the absence of selection. In consequence, when removing the antibiotic, drug-resistance genes selected under the strong selection regimen exhibited increased stability compared to mutants selected under a mild selection regimen, and 3) upon antibiotic re-introduction, the rate of resistance acquisition accelerated at intermediate doses, but not under strong selection.

Altogether, our results revealed that evolutionary history is a fundamental factor in the acquisition and stability of antibiotic resistance.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Evolución experimental

La evolución experimental consiste en el estudio de procesos evolutivos utilizando sistemas experimentales biológicos, principalmente en organismos de rápido crecimiento, como los microorganismos. La ventaja de estudios realizados en laboratorio es que podemos controlar de manera muy precisa las variables ambientales. Esta herramienta cambió la forma de estudiar la biología evolutiva [1, 2], la cual históricamente se había estudiado por medio únicamente del estudio de registro fósil de organismos multicelulares. El desarrollo de técnicas de secuenciación genómica también que unifica técnicas y enfoques experimentales de diferentes campos de la biología y la genómica [1, 2], con la finalidad de comprender la adaptación, estimar parámetros y probar hipótesis evolutivas [3].

La evolución experimental es un método que consiste en manipular variables ambientales para mantener condiciones específicas y reproducibles en experimentos de laboratorio a lo largo del tiempo [4]. Estos experimentos suelen tener diseños sencillos, independientemente del modelo de estudio utilizado, partiendo de una población clonal (ancestral) que es propagada bajo un cierto régimen ambiental para, posteriormente, realizar comparaciones entre la población ancestral y la evolucionada mediante el análisis y estimación de cambios fenotípicos; como el nivel de resistencia a antibióticos o su capacidad de crecimiento y, más recientemente, a nivel genotípico observando mutaciones presentes en el genoma antes y después de estar bajo cierta presión selectiva.

El uso de microorganismos como modelos de estudio ha sido uno de los avances más importantes en biología evolutiva debido al creciente interés por entender las dinámicas evolutivas en forma directa (evolución en tiempo real). Los organismos microscópicos poseen características que permiten un mejor estudio de los fenómenos evolutivos, por ejemplo, son de fácil propagación y se puede trabajar en espacios reducidos favoreciendo la replicación experimental.

Asimismo, son de rápida reproducción, lo que nos permite tener muchas generaciones en pequeños periodos de tiempo y es posible mantener los experimentos indefinidamente gracias a que estos organismos pueden ser almacenados a bajas temperaturas suspendiendo su actividad, de esta forma podemos realizar comparaciones entre las poblaciones ancestrales y adaptadas.

Además, es sencillo manipular las variables ambientales, como la disponibilidad de recursos, la temperatura, la densidad inicial del cultivo microbiano, el tipo de microorganismo, la presencia o ausencia de sustancias antimicrobianas.

El desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación, ha hecho posible conocer el genoma completo de varios microorganismos de interés, esto nos permite medir cambios genéticos y de regulación en presencia de ciertos ambientes en comparación con las poblaciones originales.

Finalmente, la mayoría de los microorganismos se reproducen de forma asexual, lo que mejora la precisión de la replicación experimental [5]. Gracias a las ventajas que nos brinda el uso de microorganismos se han realizado avances importantes en el estudio y comprensión de patrones evolutivos.

En la década de 1880, William Dallinger realizó el primer experimento de evolución con microorganismos del que se tiene registro [6]. En este estudio, Dallinger construyó una incubadora donde cultivó microorganismos flagelados entre 1880 a 1886, dándose cuenta de que los microorganismos que estaba cultivando no resistían inicialmente altas temperaturas, así que aumentando gradualmente la temperatura de estas cámaras, de 15°C a 75°C , durante seis años observó el surgimiento de nuevas cepas capaces de proliferar a temperaturas letales para las cepas ancestrales, proporcionando una demostración importante del poder de la selección natural para adaptar organismos a condiciones ambientales hostiles [6, 7, 8].

Durante la primera parte del Siglo XX, se realizaron diversos estudios donde se docu-

mentaron cambios en poblaciones microbianas, pero fue hasta 1940 que se percibieron los primeros avances en evolución experimental usando microorganismos, cuando Jacques Monod describió la construcción y operación de un dispositivo que denominó *bactogen* (ahora conocido como quimiostato), donde observó la cinética de crecimiento en un cultivo continuo limitado por la concentración de un solo nutriente.

Aunque Monod únicamente estaba interesado en conocer las tasas de crecimiento de estas poblaciones, encontró que la técnica de cultivo utilizada puede tener repercusiones en la mutabilidad de las poblaciones. La ocurrencia de mutantes favorecidas selectivamente puede verse afectada por la técnica de cultivo, estas pueden ser cultivos continuos donde la tasa de ingreso de nutrientes es controlada, por lo que la población se mantiene en crecimiento exponencial o cultivo en lote, donde el nutriente proporcionado al medio es limitado [7]. Trabajos posteriores se enfocaron en analizar los cambios genéticos presentes en poblaciones en cultivos continuos utilizando diferentes técnicas de cultivo [7].

En los siguientes años, los trabajos fueron enfocados en estudiar los cambios evolutivos en la actividad enzimática con limitación de nutrientes, donde diferentes grupos observaron cambios en estructura y regulación de diferentes enzimas[9, 10, 11]. El objetivo de estos estudios fue aumentar el conocimiento bioquímico y fisiológico sobre las especies microbianas estudiadas. Este objetivo no solo fue superado, sino que contribuyó en la comprensión de las bases genéticas de cambio evolutivo.

En conjunto, estas observaciones ayudaron a concluir que las mutaciones reguladoras y genéticas a menudo preceden a la selección y proporcionaron la primera evidencia de la importancia adaptativa de los cambios regulatorios en la evolución. Por otro lado, se consideró importante la cantidad de energía utilizada en procesos celulares realizados a diario por el microorganismo, argumentando que se favorecería adaptativamente la energía mediante la eliminación de componentes celulares innecesarios [3].

Uno de los experimentos evolutivos más importantes fue realizado por Salvador Luria y Max Delbrück en 1943, donde un cultivo bacteriano fue expuesto a un virus bacteriano, de esta forma eliminando las cepas susceptibles. Sin embargo, observaron el crecimiento de cepas bacterianas resistentes pocas horas o incluso días después de la adición del virus [12]. La relevancia de este experimento consistió en demostrar que las mutaciones en una población ocurren al azar y sin la estricta presencia de una presión de selección utilizando

un razonamiento estadístico; la varianza observada fue mucho mayor de lo esperado a que si la exposición al agente selectivo hubiera causado las mutaciones [1, 13]. En 1952, Joshua y Esther Lederberg demostraron de forma contundente el origen aleatorio de las mutaciones bacterianas con un sencillo experimento de replicación en cajas de Petri [1, 8].

Más recientemente, numerosos trabajos han utilizado sistemas de evolución experimental en poblaciones bacterianas para estudiar procesos evolutivos, tales como la mutación y selección natural. Notablemente, en 1990 Richard Lenski diseñó un experimento evolutivo que permitió evaluar las trayectorias de adaptación a través de miles de generaciones, un experimento conocido como *Long Term Evolution Experiment* (LTEE, por sus siglas en inglés) [14]. Este estudio consistió en evolucionar doce poblaciones de *Escherichia coli* en un medio de cultivo líquido con glucosa como única fuente de carbono y con citrato como agente quelante.

A pesar de que el citrato puede ser utilizado como fuente de carbono, *E. coli* no puede absorber y usar citrato en presencia de oxígeno. Todos los días se realizaron transferencias diarias del 1 % de la población a matraces con medio fresco y cada 100 generaciones una muestra de cada población fue conservada en congelación. La adaptación de cada población al medio fue evaluada mediante experimentos de competencia entre las poblaciones adaptadas y su ancestro [8, 14]. Durante las primeras 2,000 generaciones, se encontró gran número de mutaciones beneficiosas, produciendo aumentos en la adecuación media de la población con dinámicas escalonadas y diferencias morfológicas [14].

En las siguientes 5,000 generaciones, los cambios tanto en la adecuación como en la morfología se mantuvieron prácticamente estáticos, pero la divergencia en la adecuación media de la población continuó, diferenciando las poblaciones cada vez más [15]. Interesantemente, aproximadamente en la generación 31,500, una de las doce poblaciones evolucionó la capacidad de utilizar citrato como fuente de carbono, produciendo un aumento en el tamaño y diversidad de la población [16, 17]. En comparación con lo observado en generaciones anteriores, al alcanzar las 50 000 generaciones se observó que la adecuación media de la población aumentó de forma exponencial [18]. El experimento LTEE que Lenski inició en 1988 continúa y actualmente han transcurrido más de 75,000 generaciones [19].

Una de las aplicaciones de los experimentos evolutivos con microorganismos ha sido

entender las dinámicas de adaptación en condiciones particulares de forma rápida. Estas condiciones son mejor conocidas como presiones de selección, encargadas de modular la adaptación de las poblaciones. Las presiones selectivas pueden incluir modificación en la concentración [20] o tipos de nutrientes[21], cambios en la temperatura [22], pH [23] o presencia de algún agente ajeno a la constitución original del medio donde se desarrolla la población.

Por ejemplo, en algunos estudios donde se limitó la concentración de glucosa en el medio, se observaron cambios en el tamaño de las colonias [24], expresión global de genes de la red de regulación [25] y la diversificación de la población [26]. En otras investigaciones se modificaron parámetros como la temperatura [27] o el pH [28], para ambos casos la población presentó un incremento en la tolerancia a estos estreses. En los casos donde se utilizaron varias fuentes de carbono, se observó divergencia entre la población originalmente clonal [29] y la expresión de múltiples genes [30].

El proceso de adaptación es modulado por las presiones selectivas utilizadas, pero también la fuerza en la que esta presión es aplicada en el medio [31]. La presión de selección puede ser tan fuerte que solo favorece a un genotipo raro que puede sobrevivir al estrés y, por el contrario, si la selección es menos estricta puede mantener mayor diversidad genética, lo que permite que las poblaciones exploren rutas mutacionales alternativas. Entonces, si una presión de selección fuerte es aplicada en la población, las mutaciones benéficas aumentan en frecuencia rápidamente y la diversidad genética de la población se reduce [32].

Cuando un ambiente es modificado sustancialmente, como en el caso de tratamientos con sustancias antimicrobianas, la presión de selección es impuesta por el antibiótico, mientras que la fuerza de la presión de selección es dada por la concentración con que el antibiótico es suplementado al medio de cultivo. La fuerza en la presión de selección es un factor importante que puede afectar la dinámica de adaptación y con ello los perfiles de resistencia que mantienen un costo metabólico asociado al camino evolutivo.

Un rasgo importante en la evolución bacteriana es la resistencia a antibióticos, donde la presencia o ausencia de un antibiótico representa un claro ejemplo de selección. En el 2012 se utilizaron cuatro tipos de antibióticos de relevancia clínica para estudiar los efectos en la distribución de la adecuación de la población en diferentes ambientes (abundancia y

limitación de nutrientes, así como altas temperaturas).

1.2. Secuenciación del genoma

El genoma comprende todo el material genético de un organismo, el cuál está formado por moléculas de *Ácido Desoxirribonucleico* (ADN). Cada organismo tiene una secuencia única que se compone de las bases Adenina (A), Timina (T), Citocina (C) y Guanina (G). La determinación del orden de las bases se denomina secuenciación[3]. La secuenciación del genoma completo (WGS) determina el orden de las bases en el genoma de un organismo [33].

Los avances tecnológicos en el área y la disminución de los costos de secuenciación, han facilitado la creación de grandes bases de datos de los genomas secuenciados, que nos permiten diferenciar por su base genética los rasgos adaptativos que separan un clon evolucionado de las cepas de referencia. La evolución experimental combinada con las tecnologías genómicas, se ha transformado en un poderoso método para responder a muchas preguntas importantes sobre procesos de adaptación, así como para relacionar los cambios entre las características fenotípicas y genotípicas de las poblaciones estudiadas [34].

El primer método enzimático para secuenciar ADN fue desarrollado en 1975 por Sanger y Coulson, que consistía en la incorporación de *dideoxinucleótidos* (ddNTPs) terminales [35], dos años después se realizó la secuenciación del bacteriófago MS2 (Phi-X174) [36]. En 1990 se puso en marcha el Proyecto Genoma Humano con el objetivo de obtener una secuencia precisa de la gran mayoría de la porción eucromática del genoma humano [37]. Sin embargo, no fue hasta 1995 y con la aparición de los secuenciadores automáticos que se realizó por completo la secuencia del primer genoma bacteriano, *Haemophilus influenzae* [38], finalmente en el 2003 la secuenciación del genoma humano [37].

Con el paso de los años se logró el desarrollo y mejoramiento de las técnicas de secuenciación, entre las cuales se encuentran las plataformas de próxima generación (*Next Generation Sequencing*, NGS, por sus siglas en inglés). Hay dos paradigmas principales en la tecnología de próxima generación, la secuenciación de lectura corta y la secuenciación de lectura larga. El enfoque de lectura corta proporciona datos de menor costo, mayor precisión y se puede secuenciar ADN fragmentado, mientras que el enfoque de lectura

larga resulta adecuado para ensamblajes de genomas y secuenciación de isoformas de longitud completa, aunque con mayor tasa de error [39].

Las cinco plataformas que han dominado el mercado en la última década son 454, Illumina, SOLiD, Ion Torrent y PacBio [40]. El primer instrumento desarrollado NGS fue el dispositivo de pirosecuenciación 454. Es un sistema de *secuenciación por síntesis* (SBS) con el enfoque de *adición de un solo nucleótido* (SNA), este sistema distribuye microesferas unidas a la plantilla PicoTiterPlate junto con microesferas que contiene un coctel de enzimas. Cada vez que se incorpora un dNTP a la cadena, se produce una cascada enzimática que da como resultado una señal de bioluminiscencia, detectada por una cámara (CCD), que se puede atribuir a la incorporación de un dNTP [41, 39].

La plataforma Illumina pertenece al sistema de secuenciación por síntesis, con el enfoque de *terminación reversible cíclica* (CRT), en donde se prepara una plantilla de ADN con una secuencia que es complementaria a una región adaptadora, que inicia con la unión de la polimerasa a esta región de ADN de doble cadena. Durante cada ciclo se agrega una mezcla de los cuatro dNTP, marcados individualmente y bloqueados en el grupo 3'-OH de la ribosa, después de la incorporación de un solo dNTP a cada cadena complementaria alargada, se eliminan los dNTP no unidos y se toman imágenes de la superficie para identificar qué dNTP se incorporó en cada grupo [39].

Las tecnologías Illumina de NGS, utilizan la amplificación clonal y la secuenciación de síntesis química para permitir una secuenciación rápida y precisa [42]. Dentro de la plataforma Illumina se encuentran tres herramientas, iSeq, MiSeq y NextSeq [43]. En un estudio donde se compararon la consistencia, precisión y reproducibilidad utilizando diferentes tipos de instrumentos de secuenciación de Illumina entre diez laboratorios, encontraron que estos instrumentos de secuenciación son muy similares en términos de calidad de base, lo que sugiere que estas tecnologías son similares, a pesar de sus diferencias [44]. Sin embargo, NextSeq, la serie perteneciente a la plataforma Illumina ofrece el poder de la secuenciación de alto rendimiento con la simplicidad de un secuenciador de escritorio. [45, 46, 47], lo que la hace una de las herramientas mayormente utilizadas en los laboratorios de investigación.

La plataforma SOLiD utiliza sondas codificadas de dos bases, en las que cada señal fluorométrica representa un dinucleótido. El procedimiento de secuenciación SOLiD se

compone de una serie de ciclos de unión, ligadura, formación de imágenes y escisión de sonda-anclaje para alargar la cadena complementaria. En el transcurso de los ciclos, se introducen compensaciones de un solo nucleótido para garantizar que se secuencie cada base en la cadena molde [39, 48].

Ion Torrent fue la primera plataforma NGS sin detección óptica. En lugar de utilizar una cascada enzimática para generar una señal, la plataforma Ion Torrent detecta los iones de hidrógeno que se liberan a medida que se incorpora cada dNTP. El cambio en el pH detectado por el sensor no es completamente proporcional al número de nucleótidos detectados, lo que resulta en un rendimiento de datos limitado [39, 48, 49].

Actualmente, el enfoque de lectura larga más utilizada es el de *secuenciación en tiempo real de una sola molécula* (SMRT), utilizada por la plataforma PacBio. Este instrumento utiliza una celda de flujo especializada con muchos miles de pocillos individuales, PacBio fija la polimerasa en el fondo del pozo y permite que la hebra de ADN progrese. Al tener un lugar de incorporación constante debido a la enzima estacionaria, el sistema puede concentrarse en una sola molécula. La incorporación de dNTP en cada plantilla de una sola molécula por pocillo se visualiza continuamente con un láser y un sistema de cámara que registra el color y la duración de la luz emitida a medida que el nucleótido etiquetado se detiene momentáneamente durante la incorporación. La polimerasa escinde el fluoróforo unido a dNTP durante la incorporación, lo que permite que se difunda lejos del área del sensor antes de que se incorpore el siguiente dNTP marcado [39, 48, 40, 50]. Nos encontramos en la cúspide de las tecnologías NGS, que ahora son parte rutinaria de los proyectos de investigación biológica, siendo Illumina la plataforma de preferencia por su bajo costo y precisión en comparación con el resto de las tecnologías [39].

1.3. Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos representa hoy en día uno de los problemas más importantes de salud pública debido al uso incorrecto e indiscriminado de los antibióticos, así como al aumento en la tasa de adquisición de mutaciones que confieren resistencia [51, 52]. La evolución experimental se ha convertido en una herramienta útil para estudiar los mecanismos por los que las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos que existen actualmente.

En las últimas décadas, el descubrimiento de antibióticos ha disminuido notablemente [53], por esta razón los esfuerzos han sido enfocados en encontrar estrategias que disminuyan la adquisición de resistencia a los antibióticos disponibles [54]. Una estrategia comúnmente utilizada en el área clínica es la combinación de dos o más antibióticos al mismo tiempo, mejor conocidos como “cócteles”, sin embargo, múltiples opciones terapéuticas han sido estudiadas [55, 56, 57, 58, 55] con el objetivo de ser implementadas, pero se ha demostrado experimental y teóricamente que no todas las combinaciones y terapias son eficientes [55, 59]. Esto ha impulsado investigaciones enfocadas en entender a fondo como una población bacteriana puede adaptarse a diferentes presiones de selección.

La resistencia a antibióticos puede desarrollarse a través de la acumulación de múltiples mutaciones [51], estas mutaciones se encuentran extendidas en poblaciones clínicas y ambientales, proporcionando un reservorio que puede diseminarse por transferencia horizontal de genes. A medida que las bacterias adquieren resistencia a un antibiótico determinado, el uso posterior de otros antibióticos puede seleccionar por resistencias adicionales, lo que implica una creciente amenaza por la aparición de cepas multi-resistentes [54].

Las mutaciones que confieren resistencia a los antibióticos suelen ser costosas en ausencia de antibiótico, pero las bacterias pueden reducir este costo adquiriendo mutaciones compensatorias. Por lo tanto, la adquisición de mutaciones compensatorias y sus efectos son clave para el mantenimiento y difusión de resistencia a antibióticos [60]. Las mutaciones de resistencia a menudo interactúan epistáticamente, lo que sugiere que es importante conocer estas interacciones para entender el efecto que causan y cómo funcionan las mutaciones compensatorias en bacterias multi-resistentes. Las interacciones epistáticas entre las resistencias a antibióticos, conducen a grandes costos de *fitness*, posiblemente abren caminos alternos que compensan rápidamente la evolución [60].

Clasificación de sustancias antimicrobianas

El término “antibiótico” fue acuñado por primera vez por Selman Waksman para describir sustancias químicas producidas por microorganismos y que tienen efectos antagónicos sobre el crecimiento de otros microorganismos [61]. Los mecanismos de acción de los antibióticos se desarrollaron después de que se descubriera que estas moléculas tienen efectos sobre el crecimiento bacteriano, por lo que los antibióticos fueron clasificados de

acuerdo a:

i) Efectos inhibitorios, donde un antibiótico puede eliminar a la población bacteriana (*bactericidas*), o solo detener el crecimiento de la célula (*bacteriostáticos*). Sin embargo, existen antibióticos que tienen efectos bacteriostáticos con un patógeno y bactericidas con otros.

ii) Espectro de actividad, donde los antibióticos pueden actuar sobre una amplia gama de bacterias Gram-negativas y positivas denominados de amplio espectro, mientras que los que solo actúan sobre microorganismos específicos son de espectro reducido.

iii) Mecanismos de acción, es decir, los sitios y/o funciones dentro de la bacteria a los que se dirigen los antibióticos descritos en la Figura 1.1 [62, 63, 64]. Podemos encontrar cuatro objetivos principales en las bacterias según su modo de acción [65]:

a) Inhibición de la síntesis de la pared celular. Las especies bacterianas se pueden diferenciar en dos grandes grupos, bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, de acuerdo a las propiedades físicas y químicas de su pared celular. La membrana celular está compuesta por *peptidoglicano* (PG), el cual protege a la célula y contribuye al transporte activo. Tanto las bacterias Gram-positivas como Gram-negativas tienen capas de PG como parte de su pared celular, sin embargo, las bacterias gram-positivas tienen múltiples capas de PG lo que hace más gruesa su membrana celular. Otra diferencia entre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas es la existencia de una segunda membrana externa en las bacterias Gram-negativas.

El PG, también conocido como mureína, es un polímero formado por dos hexosas, *nacetilglucosamina* y el ácido *N-acetil-murámico*. La biosíntesis de PG son catalizados por las enzimas *MurA–F* y *MurG*. Luego, las unidades de PG se transfieren a la membrana mediante el fosfato de *bactoprenol-lípido* para generar los lípidos I y II. Los azúcares y fosfatos se agregan por *transglicosilación* y *pirofosforilación* y, finalmente, se forma un enlace peptídico entre las cadenas peptídicas. Varias *transpeptidasas* y *transglicosilasas* conectan las estructuras de *peptidoglicano* recién formadas a la matriz de *peptidoglicano* de la pared celular [66].

Cuando los antibióticos ingresan en la célula afectan los pasos metabólicos de la síntesis de ácidos grasos y los fosfolípidos de membrana, ya que cada uno de los pasos en la biosíntesis son blancos potenciales, causando daño y muerte celular. Por lo tanto, las bac-

terias Gram-positivas son susceptibles a algunos antibióticos que no funcionan contra las bacterias Gram-negativas debido al limitado tamaño de los poros de las porinas de la membrana externa [65, 66].

b) Inhibición de la síntesis de proteínas. Los ribosomas bacterianos están compuestos por dos subunidades, 50S, la subunidad más grande, que contiene alrededor de treinta proteínas y estructuras de *ácido Ribonucleico* (ARN) ribosomal conocidas como 23S y 5S, y 30S, la subunidad ribosomal pequeña que contiene cerca de veinte proteínas y una estructura de ARN ribosomal, 16S [65].

Los antibióticos pueden inhibir la síntesis de los compuestos biológicos como una forma de inhibición competitiva, siendo análogos estructurales de los sustratos utilizados en las reacciones metabólicas. Mediante el bloqueo de uno o más de los pasos biosintéticos de proteínas que ocurren en las subunidades 30S y 50S del ribosoma bacteriano.

Los principales objetivos de los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas son la región de decodificación del ARN mensajero y el ARN de transferencia en la subunidad 30S, el núcleo de la peptiltransferasa en la subunidad 50S, la formación del ribosoma 70S por el complejo de iniciación 30-50S y el proceso de elongación del aminoácido en un polipéptido [65, 66].

c) Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos. Unos antibióticos inhiben específicamente las enzimas bacterianas que desenrollan la doble hélice del ADN, separando las dos hebras para que el ADN pueda hacer una copia de sí mismo. Si este proceso no ocurre, se bloquea la replicación. Otra clase de antibióticos inhibe la síntesis de ARN al unirse e inhibir una enzima llamada ARN polimerasa. Esta enzima transfiere las instrucciones que llevan los genes a la molécula intermediaria, el ARNm. La interferencia en este proceso finalmente detiene la producción de nuevas proteínas [62, 63, 64].

d) Inhibición de la síntesis de folato. El folato es necesario para la síntesis de Timina, que a su vez es un componente esencial del ADN [66]. La reacción comienza cuando el folato es reducido a *dihidrofolato* (DHF) que a su vez es reducido a *tetrahidrofolato* (THF). Las enzimas *Dihidropteroato sintasa* (DHPS) catalizan el primer paso de la ruta y las enzimas *Dihidrofolato reductasa* (DHFR) el último, por lo tanto, las reacciones dependientes de folato son importantes en el metabolismo y en las vías biosintéticas. [67, 65, 66].

Conocer los mecanismos de acción por los cuales los antibióticos eliminan las pobla-

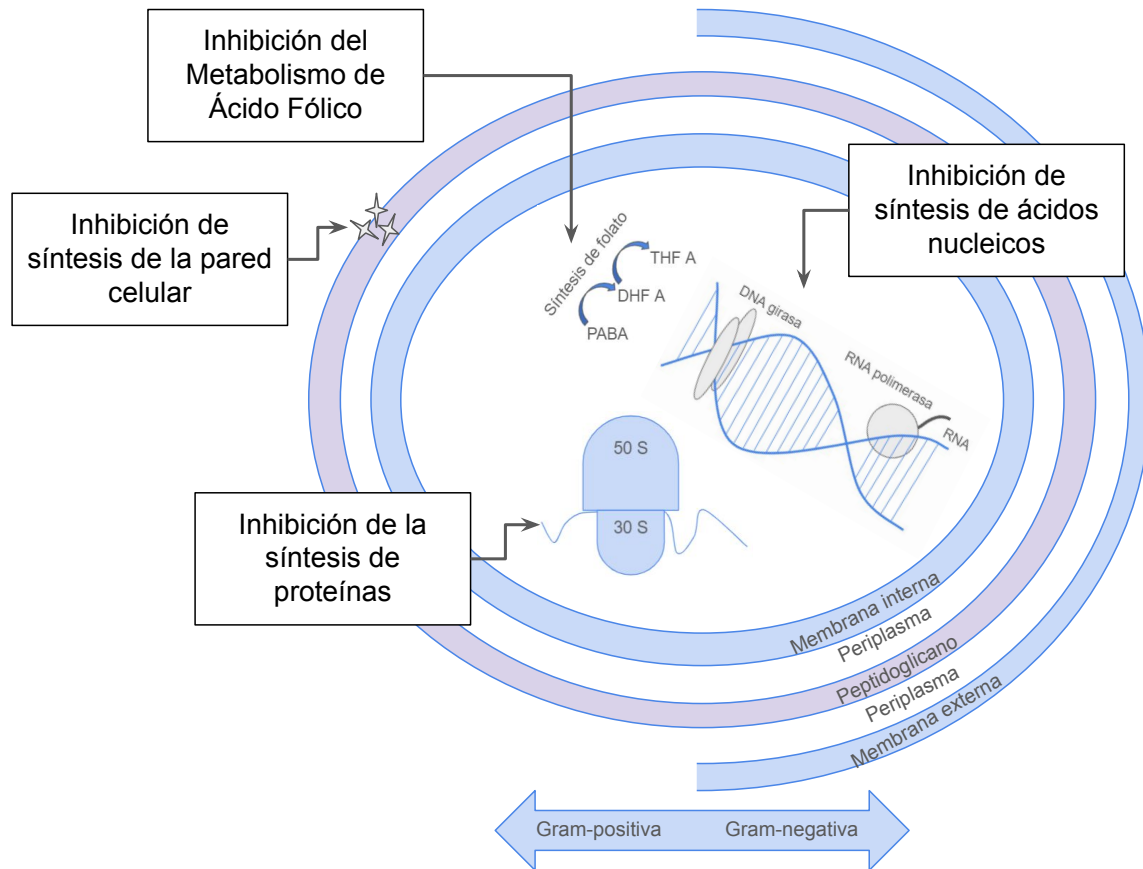


Figura 1.1: Principales mecanismos de acción de los antibióticos. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de pared celular, la síntesis de proteínas y el metabolismo de ácido fólico, donde se bloquea la enzima DHF, inhibiendo la formación de THF.

ciones bacterianas ha sido de utilidad para comprender cómo funcionan los mecanismos de resistencia a los distintos tipos de antibióticos. Actualmente, existe mucha información sobre como las bacterias evolucionan distintos niveles de resistencia.

Mecanismos de resistencia

La resistencia a antibióticos puede ser de forma intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca se refiere a la habilidad innata de una especie bacteriana para resistir la toxicidad de los agentes antimicrobianos a través de un conjunto de herramientas genéticas inheren-

tes, que permiten la tolerancia. Mientras que la resistencia adquirida se produce cuando un microorganismo naturalmente susceptible adquiere la capacidad de tolerar la toxicidad de un determinado antibiótico [68]. Desde una perspectiva evolutiva, las bacterias utilizan dos estrategias genéticas principales para adaptarse al “ataque” de los antibióticos, debido a mutaciones en genes asociados a menudo con el mecanismo de acción del compuesto, y adquisición de ADN extraño que codifica determinantes de resistencia a través de la *transferencia horizontal de genes* (THG).

Las bacterias también pueden desarrollar mecanismos sofisticados de resistencia a los antibióticos, generando mutaciones que alteran el sitio objetivo o degradan los antibióticos, así como la sobre-expresión de bombas de eflujo que excluyen el antibiótico de la célula [62, 69] (Figura 1.2).

Enzimas que degradan o modifican el antibiótico. Las enzimas modificadoras pueden ser mediadas por plásmidos o cromosómica. Muchas especies tienen naturalmente estas enzimas denominadas β -lactamasas mediadas cromosómicamente, pero también existen tipos plasmídicos que son bioquímicamente distintos. Las enzimas pueden modificar, en-cidir o inactivar algunos antibióticos generando así resistencia a ellos [65, 68].

Modificación del blanco del antibiótico. Algunas bacterias se deshacen de la amenaza que representan los antibióticos cuando mutan modificando el objetivo del antibiótico a la insensibilidad mientras conservan sus funciones celulares esenciales [65]. La resistencia a antibióticos puede estar asociada a diferentes genes de resistencia, que pueden ser adquiridos de bacterias que se encuentran en los entornos naturales por THG o sobre-expresión. La mayoría de los blancos de los antibióticos tienen funciones enzimáticas importantes, por lo que los organismos no se pueden deshacer completamente del antibiótico al eliminar las enzimas mediante la pérdida de genes, así que es posible reducir la sensibilidad al antibiótico a través de cambios mutacionales en el blanco. En algunos casos incluso se requiere cambios en el genoma celular para compensar la actividad reducida o alterada de las enzimas blanco [65, 70].

Bombas de eflujo. Las bombas de eflujo forman parte de uno de los mecanismos de resistencia más importante. El antibiótico es expulsado del citoplasma a través de la sobre-expresión de estas bombas. La baja concentración de antibiótico dentro de la célula a menudo no tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano e impone una ventaja

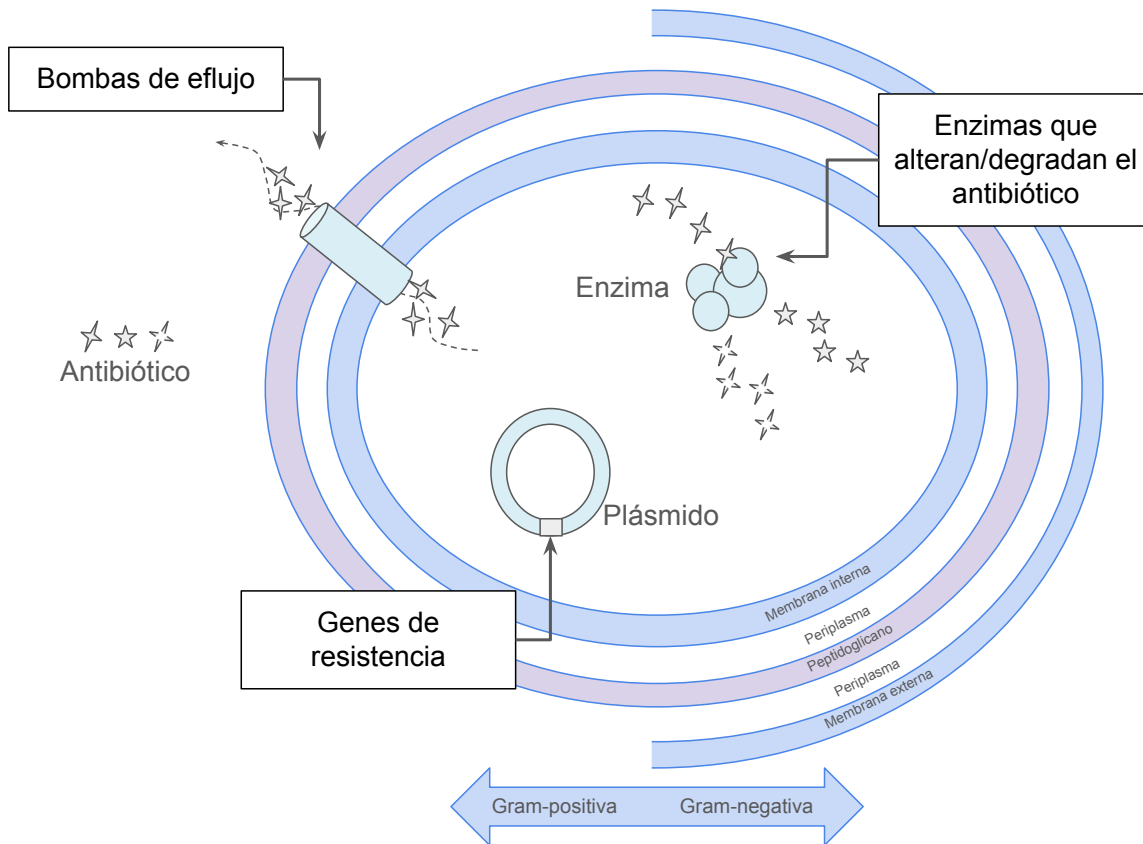


Figura 1.2: Mecanismos de resistencia a los antibióticos. Las enzimas que alteran o degradan los antibióticos, las bombas que expulsan el antibiótico de la célula, la modificación de blancos, así como los plásmidos y genes, son los principales mecanismos de resistencia bacteriana.

selectiva para las cepas resistentes [65, 66, 71]. Algunas bombas son específicas a ciertos antibióticos o clases de antibióticos, sin embargo, las bombas conocidas como bombas de resistencia a múltiples antibióticos, pueden bombear varios antibióticos estructuralmente diferentes [71].

Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son un grupo de antimicrobianos de uso frecuente en la clínica, generalmente se agrupan según su estructura y espectro antimicrobiano. Lo que

distingue a esta familia de antibióticos es la presencia de un anillo β -lactámico en su estructura, que contiene un grupo amino (R-NH-) unido a un anillo secundario, para que el β -lactámico sea activo es necesario la presencia de estos radicales.

Las características propias de este esqueleto, modifican las propiedades del compuesto resultante, dando lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos como las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Las estructuras químicas de estos antibióticos se pueden observar en la Figura 1.3.

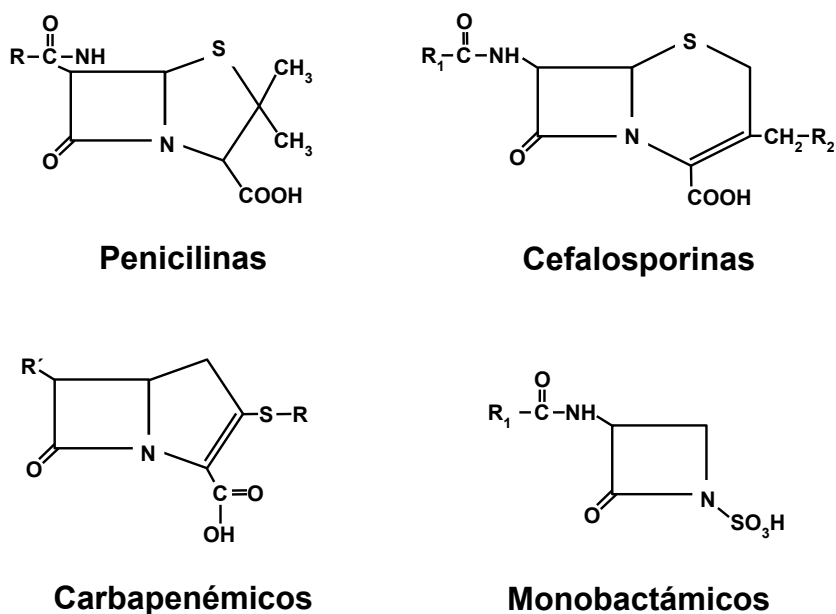


Figura 1.3: Estructuras químicas de los antibióticos β -lactámicos [65].

Los antibióticos β -lactámicos tienen un efecto bactericida, inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana durante el proceso de reticulación del peptidoglicano (PG), esta reacción es catalizada por las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP's). Estos antibióticos actúan inhibiendo la formación del enlace peptídico, mediante la unión del anillo que contiene una amida cíclica, actuando como análogo del compuesto D-alanil-D-alanina durante la acilación de estos enlaces. Los PBP's son inactivados debido a su incapacidad para hidrolizar el enlace creado con el antibiótico [72], en consecuencia la pared celular se debilita modificando el tamaño y forma celular, provocando lisis celular.

Capítulo 2

La tasa de adaptación se correlaciona con la intensidad de la presión selectiva

Con el alarmante aumento de bacterias resistentes a los antibióticos disponibles, estudios recientes se han enfocado en entender los mecanismos por los cuales las bacterias adquieren resistencia a antibióticos, sin embargo, existen múltiples variables que afectan la tasa de mutaciones de resistencia. El cambio evolutivo está regido por la interacción entre la fuerza de selección, el azar y la contingencia histórica en las poblaciones bacterianas, pero es poco lo que se conoce sobre la contribución de estas fuerzas evolutivas [73].

Múltiples estudios se han realizado para comprender la contribución de cada una de las fuerzas evolutivas, donde se utilizan diferentes presiones selectivas cambiando la temperatura, nutrientes [73], la capacidad de evolucionar nuevas funciones, como la capacidad del fago lambda para infectar *E. coli* a través de un nuevo receptor que el virus ancestral no puede utilizar [74], así como la historia evolutiva previa que influye en la evolución posterior a antibióticos [75], o la intensidad con que las presiones selectivas se imponen en el medio [76].

Estos estudios sugieren que la huella de la historia puede eliminarse si la presión de selección es intensa, con esto en mente diseñamos un experimento evolutivo que nos permite adaptar una población bacteriana bajo diferentes intensidades de presión selectiva.

Para conocer las implicaciones de estas fuerzas evolutivas en las dinámicas de adapta-

ción a antibióticos, observados en los cambios fenotípicos y genotípicos en las poblaciones bacterianas, comenzamos por estimar la concentración crítica de antibiótico, de modo que la densidad óptica estuviera por debajo de los límites detectables ($OD_{600} < 0,05$), una cantidad a la que nos referimos como *Concentración Mínima Inhibitoria* (CMI).

Hicimos una curva dosis respuesta que consta de veintidós concentraciones de ampicilina (Tabla Supl. S1). Las diluciones con antibiótico parten de la solución madre a 100 mg/ml que diluimos en agua, preparada de una sal sódica de ampicilina (A0166 de SIGMA). Todas las diluciones seriadas de la curva dosis respuesta fueron preparadas con medio mínimo M9 (1 gr/L de casaminoácidos, 2 gr/L de glucosa como nutrientes y 5 % de glicerol). El medio fue suplementado con glicerol para conservar las muestras en congelación. Con la ayuda de un robot pipeteador OpenTrons (OT-1 Robot), generamos scripts personalizados en Python (Ver Script de Python en Material Suplementario). Todos los experimentos fueron realizados en microplacas de titulación de 96 pozos.

Una vez establecida la CMI en $2 \mu\text{g/ml}$, seleccionada por ser la concentración anterior a la extinción de la población bacteriana, como podemos observar en la Figura 2.1, comenzamos con el protocolo de evolución experimental adaptado de [54].

Utilizamos ocho poblaciones isogénicas de MG1655 para ser seleccionadas mediante dos regímenes: cuatro poblaciones fueron transferidas a una *selección media* (MS), donde las poblaciones que se transfieren al día siguiente son las expuestas a una concentración de antibiótico por debajo del 50 % de inhibición y un régimen de *selección fuerte* (SS), donde las otras cuatro poblaciones transferidas se obtienen del ambiente con la concentración más alta de antibióticos que exhibe un crecimiento observable (Figura 2.2). Las poblaciones fueron transferidas cada día durante esta fase denominada FASE 1 siguiendo las mismas reglas hasta que alcanzaron niveles de resistencia diez veces mayor que la CMI de la cepa silvestre.

Al modificar la intensidad de presión selectiva podemos encontrar cambios a nivel fenotípico, que afectan directamente la dinámica de adaptación. En la Figura 2.3 se observa que las trayectorias evolutivas de todas las poblaciones para ambos regímenes de selección alcanzaron niveles análogos de resistencia, independientemente de la intensidad de presión selectiva utilizada. Sin embargo, el número de transferencias necesarias antes de lograr un aumento de diez veces en la resistencia a ampicilina fue drásticamente diferente en ambos casos. En el régimen de selección media, este nivel de resistencia se alcanzó después de 22

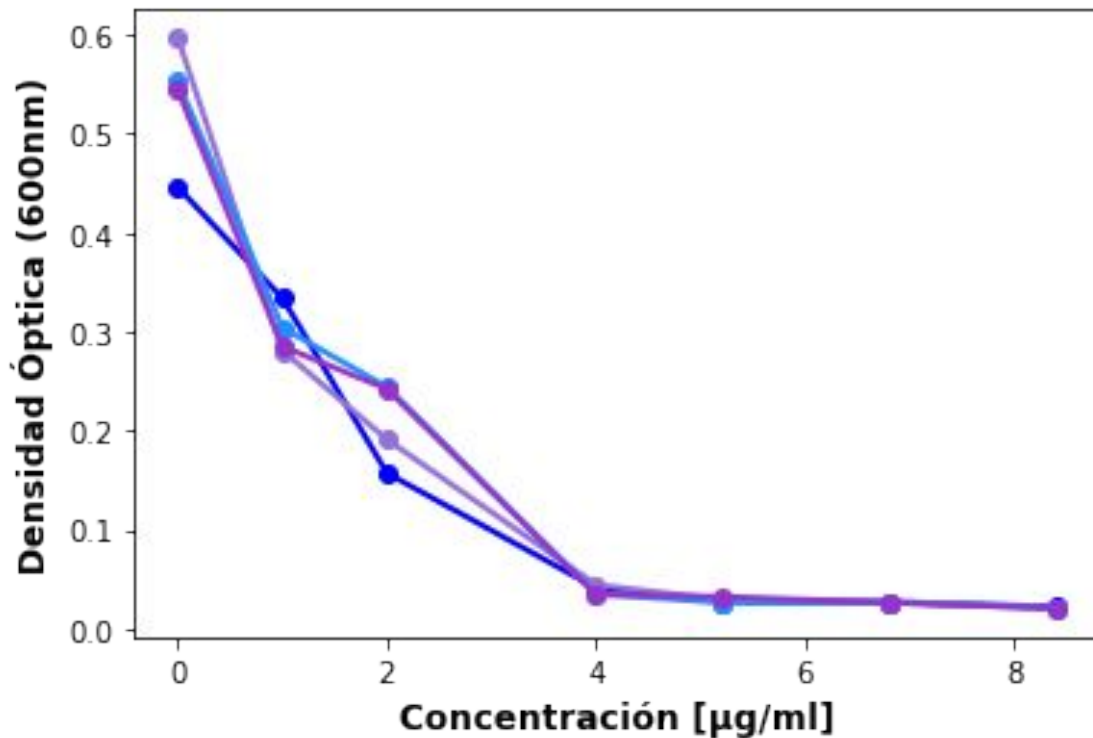


Figura 2.1: Curva dosis respuesta de la cepa silvestre MG1655 en ampicilina, donde establecimos su CMI en 2 $\mu\text{g/ml}$. Cada línea representa una réplica, denotamos con puntos el crecimiento en densidad óptica (eje Y) en cada concentración (eje X).

días, mientras que las poblaciones expuestas al régimen de selección fuerte alcanzaron el mismo nivel de resistencia después de 7 días. Es decir, partiendo de una población clonal, se alcanzaron niveles de resistencia similares para todas las réplicas bajo ambos regímenes de selección. Sin embargo, cada una de las poblaciones lo hizo de forma diferente.

Para las poblaciones bajo MS, la dinámica de adaptación a ampicilina fue lenta y escalonada, teniendo tiempo suficiente de exposición al antibiótico donde probablemente se permite la expresión y fijación de mutaciones de resistencia. Mientras que para SS se observa una dinámica de adaptación contraria, siendo abrupta y rápida, promoviendo que las mutaciones que sean expresadas en las poblaciones sean mutaciones de supervivencia, ya que tienen mayor presión selectiva.

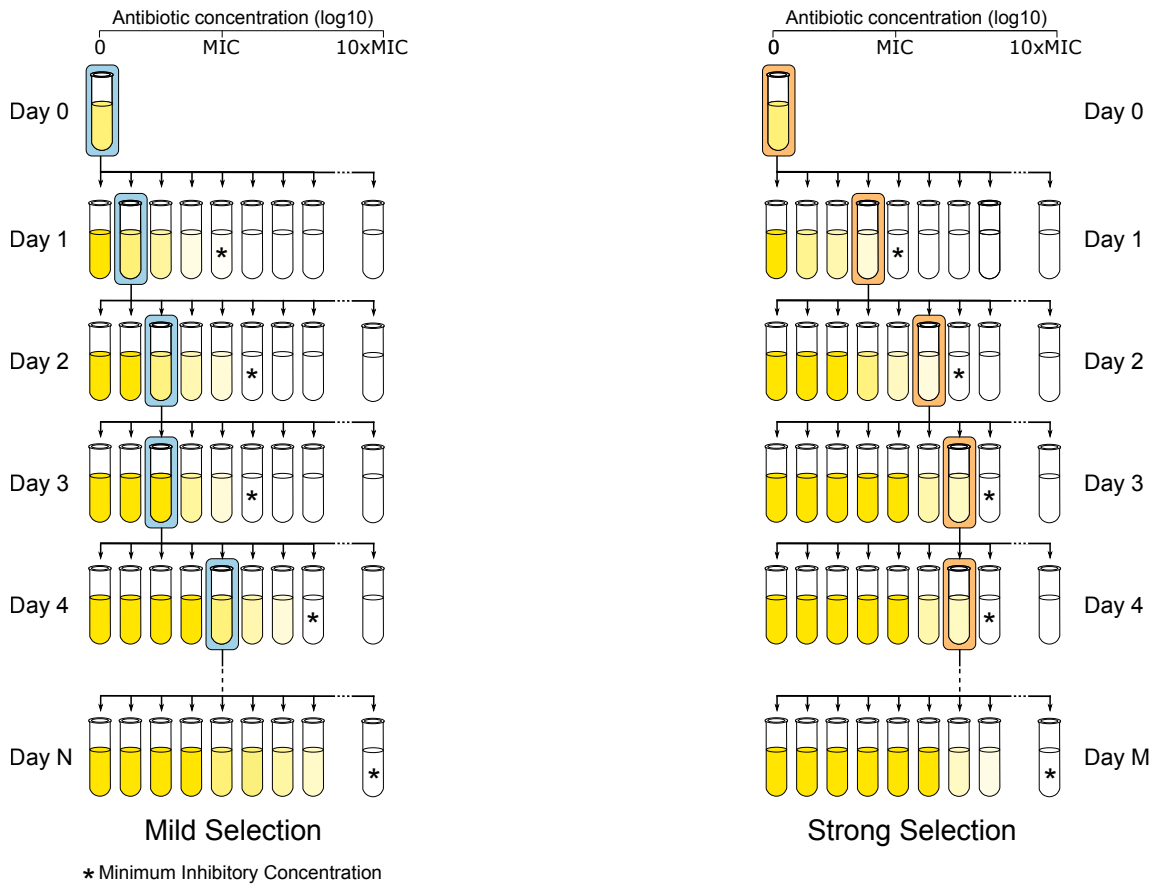


Figura 2.2: Ilustración esquemática del protocolo de evolución adaptativa utilizado para evaluar la tasa de adaptación en diferentes presiones selectivas. Selección media (a la izquierda) que consiste en realizar un experimento dosis-respuesta y transferir cada día la población que exhibió no más del 50% de inhibición con respecto a las cepas que no percibieron antibiótico (recuadro azul). La CMI, que corresponde a la concentración crítica de antibiótico, de manera que no se detecta crecimiento bacteriano (indicado con un asterisco). El experimento de dilución en serie se realizó hasta lograr un aumento diez veces mayor que la cepa silvestre. Para el régimen de selección fuerte (a la derecha), la población que sobrevivió a la concentración más alta de antibiótico (recuadro naranja) se transfirió a medio sin antibiótico y a las mismas concentraciones de antibiótico que para selección media hasta observar un aumento de diez veces en la resistencia con respecto al primer día.

Como se menciona previamente, las poblaciones bacterianas evolucionadas en ampicilina bajo el régimen de selección fuerte adquirieron resistencia más rápidamente. Esto sugiere que desarrollaron un paisaje adaptativo diferente a las poblaciones bajo selección media y, por lo tanto, se presentan diferencias genotípicas importantes entre los regímenes

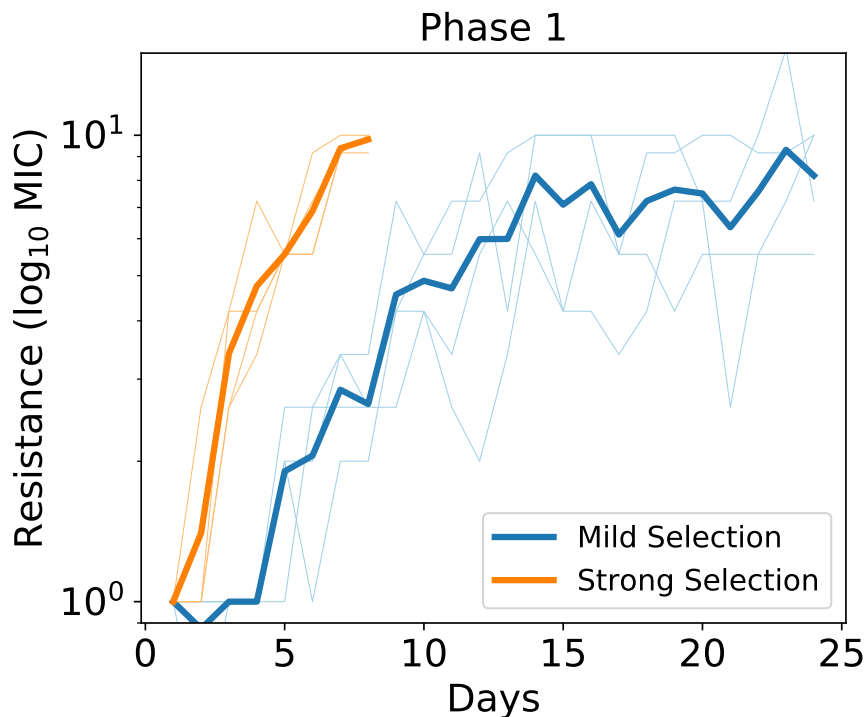


Figura 2.3: Niveles de resistencia (incremento en la CMI) en función del tiempo para ambos regímenes de selección. Se puede observar como el nivel de resistencia bajo el régimen de selección fuerte (línea naranja) alcanzó el mismo nivel de resistencia en menor tiempo que en el régimen de selección media (línea azul). Cada línea denota una réplica independiente, con el promedio representada con una línea gruesa.

de selección. Para observar las diferencias genotípicas entre ambos regímenes de selección, secuenciamos todo el genoma de las poblaciones evolucionadas y la cepa ancestral (que en ningún momento fue expuesta al antibiótico).

Para las poblaciones bajo el régimen de selección media (MS) identificamos siete mutaciones en seis diferentes genes con una frecuencia mayor al 10%. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 2.4, solo dos de estas mutaciones se encontraron al 100%. Una en el gen *ftsI* involucrado en la división celular [77] que ha sido previamente reportado como un determinante de resistencia a antibióticos β -lactámicos [54, 78, 79, 80], y otra en el gen *phoQ* que forma parte de un sistema de dos componentes involucrado en la adaptación a ambientes de bajo magnesio y estrés ácido, además de resistencia a péptidos catiónicos y aminoglucósidos en *Pseudomonas aeruginosa* [81].

También observamos dos mutaciones en el gen *mgrB/yobH*, una de ellas con el 91.1 % y la otra con el 71.9 % de frecuencia, reportados en conjunto como genes de resistencia a tetraciclina [82]. Aunque aún es desconocida la función del gen *yobH*, el gen *mgrB* codifica una pequeña transmembrana (MgrB) producida tras la activación del sistema de señalización PhoQ/PhoP [83].

Se ha reportado que el gen *mgrB* potencia la resistencia a colistinas [84] e incrementa la adaptación en medios ambientes estresantes al remodelar el lípido A de la membrana externa [85, 86, 87, 88], debido a esto, suponemos que es un mecanismo para responder a las altas concentraciones en el medio, haciendo a la célula impermeable contra el antibiótico.

Identificamos tres mutaciones en menor frecuencia, primero la mutación en los genes *clpX/Ion* con solo 65.3 % de frecuencia. La proteína ClpX dirige a la proteasa ClpP a sustratos específicos, como ATP [89], se ha reportado que ClpX actúa como un regulador adicional de la proteína FtsZ [90] modulando la dinámica del polímero FtsZ de una manera independiente de ATP, lo que se logra mediante la interacción entre el dominio N-terminal de los monómeros u oligómeros ClpX y FtsZ, inhibiendo el ensamblaje de FtsZ generando así un remodelamiento [91, 92]. Además, se ha reportado que la inactivación del gen *clpX* confiere resistencia a múltiples antibióticos, entre los que se encuentra ampicilina [93], por lo que bajo condiciones de estrés se permite la división celular.

Mientras que una mutación en el gen *Ion*, que codifica la serina proteasa Lon, dependiente de ATP, al ser inactivada, puede proporcionar perfiles de resistencia a antibióticos al codificar la expresión de la bomba de eflujo AcrAB-TolC [94, 95, 96].

Otra mutación identificada fue en la que afecta los genes *dauA/prs*, con una frecuencia relativamente baja, 29.6 %, estos genes conforman el operón *prs-dauA* y entre ellos podemos encontrar un sitio de terminación de transcripción que pueden variar su grado de lectura dependiendo del medio ambiente en el que se encuentre la célula, ya que el gen *dauA* codifica para el transporte del ácido dicarboxílico C4, el cual media el transporte de succinato. Con la acumulación de succinato, el medio se acidifica y debe expulsarse de la célula, requiriendo la expresión de *dauA* y *prs* [97].

Finalmente, la mutación en el gen *dnaX*, que codifica las subunidades tau y gamma de la ADN polimerasa (III) [98], aunque con una frecuencia de 10.1 % es posible que una mutación en este gen de como resultado muchos errores en la replicación y muchos errores causen demasiadas mutaciones en varios genes. Si bien este gen no ha sido reportado como

gen de resistencia a ampicilina, se ha reportado su expresión en estudios realizados con cefoxitina [54], un antibiótico β -lactámico que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular [99].

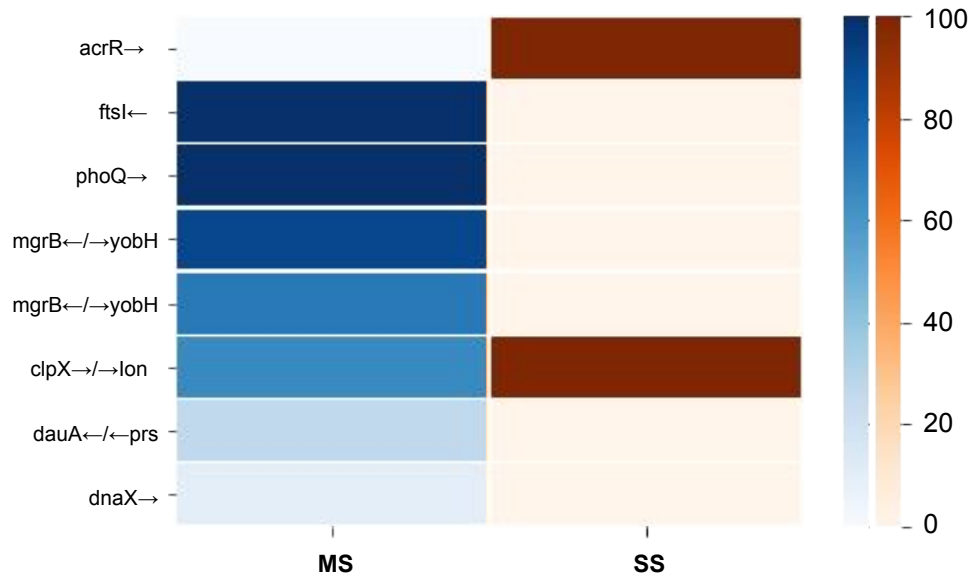


Figura 2.4: Mapa de color que muestra las mutaciones identificadas para cada régimen de selección, mediante la secuenciación de todo el genoma de las poblaciones de la FASE 1. MS en color azul a la izquierda y SS a la derecha en naranja. Las filas corresponden a los genes de resistencia, mientras que las columnas representan el régimen de selección. La intensidad del color representa la frecuencia con que cada mutación está presente en los genes. Observamos que para MS hay mayor expresión de mutaciones que para SS, compartiendo la mutación que afecta los genes *clpX/lon*, que codifican la expresión de proteínas involucradas en transporte y división celular.

Para las poblaciones bajo el régimen de selección fuerte (SS), identificamos dos mutaciones (Figura 2.4); una en el gen *acrR* que regula negativamente la transcripción del operón *acrAB*, operón de la bomba de eflujo involucrada en el transporte de múltiples antibióticos. La expresión aumenta en condiciones generales de estrés [100]. La segunda mutación identificada en SS fue la que afecta los genes *clpX/lon*, que codifican para las proteasas involucradas en la hidrólisis de ATP para generar fuerza mecánica y trasladar polipéptidos a través de su poro central [101, 102]. Es conocido que este tipo de mutaciones genera altos niveles de resistencia, ya que por estos poros también se expulsa al antibióti-

co. Nuestros resultados son consistentes con estudios previos [54] donde se demuestra que la fuerza de selección es un factor importante que puede aumentar la resistencia a antibióticos.

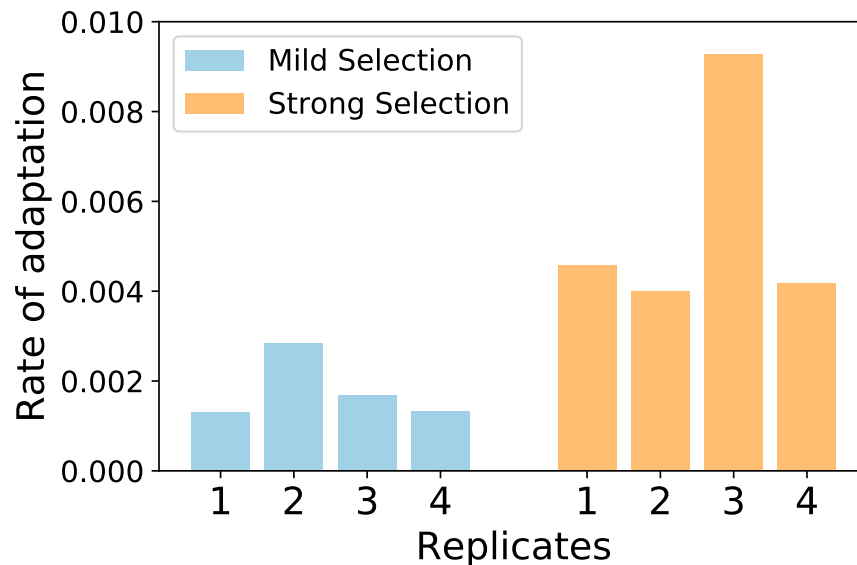


Figura 2.5: Tasa de adaptación de las diferentes réplicas en nuestro experimento. Las barras azules corresponden a las réplicas adaptadas bajo una selección media y las naranjas en el régimen de selección fuerte.

Como se puede observar en la Figura 2.3, la intensidad de la presión selectiva tiene una influencia directa sobre la rapidez con que una población bacteriana incrementa sus niveles de resistencia. Al igual que en estudios previos [103, 55], definimos como la tasa de adaptación en un experimento de N días duración en términos de la mejora de la resistencia total, $\Delta\text{MIC} = \text{MIC}_N - \text{MIC}_0$, y el tiempo interpolado en el cual la resistencia de la población alcanzó la mitad de su valor máximo, t_{adapt} . Entonces decimos que la tasa de adaptación de esta población bacteriana a este régimen de selección es $\rho = \Delta\text{MIC}/(2 * t_{\text{adapt}})$.

Como se ilustra en la Figura 2.5, a pesar de que todas las poblaciones bacterianas tienen un grado similar de resistencia, su tasa de adaptación es diferente; para las réplicas evolucionadas bajo una selección fuerte es mayor (promedio $\rho = 0,006$, s.e. = 0,0001, $n = 4$) que las réplicas evolucionadas en el régimen de selección media (promedio $\rho = 0,002$, s.e. = 0,0003, $n = 4$). Estos resultados sugieren que los mecanismos de resistencia a antibióticos son diferentes dependiendo del régimen selectivo, donde podemos encontrar mu-

taciones generalistas o específicas, pero costosas metabólicamente [54]. Sin embargo, la presencia de mutaciones beneficiosas pueden compensar el costo de resistencia [60], siendo probable encontrar este tipo de mutaciones en nuestras poblaciones haciendo epistasis entre los genes encontrados en este trabajo. Ahora sabemos que las poblaciones bacterianas son fenotípicamente iguales en cuanto a su nivel de resistencia, aunque han sido seleccionadas en diferentes regímenes de selección, pero son genotípicamente diferentes, por los diferentes perfiles mutacionales adquiridos que se reflejan en su tasa de adaptación.

Capítulo 3

La estabilidad de resistencia en ausencia de antibióticos depende de la velocidad de adquisición de resistencia previa

La tasa de adquisición de resistencia a antibióticos está sujeta a variables como la intensidad de presión selectiva, como se demuestra en el Capítulo 2. Cuando un ambiente es modificado sustancialmente, como en el caso de tratamientos con antibióticos, la resistencia puede desarrollarse a través de la acumulación de múltiples mutaciones [51]. Estas mutaciones se encuentran extendidas en las poblaciones bacterianas diferenciadas por la intensidad de presión selectiva (para SS, se favorece a un genotipo raro que puede sobrevivir al estrés y, por el contrario, MS, puede mantener mayor diversidad genética, lo que permite la exploración de rutas mutacionales alternativas).

Es conocido que las mutaciones que confieren resistencia a los antibióticos suelen ser costosas en ausencia de éste [60]. En este capítulo estudiaremos la influencia de la intensidad de presión selectiva en la estabilidad de resistencia en ausencia de selección.

Para evaluar el comportamiento de las poblaciones bacterianas en ausencia de antibiótico, continuamos el protocolo de diluciones seriadas durante ocho días adicionales (Figura 3.1 A). Esta fase, donde la presión selectiva es retirada del medio, la denominamos FASE 2. Partimos de las poblaciones que durante la FASE 1 (cuatro poblaciones de MS, cuatro poblaciones de SS) aumentaron aproximadamente diez veces su nivel de

resistencia; Cada población tuvo un control que no percibió antibiótico durante todo el experimento. Pero, para conocer la influencia que la intensidad de presión selectiva tiene en la estabilidad de resistencia; 20 μ l del volumen total de estas poblaciones fueron inoculados en 180 μ l de medio M9 y después de 22 horas de crecimiento este cultivo se diluyó 1:5 en medio fresco. Una vez realizadas estas diluciones, inoculamos 20 μ l de cada dilución en el mismo rango de concentraciones utilizadas durante la FASE 1 (Tabla S1), así durante ocho días repetimos este protocolo donde estimamos el cambio en la susceptibilidad de las poblaciones a ampicilina por medio de la CMI.

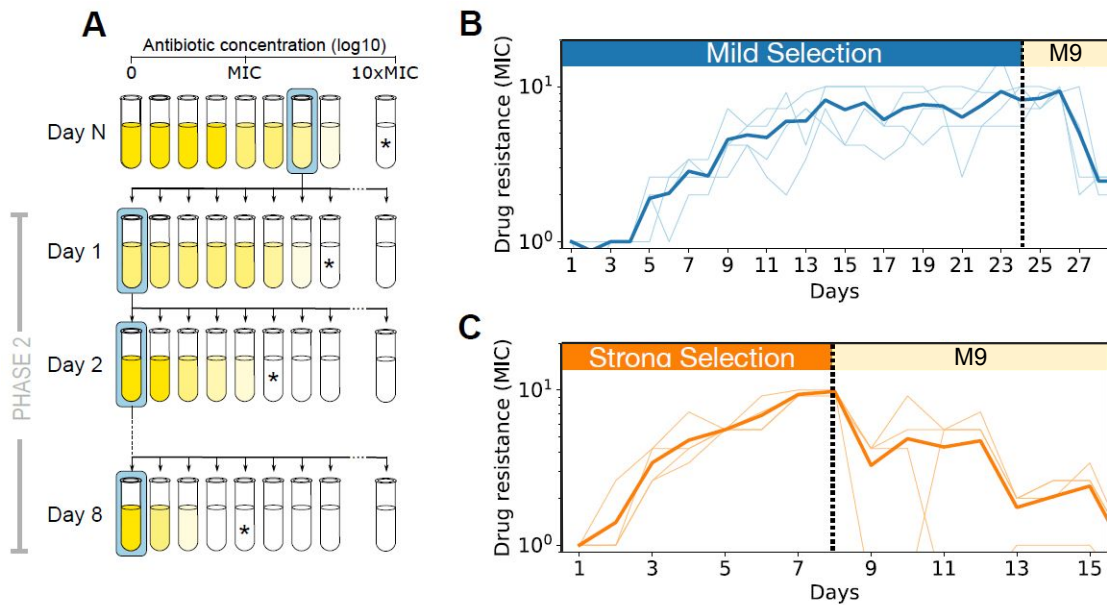


Figura 3.1: Trayectorias evolutivas de las poblaciones sin presión selectiva. A) Ilustración esquemática de la FASE 2 de nuestro experimento, que consiste en hacer diluciones seriadas por ocho días sin antibiótico en poblaciones evolucionadas obtenidas de la FASE 1 (poblaciones con $\sim 10xMIC$ de la cepa ancestral). Las poblaciones evolucionadas bajo B) Selección media en azul y C) Selección fuerte en naranja provenientes de la FASE 1 muestran una reducción en la resistencia cuando el antibiótico es retirado del medio. Las barras en la parte superior, en azul (MS) o naranja (SS) indican la fase selectiva, mientras que la barra amarilla indica cuando el antibiótico se retira del medio, las líneas delgadas representan las réplicas y la gruesa el promedio de las poblaciones.

Cuando el antibiótico fue retirado del medio, observamos que el nivel de resistencia disminuyó en solo ocho días para ambos regímenes de selección, como se observa

en la Figura 3.1 B (MS en azul) y C (SS en naranja), de esta forma demostramos que fenotípicamente, las poblaciones bacterianas en ausencia de presión selectiva regresan a niveles de resistencia similares a la cepa silvestre. Observamos que para ambos regímenes de selección, hay una reducción significativa de la resistencia en relación con los niveles presentados al final de la FASE 1 (prueba t de dos colas, valor de $p < 0,05$, $gl = 6$).

Para comprobar si este comportamiento se mantenía sin importar el nivel de resistencia final, seleccionamos poblaciones de diferentes días, provenientes de la FASE 1, en las que observamos un incremento en el nivel de resistencia. Estas nuevas poblaciones fueron sometidas al mismo protocolo experimental (3.1 A), en donde se retiró el antibiótico, para después comprobar si la susceptibilidad al antibiótico disminuía, según lo observado previamente.

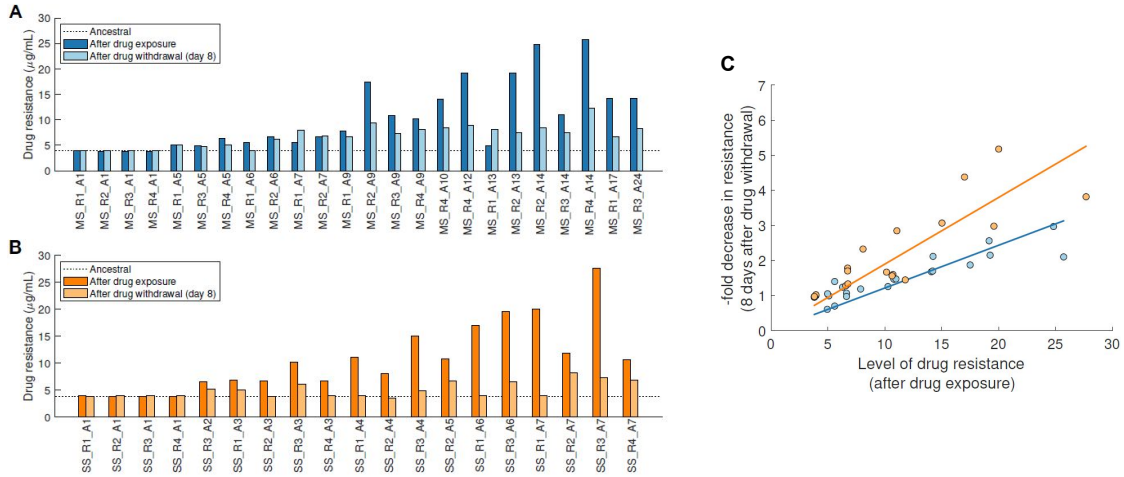


Figura 3.2: Estabilidad de resistencia sin presión selectiva. A) Poblaciones bajo selección media con diferentes niveles de resistencia durante la Fase 1 (barras azul intenso) y después de 8 días de retirar el antibiótico del medio (barras azul claro). B) Poblaciones bajo selección fuerte con diferentes niveles de resistencia durante la Fase 1 (barras naranja intenso) y después de 8 días de retirar el antibiótico del medio (barras naranja claro). C) La reducción de resistencia está correlacionada negativamente con el nivel de resistencia alcanzado en la Fase 1. Cada punto corresponde a una población con diferentes niveles de resistencia antes y después de retirar la presión selectiva del medio. Las líneas denotan la regresión lineal de mejor ajuste para cada régimen ($R^2 = 0.844$ y $R^2 = 0.714$ para MS y SS, respectivamente).

En la Figura 3.2 A (MS en azul) y B (SS en naranja), se observa que entre mayor fue el nivel de resistencia, mayor fue la reducción en ausencia de antibiótico, sin embargo, las poblaciones bajo ambos regímenes de selección disminuyeron el nivel de resistencia.

En la Figura 3.2 C, donde cada punto en azul (MS) y naranja (SS) representa los distintos niveles de resistencia adquiridos durante la FASE 1, podemos observar que la resistencia disminuyó más rápidamente en las poblaciones que evolucionaron bajo selección fuerte que en las poblaciones bajo selección media. Después de ocho días de retirar el antibiótico del medio, las poblaciones que evolucionaron bajo SS presentaron, en promedio, una disminución del 73 % en la resistencia, mientras que las poblaciones bajo MS sólo presentaron una reducción del 47 %. Esto es consistente con estudios previos que han demostrado que cuanto mayor es la presión selectiva, más rápidamente se pierde la resistencia [104].

Encontramos que independientemente de la presión selectiva impuesta, la estabilidad de resistencia parece estar correlacionada negativamente con el nivel de resistencia a antibióticos adquirido por las poblaciones durante la FASE 1 de nuestro experimento (Figura 3.2 C, $R^2 = 0,844$ para MS, y $R^2 = 0,714$ para SS). Lo que indica que aunque bajo ambos regímenes se observó una disminución en el nivel de resistencia al retirar el antibiótico, las poblaciones que evolucionaron bajo una fuerte selección mostraron mayor reducción en la resistencia, lo que sugiere que las mutaciones de resistencia adquiridas durante la selección fuerte podrían ser más costosas que las mutaciones seleccionadas bajo selección media, siendo más estables en ausencia de antibiótico.

Para conocer el perfil mutacional, secuenciamos las poblaciones después de ocho días de ser retirado el antibiótico del medio, para ambas intensidades de presión selectiva. Como se observa en la Figura 3.3, para presiones selectivas medias identificamos cuatro mutaciones con una frecuencia al 100 % que afectan los genes, *ftsI*, *phoQ*, *dauA/prs* y *mgrB/yobH*, también observados durante la primera fase.

Sin embargo, las mutaciones que afectan los genes *dauA/prs* (involucrados en el metabolismo y transporte tanto de iones inorgánicos como de aminoácidos [105, 106]) y *mgrB/yobH*, estaban presentes desde la primera fase y aumentaron en frecuencia al retirar el antibiótico. Además, identificamos tres mutaciones más en menor frecuencia: en el gen *ygfB*, aunque de función desconocida, se presume que por su estrecha asociación con *pepP*, participa en procesos de patogenicidad [107], *fadJ*, un gen esencial para transporte, activación y β -oxidación de ácidos grasos [108] y *rpsE* que juega un papel importante en la precisión translacional, ciertas mutaciones en este gen se caracterizan por una disminución de la tasa de crecimiento, un aumento de la sensibilidad a la estreptomicina y un aumento de los errores de traducción [109].

Para presiones selectivas fuertes, identificamos cinco mutaciones, dos de estas mutaciones afectaron los genes *clpX/lon* y *acrR*, identificadas en la primera fase con una frecuencia del 100%, mientras que cuando el antibiótico fue retirado del medio la frecuencia de estas mutaciones se redujo. También identificamos una mutación en el gen *ttdr*, que codifica una proteína integral de la membrana interna (implicada en la captación de tartato para su conversión a oxalacetato necesario para el crecimiento anaeróbico en glicerol como fuente de carbono en presencia de tartrato) [110], además de mutaciones en los genes *yafD* de función aún desconocida y *proY/malZ* que participan en metabolismo y transporte de aminoácidos y carbohidratos.

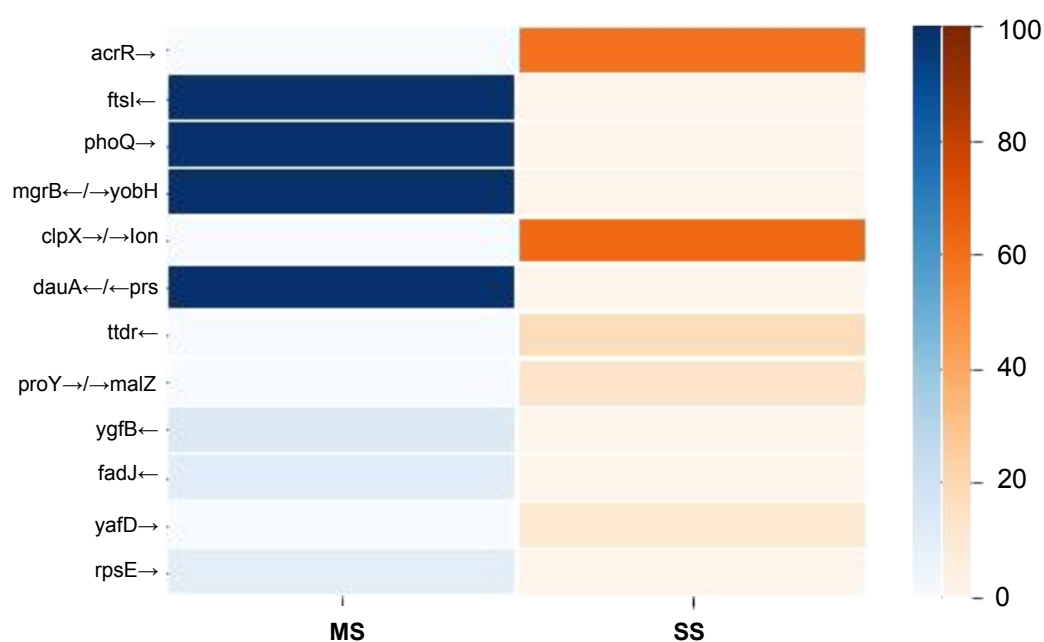


Figura 3.3: Mapa de color que muestra las mutaciones identificadas para cada régimen de selección, mediante la secuenciación de todo el genoma de las poblaciones de la FASE 2. MS en color azul a la izquierda y SS a la derecha en naranja. Las filas corresponden a los genes de resistencia, mientras que las columnas representan el régimen de selección. La intensidad del color representa la frecuencia con que cada mutación está presente en los genes. Observamos que para MS hay mayor expresión de mutaciones que para SS.

Las mutaciones presentadas durante esta fase, se mantuvieron en ambas presiones de selección a pesar de que el antibiótico fue retirado del medio, sin embargo, las mutaciones bajo MS se mantuvieron e incluso dos de las que estaban en menor frecuencia aumentaron

durante esta fase. Mientras que las poblaciones bajo SS aumentaron el número de mutaciones de la primera a la segunda fase, pero la frecuencia de las dos mutaciones que estaban al 100 % en la FASE 1 disminuyó. Lo que sugiere que las poblaciones que evolucionaron bajo una presión de selección media podrían ser más estables cuando el antibiótico se retira del medio, debido a que el costo asociado a estas mutaciones es menor o el tiempo de adaptación mayor. Se sabe que a medida que aumenta la selección, aumenta el beneficio asociado con las mutaciones de resistencia a antibióticos y, por lo tanto, se reduce la diversidad genética, lo que explica el menor número de mutaciones identificadas en las poblaciones bajo SS.

Para explorar a fondo el perfil mutacional encontrado en las poblaciones bajo ambas intensidades de presión selectiva, secuenciamos 45 clonas representativas de las poblaciones evolucionadas al final de la FASE 1 y 2, con sus respectivos controles. Para la selección de estas clonas tomamos dos réplicas de cada régimen, para MS la réplica uno y cuatro, mientras que para SS la réplica uno y tres. 150 μl de muestra fueron inoculados en cajas de Petri con medio LB. Tomamos cada una de las colonias que crecieron y las disolvimos uniformemente en 4 ml de medio fresco; Pusimos 200 μl de cada dilución en una microplaca de titulación que incubamos a 30°C por 24 h utilizando un lector de microplacas SYNERGY, haciendo lecturas cada 20 minutos de densidad óptica (630 nm), de esta forma después de 24 h obtuvimos y analizamos sus tasas de crecimiento. El resto del cultivo fue incubado por 24 h y guardado en congelación para la futura extracción de ADN.

Después de analizar las tasas de crecimiento de cada clon, obtuvimos su *máxima tasa de crecimiento* (max df), dato que utilizamos para seleccionar las clonas que mandamos a secuenciar. Por medio de un algoritmo de K-medias seleccionamos los clones que presentaban una mayor diferencia entre sí, en la Figura 3.4 podemos observar las clonas obtenidas de cada población y su max df. Los puntos encerrados en un círculo negro son las clonas seleccionadas para la secuenciación.

En la Figura 3.5 podemos observar todas las mutaciones identificadas para las clonas secuenciadas en ambos regímenes de presión selectiva. La intensidad del color representa la frecuencia con que las clonas fueron encontradas, en azul están las clonas de las poblaciones bajo MS y en naranja bajo SS.

Cuando retiramos las mutaciones que se encuentran en los controles (cepa silvestre

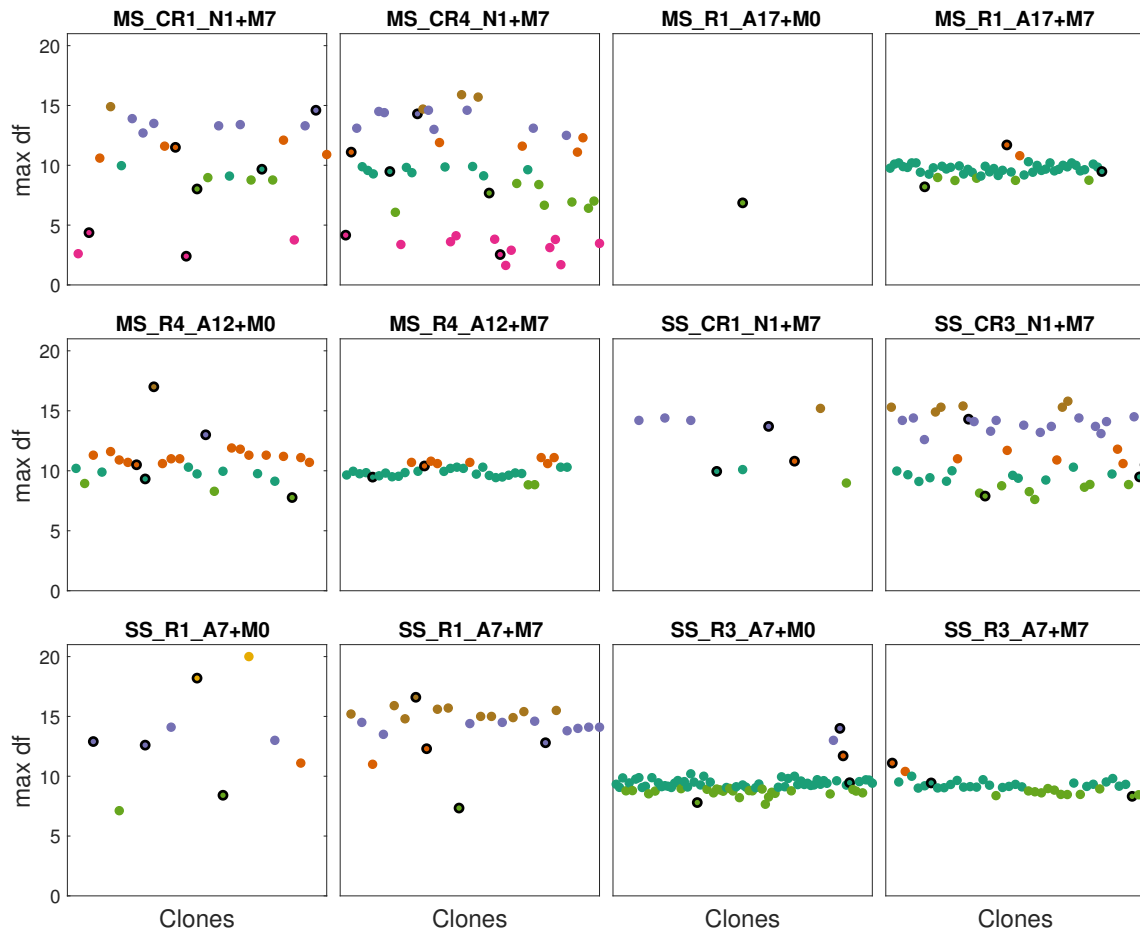


Figura 3.4: Máxima tasa de crecimiento de todas las clonas de cada población. El color de cada punto representa el número de clúster al que pertenecen según el análisis, los puntos encerrados en un círculo negro representan las clonas que son potencialmente diferentes entre sí, según la max df alcanzada.

que fue sometida a los mismos días de evolución que las muestras, pero que no percibió antibiótico en ningún momento, círculo blanco), observamos que para presiones selectivas medias, las mutaciones *phoQ* y *ftsI* estuvieron presentes en el 40 y 50% de las clonas durante la FASE 1 y 2 respectivamente. Además, de ser las mismas mutaciones encontradas para en este régimen de selección en las poblaciones secuenciadas.

Para presiones selectivas fuertes encontramos las mutaciones que afectan los genes *dauA/prs*, *rhcC* y *typA/glnA* durante la FASE 1. Sin embargo, al retirar el antibiótico no fueron encontradas, lo que sugiere que la estabilidad de resistencia es menor al retirar la

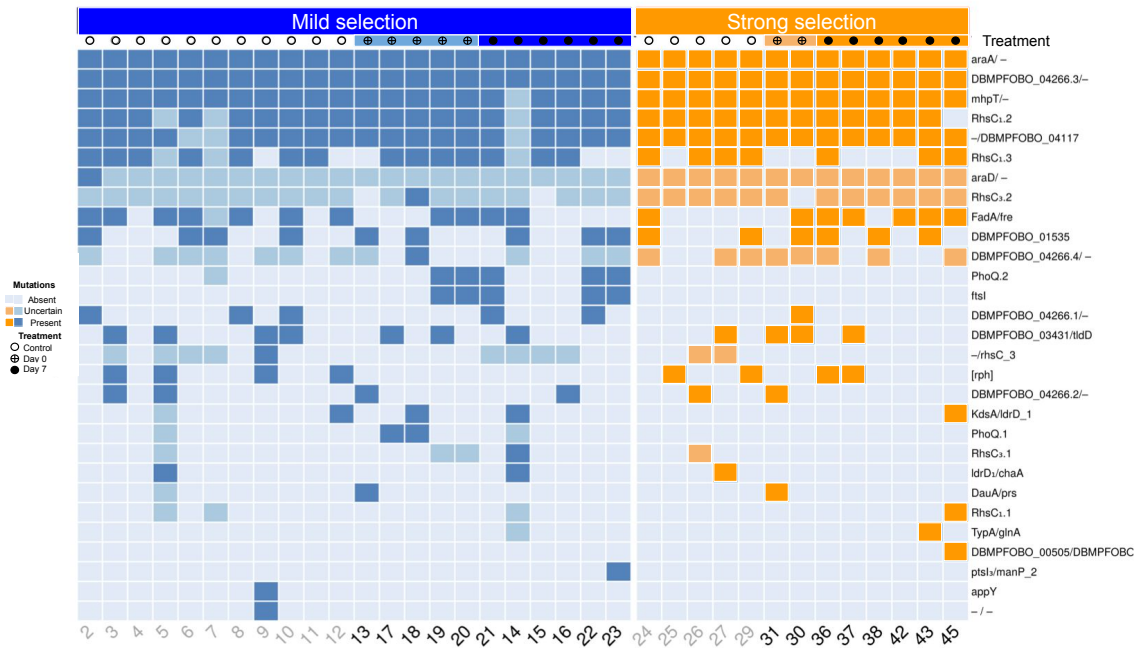


Figura 3.5: Mapa de color que muestra las mutaciones identificadas para cada régimen de selección, mediante la secuenciación de clones obtenidas de las poblaciones evolucionadas. Selección media en color azul a la izquierda y selección fuerte a la derecha en naranja. Las filas corresponden a los genes de resistencia, mientras que las columnas representan los clones. El tratamiento de cada clon está indicado con círculo blanco (cepa silvestre que nunca percibió antibiótico), círculo con cruz (clonas de las poblaciones de la FASE 1) y círculo negro (clonas de las poblaciones de la FASE 2).

presión selectiva y que el costo de las mutaciones identificadas durante la primera fase se asocian con un mayor costo de *fitness*.

Capítulo 4

La aceleración de la resistencia a antibióticos depende de la historia evolutiva

En el capítulo anterior, mostramos que cuando el antibiótico es retirado del medio, las poblaciones bacterianas reducen el nivel de resistencia alcanzado durante la primera fase del experimento. Estas poblaciones bacterianas evolucionadas demuestran tener propiedades fenotípicamente similares en cuanto al nivel de resistencia, a pesar de ser genotípicamente diferentes.

Asumiendo estas características fenotípicas y genotípicas como parte de las poblaciones bacterianas, donde una población puede generar distintos caminos evolutivos, que afectan de manera diferencial los patrones de resistencia a sustancias antimicrobianas, así como la adaptación en medios sin antibiótico, observamos que las fuerzas evolutivas como la presión selectiva tiene influencia directa sobre la adquisición y estabilidad de resistencia. Sin embargo, existen otras fuerzas evolutivas, tales como la historia, que pueden promover o limitar los resultados evolutivos.

Para estimar la tasa de adaptación a antibióticos después de retirar la presión selectiva (FASE 2), continuamos el experimento evolutivo siguiendo el mismo protocolo utilizado durante la primera fase: la selección de las poblaciones que estaban bajo el régimen de

selección media (MS), continuaron siendo seleccionadas a una concentración por debajo del 50% de inhibición, mientras que las poblaciones bajo el régimen de selección fuerte (SS) fueron seleccionadas de la última concentración donde aún se observaba crecimiento. Se utilizó el mismo rango de concentraciones que durante la FASE 1 (Tabla Sup. S1) y la exposición a antibiótico para ambos regímenes de selección fue de doce días, la cual la denominamos FASE 3.

Cada día estimamos la CMI y como observamos previamente, cuando la presión selectiva está presente en el medio, el nivel de resistencia aumenta. Al igual que la *Fase 1* el experimento evolutivo se realizó hasta que las poblaciones aumentaron al menos diez veces su nivel de resistencia.

En la Figura 4.1 podemos observar que el nivel de resistencia aumenta en todas las poblaciones, sin importar el régimen de selección utilizado. Las poblaciones bajo el régimen de selección media alcanzaron una CMI promedio de 12.8, s.e.= 4.3, mientras que las poblaciones bajo selección fuerte tienen una CMI promedio de 13.4, s.e.= 1.8. También podemos observar que las trayectorias de adaptación fueron similares entre los regímenes de selección, en cuanto al nivel de resistencia, como en la cantidad de días en que todas las poblaciones restablecieron sus niveles de resistencia.

Un panorama general se puede observar en la Figura 4.2, donde se presenta el nivel de resistencia de las poblaciones evolucionadas, durante las tres fases del experimento evolutivo para ambas presiones selectivas. Cada una de estas poblaciones aumentó su nivel de resistencia cuando el antibiótico está presente en el medio (FASE 1 y 3), mientras que cuando el antibiótico fue retirado del medio, el nivel de resistencia disminuyó en ambos regímenes de selección. Sin embargo, existen diferencias significativas entre las poblaciones que evolucionaron bajo presión selectiva fuerte y media.

Aunque durante las FASES 1 y 3 las poblaciones bacterianas alcanzaron niveles similares de resistencia (10 xCMI), uno de los principales hallazgos de este estudio es que la tasa de adaptación de resistencia a ampicilina se aceleró durante la FASE 3 en las poblaciones que se adaptaron bajo presión selectiva media.

Durante la FASE 1, para MS se alcanzaron estos niveles de resistencia en veintidós días, mientras que para la FASE 3 fue después de nueve días. Para las poblaciones bajo SS no observamos una aceleración significativa en la tasa de adaptación, como podemos

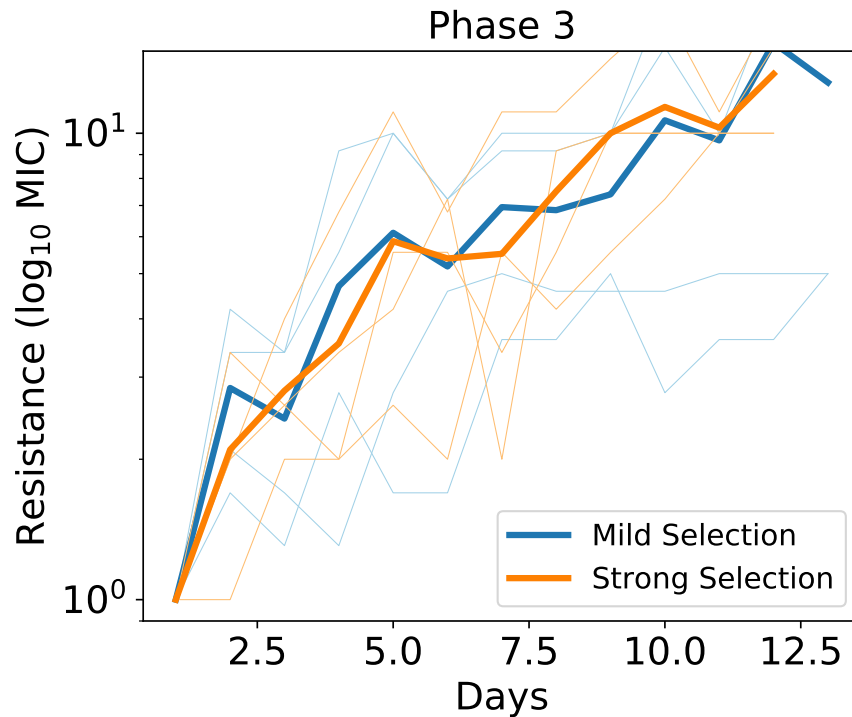


Figura 4.1: Niveles de resistencia alcanzados cuando el antibiótico fue introducido nuevamente en el medio (incremento en la CMI) en función del tiempo (en días) para ambos regímenes de selección, FASE 3. El régimen de selección fuerte (líneas naranjas) y media (líneas azules), cada línea denota una réplica independiente con el promedio representado con una línea gruesa.

observar en la Figura 4.3, las poblaciones bajo MS tienen una tasa de adaptación significativamente diferente entre las Fases 1 y 3 (valor $p < 0.05$) comparadas con las poblaciones bajo presión selectiva fuerte (valor $p = 0.35$), lo que sugiere que pueden existir contingencias históricas que modifican el ritmo de adaptación al introducir antibiótico nuevamente en el medio.

En la Figura 4.4, realizamos una comparación fenotípica de las poblaciones evolucionadas en cuanto al incremento de resistencia entre tratamientos y FASES (1 y 3). Al revisar la FASE 3, encontramos que para ambos regímenes de selección, todas las poblaciones incrementaron su nivel de resistencia más de diez veces en sólo doce días, lo que indica un incremento en la tasa de adaptación para las poblaciones bajo selección media. Sin embargo, para el régimen de selección fuerte, no observamos aceleración en la tasa de

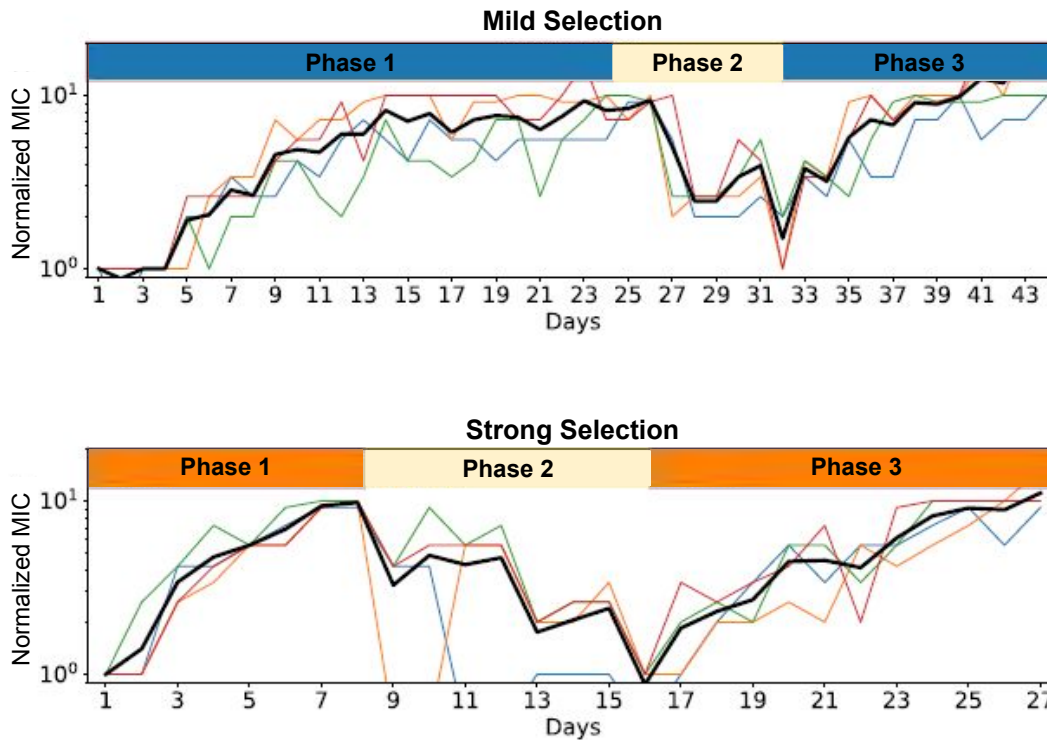


Figura 4.2: Trayectorias de adaptación de las poblaciones evolucionadas bajo ambos regímenes de selección durante las tres fases. Las barras en la parte superior, en azul (MS) o naranja (SS) indican la fase selectiva, mientras que la barra beige indica cuando el antibiótico se retira del medio, las líneas delgadas representan las réplicas y la gruesa el promedio de las poblaciones.

adaptación con respecto a la FASE 1 (t-test p-value=0,35; H_0 : la tasa media de adaptación en ambas fases son iguales).

La secuenciación del genoma reveló que la aceleración de la resistencia observada en las poblaciones bajo selección media es una consecuencia del mantenimiento de las mutaciones durante la FASE 2 del experimento. Como resultado, observamos que cuando el antibiótico es introducido nuevamente en el medio, las mutaciones *phoQ*, *ftsI*, *dauA/prs* y *mgrB/yobH* estaban presentes con alta frecuencia en las poblaciones bajo presiones selectivas medias.

Además, identificamos siete mutaciones que no habían sido identificadas en las poblaciones en ninguna de las fases previas, así como dos mutaciones que han sido previamente

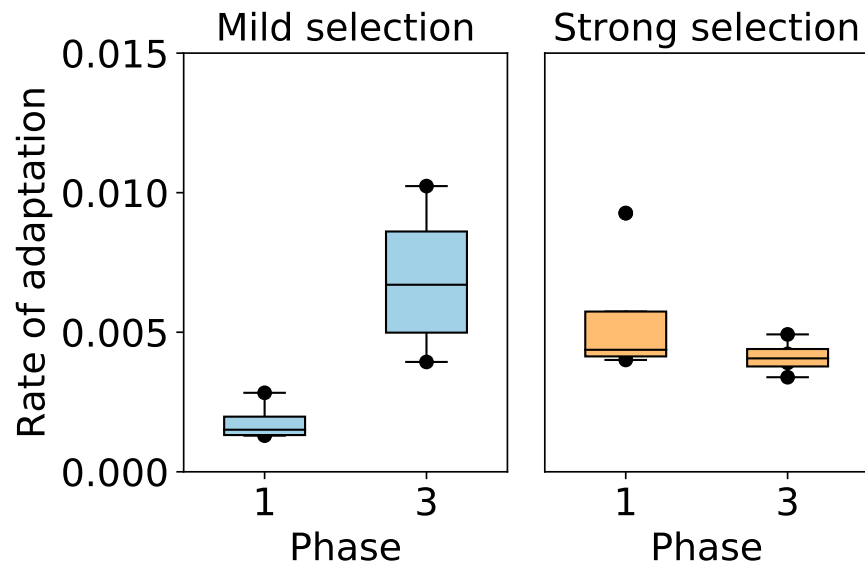


Figura 4.3: Comparación entre las tasas de adaptación estimadas para FASE 1 y 3 para el régimen de selección media (izquierda, en azul) y selección fuerte (derecha, en naranja). La tasa de adaptación de resistencia fue mayor en las poblaciones bajo selección media (prueba t, valor $p < 0.05$) pero no para SS (prueba t, valor $p = 0.35$, H_0 : tasa media de adaptación entre ambas fases es igual).

reportadas como mutaciones de resistencia: con alta frecuencia identificamos a *cpxA* que confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos [111, 112] y el resto de las mutaciones fueron encontradas en baja frecuencia, entre ellas *marR*, que forma parte de la regulación de bombas de eflujo [113, 114] (Ver Tabla Supl. S2 que contiene la lista completa de genes mutados).

Para las poblaciones bajo presión selectiva fuerte identificamos seis mutaciones; *clpX/lon* y *acrR* que se conservaron durante las tres fases en alta frecuencia. Sin embargo, durante la segunda fase, cuando el antibiótico fue retirado del medio la frecuencia en las poblaciones disminuyó sustancialmente.

Ninguna de las mutaciones restantes identificadas en esta fase se ha reportado como mutación de resistencia, a pesar de que tres de estas tienen una frecuencia del 100%, (Ver Tabla Supl. S3 que contiene la lista completa de genes mutados).

La Figura 4.5 ilustra el perfil genómico de ambos tratamientos al final de cada fase

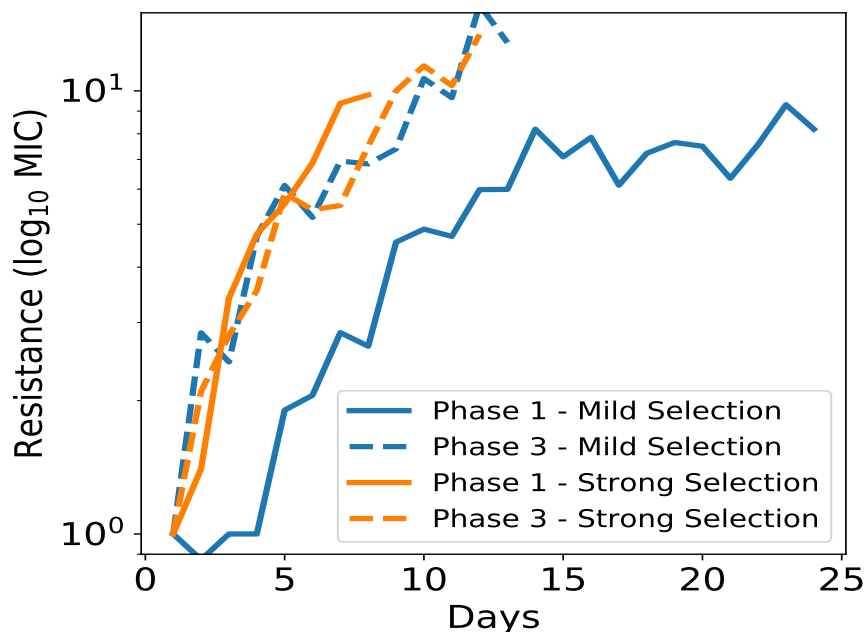


Figura 4.4: Incremento de la resistencia a través del tiempo; Las líneas continuas representan la primera evolución en presencia de antibiótico (FASE 1) y las líneas punteadas la resistencia adquirida de las poblaciones evolucionadas en antibiótico al final de la FASE 2. Se pueden observar las trayectorias de adaptación de la FASE 1 y 3 son similares para las poblaciones bajo selección fuerte (líneas naranjas), a diferencia de las poblaciones bajo selección media (líneas azules) donde la adaptación de resistencia es significativamente más rápida en la FASE 3 en comparación con la FASE 1.

del experimento evolutivo; en azul las poblaciones bajo presiones selectivas medias y en naranja las poblaciones bajo presión selectiva fuerte.

Para el régimen de MS, las mutaciones de resistencia que estaban presentes en la población desde la FASE 1 se pueden encontrar en el 100% de la población al final de la FASE 3. En el caso del régimen de SS, las mutaciones presentes durante la FASE 1 volvieron a aumentar en frecuencia cuando el antibiótico se introdujo nuevamente en el medio, y por lo tanto, al final de la FASE 3, las mutaciones vuelven a estar presentes con una frecuencia del 100%.

Una diferencia importante entre ambos regímenes de selección es que el número total

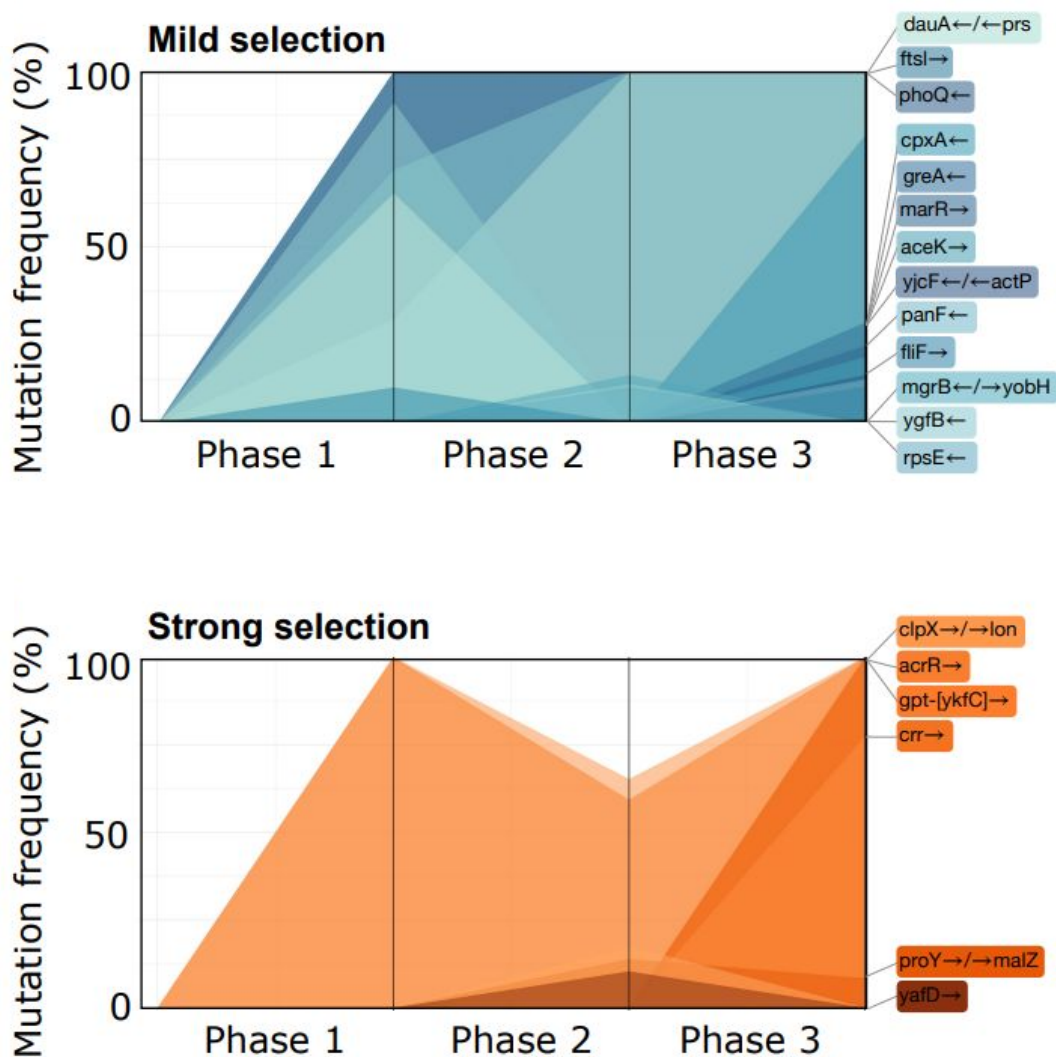


Figura 4.5: Frecuencia de mutaciones observadas durante las tres fases del experimento (MS en azul, SS en naranja). Se puede observar cómo las mutaciones que alcanzan el 100% de frecuencia durante FASE 1 bajo SS (es decir, *acrR*, *clpX/lon*) son inestables en ausencia de antibiótico, reduciendo así su frecuencia durante FASE 2. Por el contrario, las mutaciones que aparecen al final de la FASE 1 bajo MS son estables en ausencia de antibiótico (en particular, *phoQ*, *ftsI* y *dauA/prs*), lo que da como resultado una tasa de adaptación acelerada cuando los antibióticos se introducen nuevamente en el medio.

de mutaciones fue menor para el tratamiento de SS en comparación con el tratamiento de MS (Ver tablas S2 y S3). Esto sugiere que para el régimen de selección fuerte, las mutaciones adquiridas en la FASE 1 se eliminan cuando se retira el antibiótico. Esto es consistente con estudios previos que también han demostrado que fuertes presiones selectivas pueden mitigar el efecto de contingencias históricas [75, 115].

Capítulo 5

El costo de la resistencia a antibióticos

La aparición, propagación y estabilidad de resistencia a antibióticos en una población bacteriana esta determinada por varios factores que incluyen la concentración del antibiótico utilizado, la tasa de formación de mutantes resistentes, el costo biológico y la tasa y alcance de la compensación genética [116]. Las bacterias se benefician de la posesión de genes de resistencia cuando está presente el antibiótico correspondiente [117], sin embargo, también es bien sabido que, en la mayoría de los casos, las bacterias resistentes sufren un costo en ausencia de éste. En los experimentos evolutivos, se puede cuantificar este costo de resistencia a antibióticos mediante el *fitness* relativo, por medio de la competencia directa entre una línea derivada y su antepasado en un medio sin antibiótico, dando como resultado que la cepa con mayor adecuación a este medio será la que tenga mayor crecimiento.

Para evaluar los costos de resistencia, realizamos un experimento de competencia entre las cepas resistentes y la silvestre MG1655, que contiene la proteína fluorescente mCherry en cromosoma. Seleccionamos las cuatro réplicas de cada tratamiento al final de cada fase, las poblaciones seleccionadas fueron las que al final de la primera fase alcanzaron altos niveles de resistencia ($\sim 10\times\text{MIC}$). Todas las poblaciones, incluidos los controles, MG1655, sin y con proteína fluorescente fueron llevadas a la misma densidad óptica. En 950 μl de medio M9 sin antibiótico inoculamos 25 μl de la cepa evolucionada y 25 μl de la cepa silvestre que tenía la proteína fluorescente en cromosoma, posteriormente incubamos en una microplaca de titulación a 30°C por 24 h utilizando un lector de microplacas SYNERGY,

haciendo lecturas cada 20 minutos de densidad óptica (630 nm) y en el canal de fluorescencia (579-616 nm).

Los resultados obtenidos nos permitieron observar las curvas de crecimiento de los cultivos mixtos, conformados por las cepas evolucionadas a través de la FASE 1 (M0), 2 (M7) y 3 (RE13) bajo ambos regímenes de selección, en azul las poblaciones bajo selección media y en naranja las poblaciones creciendo en selección fuerte, estas lecturas de densidad óptica solo nos permiten observar el crecimiento de estas cepas en conjunto y no la frecuencia relativa. Para asegurarnos de que ambas poblaciones estaban presentes en el cultivo, también tomamos lecturas en el canal de fluorescencia correspondiente a la proteína fluorescente mCherry (579-616 nm), que se observa en color tinto (Figura 5.1).

De esta forma observamos que ambas poblaciones se encontraban en el cultivo mixto y fueron capaces de crecer en medio sin antibiótico, sin embargo, con esta información no es posible calcular las frecuencias relativas de cada cepa en los cultivos mixtos para estimar cuál es la población mejor adaptada. Para cuantificar las frecuencias relativas de cada población bacteriana utilizamos citometría de flujo, método de laboratorio que nos permite detectar de manera simultánea múltiples características físicas de células individuales a una alta velocidad, entre estas características, el número de células. Las mediciones se basan en la manera en que las células responden a la luz, al incidir el láser sobre la células marcadas excita distintos fluorocromos y emiten fluorescencia con longitudes de onda que serán detectadas por fotodetectores [118].

Después de 24 h de crecimiento el 50% del cultivo de cada población fue separada y llevada al citómetro de flujo, para estimar el número de células pertenecientes a cada población y de esta forma calcular el *fitness* relativo de las poblaciones resistentes a antibiótico. Esperábamos que las poblaciones resistentes se diferenciaron de las sensibles por la proteína fluorescente.

Con los datos obtenidos estimamos el *fitness* relativo, definido matemáticamente como

$$fitnessRelativo = \frac{\log(Pob.Resistente)}{\log(Pob.Ancestral)}$$

Si el *fitness* de las poblaciones resistentes resultaba ser igual o mayor a 1, indicaría que crecen de forma igual o mejor que la cepa silvestre, es decir, no presentan un costo por

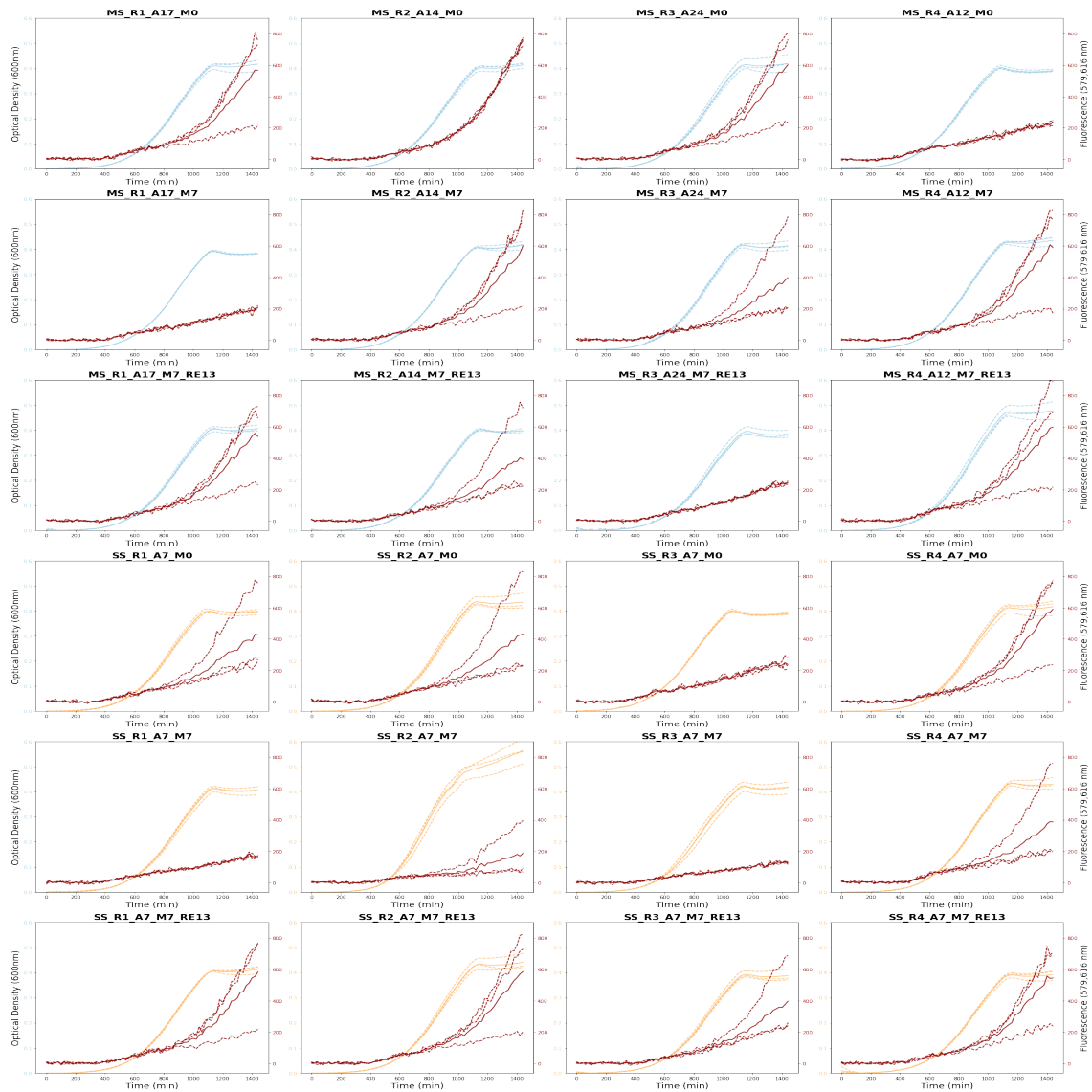


Figura 5.1: Curvas de crecimiento obtenidas para la FASE 1, 2 y 3, en color azul observamos la densidad óptica de las poblaciones bajo concentraciones medias y en naranja las poblaciones bajo concentración fuerte, en color tinto observamos el crecimiento de la cepa silvestre marcada con la proteína mCherry a través del tiempo. Las réplicas se observan con líneas punteadas y el promedio en la línea sólida.

la adquisición y mantenimiento de las mutaciones de resistencia, pero, si por el contrario el *fitness* relativo estimado es menor a 1, las poblaciones resistentes presentan costo de resistencia que en medio con antibiótico no es observado directamente.

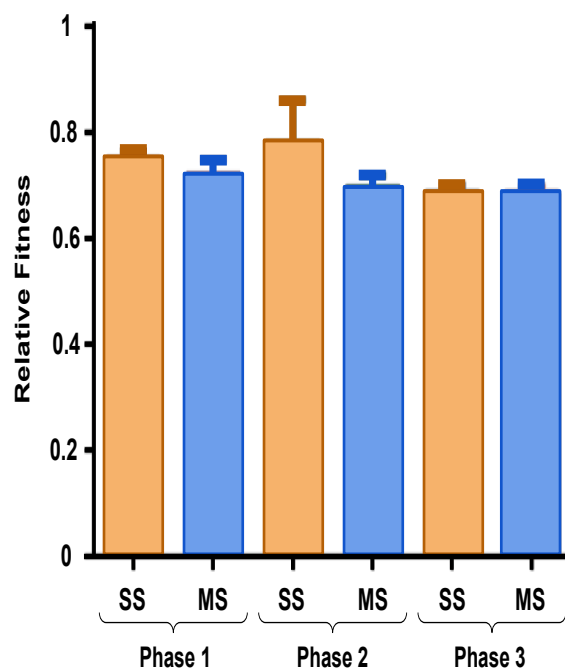


Figura 5.2: Comparación del *fitness* relativo estimado para la FASE 1, 2 y 3 para el régimen de selección media (en azul) y fuerte (en naranja). Por medio de un análisis de ANOVA de un factor encontramos que las poblaciones bajo selección fuerte durante la segunda fase son significativamente diferentes en comparación a las poblaciones de selección media en la segunda fase y con las poblaciones de la tercera fase bajo ambos regímenes de selección.

En la Figura 5.2 observamos el *fitness* relativo de las poblaciones resistentes a través de las tres fases de adaptación y bajo ambos tratamientos. Encontramos que las poblaciones de la FASE 2 bajo selección fuerte presentan un mayor *fitness* relativo con respecto a las poblaciones bajo selección media de esta fase y ambos tratamientos de la primera y tercer fase. Estos resultados sugieren que el costo de las mutaciones de resistencia en las poblaciones en ausencia de antibiótico es mayor, como se ha reportado anteriormente, las poblaciones con mutaciones de resistencia en ausencia de antibiótico tienen un costo metabólico respectivo a la mutación que pueden o no mantener.

Teniendo en mente los resultados encontrados durante la secuenciación del genoma, podemos sugerir que para las poblaciones bajo selección fuerte tienden a tener un mayor

costo de adecuación, ya que las mutaciones adquiridas durante el proceso de selección con antibiótico fueron mutaciones de supervivencia altamente específicas, mientras que las poblaciones bajo el tratamiento de selección media tuvieron mayor tiempo de adaptación a un medio menos áspero y, por lo tanto, las mutaciones adquiridas tienen un menor costo y fueron fijadas en la población, siendo más aptas y dinámicas en medio con o sin antibiótico.

Capítulo 6

La huella de la historia evolutiva

En este trabajo hemos encontrado que la evolución de resistencia a antibióticos depende de la intensidad de la presión selectiva, primordialmente en el proceso inicial de adaptación, así como de su historia evolutiva, donde las poblaciones bacterianas mantienen mecanismos genéticos dependiendo del tratamiento utilizado.

Cuando el antibiótico está presente en el medio las poblaciones bacterianas adquieren altos niveles de resistencia (FASE 1), sin embargo, cuando la presión selectiva es retirada, también el nivel de resistencia disminuye (FASE 2). Observamos que la presión selectiva inicial (SS o MS) fue determinante en el proceso evolutivo, permitiendo que las poblaciones bacterianas adquirieran características genotípicas que generan paisajes adaptativos que diferencian estas poblaciones. Cuando el antibiótico es reincorporado al medio el nivel de resistencia se restablece gracias a las características previamente desarrolladas en las poblaciones al percibir nuevamente el factor selectivo en el medio ambiente.

Para estudiar la influencia que tiene la historia evolutiva en diferentes tratamientos, examinamos la respuesta de las poblaciones bacterianas al intercambiar los tratamientos previamente establecidos. Es decir, las poblaciones provenientes de la FASE 2 que inicialmente fueron sometidas a concentraciones fuertes de antibiótico, para la tercer fase del experimento adaptamos estas poblaciones en concentraciones medias, donde las poblaciones que se transfieren al día siguiente son las expuestas a una concentración de antibiótico por debajo del 50% de inhibición. Mientras que las poblaciones que se adaptaron en concen-

traciones medias durante la primera fase, al final de la segunda fase fueron seleccionadas en concentraciones fuertes, las poblaciones transferidas se obtienen del ambiente con la concentración más alta de antibióticos que exhibe un crecimiento observable. A esta fase del experimento la denominamos FASE 3B.

Cada día estimamos la CMI y observamos que sin importar el tratamiento utilizado el nivel de resistencia incrementó. El experimento se realizó hasta que las poblaciones aumentaron al menos diez veces su nivel de resistencia.

En la Figura 6.1 podemos observar que el nivel de resistencia aumenta aún con el intercambio de tratamientos. Las poblaciones que pasaron por el tratamiento bajo selección fuerte inicial, SS_3B (*SS - No antibiótico - MS*), alcanzaron una CMI promedio de 9.7, s.e.= 0.18, mientras que las poblaciones bajo selección media inicial, MS_3B (*MS - No antibiótico - SS*) tienen una CMI promedio de 12.84, s.e.= 0.93. También podemos observar que las trayectorias de adaptación fueron similares entre los regímenes de selección utilizados, en cuanto al nivel de resistencia, como la cantidad de días en que restablecieron su resistencia, para las poblaciones de la FASE SS_3B fue de diez días y para la FASE MS_3B de nueve.

Aunque durante la FASE 1 y 3B las poblaciones bacterianas alcanzaron niveles similares de resistencia, observamos que la tasa de adaptación de resistencia a ampicilina se aceleró durante la FASE 3B en las poblaciones que se adaptaron bajo ambos tratamientos.

La FASE 3 y 3B se comportaron de forma similar aumentando su nivel de resistencia independientemente de la presión selectiva impuesta. La tasa de adaptación de resistencia a ampicilina se aceleró durante ambas fases y tratamientos, sin embargo, como podemos observar en la Figura 6.2, las poblaciones bajo el tratamiento de MS tienen un incremento gradual en su tasa de adaptación, siendo aún mayor durante la FASE 3B. Las poblaciones bajo el tratamiento SS tienen un comportamiento particular, aumentando durante la FASE 3B.

Estos resultados sugieren que al intercambiar las presiones selectivas al final de este experimento evolutivo se mantiene el comportamiento fenotípico debido al perfil genotípico previamente adquirido cuando estas poblaciones fueron expuestas a antibiótico, demostrando así las contingencias históricas que actúan en las poblaciones bacterianas sin importar el régimen de selección posterior.

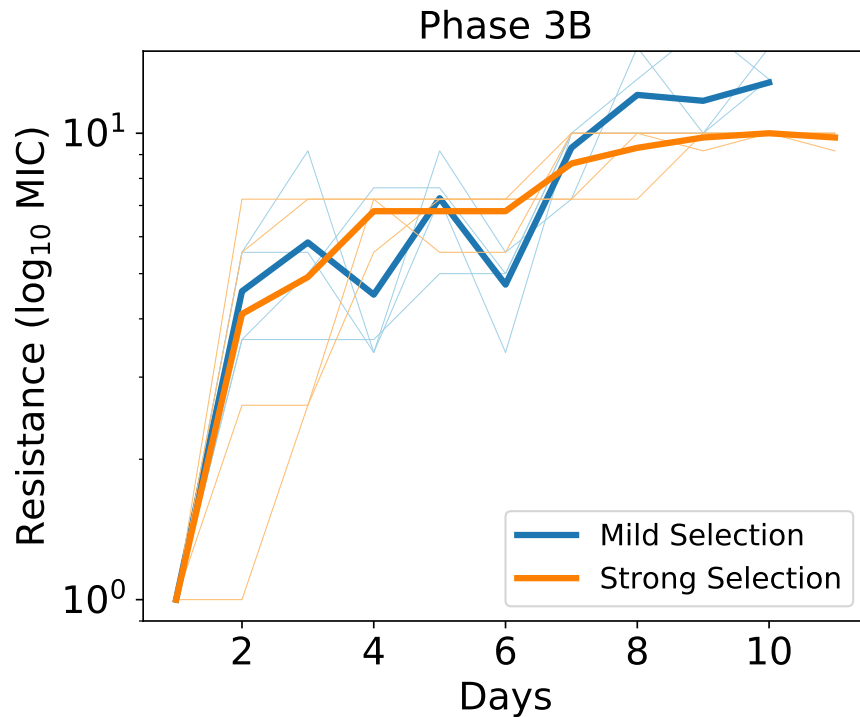


Figura 6.1: Niveles de resistencia alcanzados cuando el antibiótico fue introducido nuevamente en el medio (incremento en la CMI) en función del tiempo (en días) para ambos regímenes de selección, FASE 3B. El régimen de selección fuerte (SS_3B, líneas naranjas) y media (MS_3B, líneas azules), cada línea denota una réplica independiente con el promedio representado con una línea gruesa.

Con la finalidad de comparar el incremento de resistencia entre los tratamientos y fases, en la Figura 6.3 observamos las trayectorias evolutivas en la FASE 1 y 3B para ambos regímenes de selección. Durante la primera fase encontramos que después de veintidós días de adaptación, las poblaciones bacterianas bajo presión selectiva media incrementaron su nivel de resistencia diez veces en comparación con la cepa ancestral, mientras que para las poblaciones bajo selección fuerte este mismo nivel de resistencia se logró en solo nueve días. En la FASE 3B, encontramos que para ambos regímenes de selección todas las poblaciones incrementaron su nivel de resistencia más de diez veces en solo nueve días.

Los resultados obtenidos sugieren que las poblaciones bajo selección media tienen un incremento sustancial en la tasa de adaptación, manteniendo las características fenotípicas similares a las encontradas durante la FASE 3. La única diferencia observada al intercam-

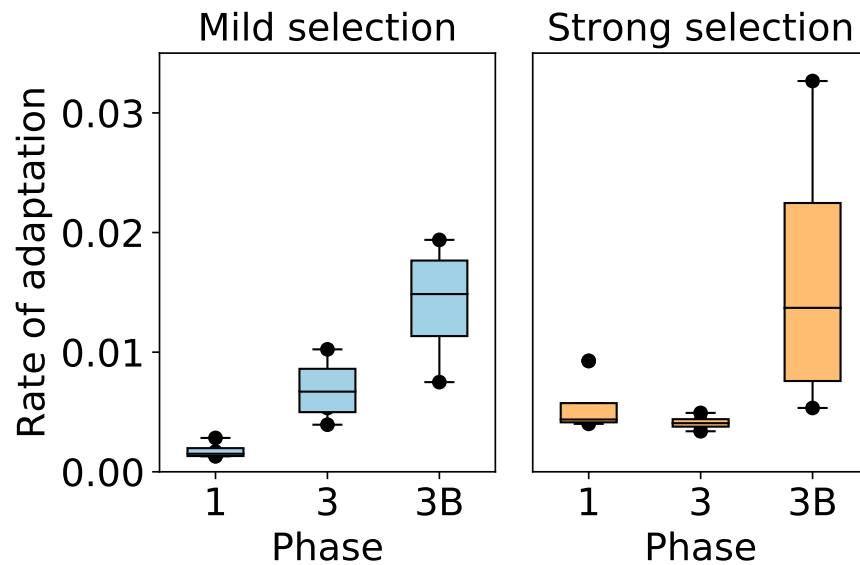


Figura 6.2: Comparación entre las tasas de adaptación estimadas para la FASE 1, 2 y 3B para el régimen de selección media (izquierda, en azul) y selección fuerte (derecha, en naranja). La tasa de adaptación de resistencia fue mayor en las poblaciones bajo selección media (prueba t, valor $p < 0.05$), tanto para la FASE 3 como 3B. Pero no para SS (prueba t, valor $p_{\text{FASE 3}} = 0.35$ y $p_{\text{FASE 3B}} = 0.177$, H_0 : tasa media de adaptación entre ambas fases es igual).

biar los tratamientos (FASE 3B) es que el nivel de resistencia estimado en esta fase es ligeramente mayor que en la tercer fase, es posible que existan ligeros cambios en el perfil genotípico o mutaciones compensatorias que en conjunto con las contingencias históricas potencien las características fenotípicas aumentando así el nivel de resistencia independientemente del régimen de selección utilizado.

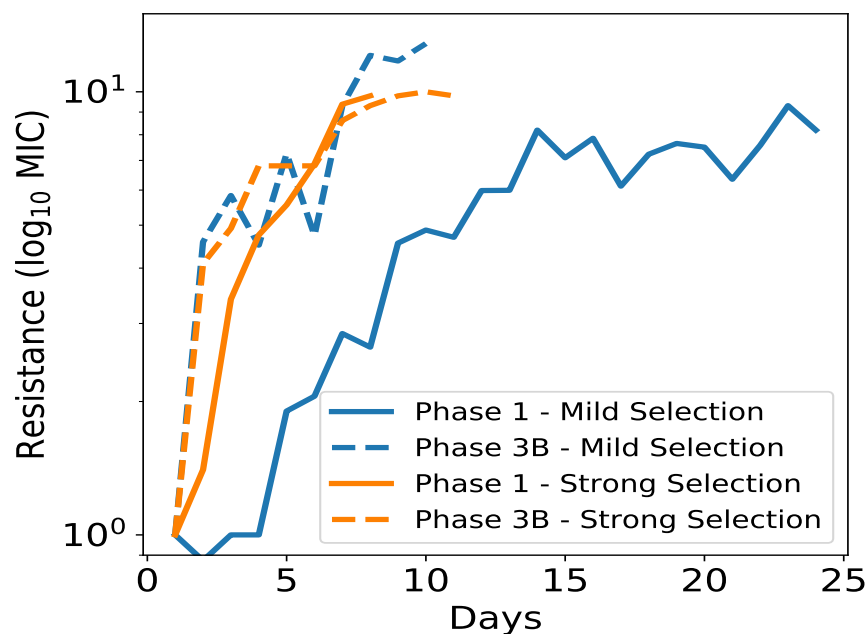


Figura 6.3: Incremento de la resistencia a través del tiempo; Las líneas continuas representan la primera evolución en presencia de antibiótico (FASE 1) y las líneas punteadas la resistencia adquirida de las poblaciones evolucionadas en antibiótico seleccionadas al final de la FASE 2 pero intercambiando los regímenes de selección (FASE 3B). Se pueden observar las trayectorias de adaptación para la FASE 1 (líneas solidas) y 3B (líneas punteadas) para el régimen de selección media (azul) y fuerte (naranja). Las trayectorias de adaptación para las poblaciones bajo selección media durante la FASE 3B son similares a las poblaciones bajo selección fuerte, donde la adquisición de resistencia es significativamente mayor comparada con las poblaciones bajo selección media de la FASE 1.

Capítulo 7

Conclusiones

La evolución de resistencia a antibióticos representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial y el uso y abuso de las sustancias antimicrobianas es una de las principales razones de la evolución y diseminación de cepas resistentes tanto en entornos clínicos como ambientales. Sin embargo, muchas cuestiones fundamentales sobre las fuerzas ecológicas y evolutivas que impulsan la adaptación a la resistencia siguen sin ser estudiadas en gran medida.

Una herramienta importante en el estudio de resistencia a antibióticos es la evolución experimental que nos permite estudiar la interacción entre el azar, la selección y la historia evolutiva, ya que permite controlar con precisión las condiciones ambientales y seguir trayectorias evolutivas hacia la resistencia. Los avances en el área de las tecnologías genómicas nos han permitido complementar los estudios de evolución experimental exponiendo los cambios genotípicos de las poblaciones al ser tratadas en condiciones específicas.

Se ha demostrado que el cambio evolutivo es impulsado por la interacción entre la fuerza determinista de la selección natural y la variación genética producida por mutaciones aleatorias. Pero las mutaciones pueden exhibir interacciones epistáticas y expresar diferentes fenotipos cuando están presentes en diferentes antecedentes genéticos [119, 120, 121]. Como resultado, la historia evolutiva puede producir contingencias que modifiquen el *tempo* y el *modo* de evolución, con ejemplos que van desde la evolución de la innovación [74] y la pérdida de función [122], para compensar [123] y reversibilidad

de costosas mutaciones [124, 76].

En este trabajo combinamos la evolución experimental, secuenciación genómica y análisis bioinformático para probar el efecto que tienen diferentes presiones selectivas en la dinámica evolutiva de las exposiciones recurrentes a antibiótico. Demostramos que diferentes presiones selectivas producen diferentes perfiles genotípicos y, por lo tanto, argumentamos que la caracterización fenotípica de las cepas (por ejemplo, utilizando CMI) no es suficiente cuando se trata de diseñar terapias farmacológicas óptimas, ya que pueden producir cepas igualmente resistentes (aunque con diferentes historias evolutivas).

También demostramos que diferentes perfiles mutacionales producen diferencias en la estabilidad de la resistencia en ausencia de selección. En particular, encontramos que las presiones selectivas fuertes seleccionan mutantes altamente resistentes que se eliminan fácilmente en ausencia de selección. Esto es consistente con estudios previos que muestran que altas dosis de antibióticos seleccionan mutaciones específicas de la vía que generalmente están asociadas con un mayor costo de *fitness* [54]. Por el contrario, encontramos que las presiones selectivas medias producen mutaciones estables que se mantienen en ausencia de selección, lo que resulta en una dinámica evolutiva diferente cuando el antibiótico es introducido nuevamente en el medio.

La intensidad de presión selectiva es un parámetro importante a considerar para el diseño de estrategias de tratamiento. De hecho, la mayor parte de nuestra comprensión de la evolución de la resistencia a los medicamentos se basa en concentraciones altas de antibióticos, pero los entornos naturales contaminados por medicamentos son omnipresentes debido al uso de antimicrobianos en la agricultura y como promoción del crecimiento animal [125, 126, 127], con pruebas cada vez mayores que demuestran una correlación entre la contaminación antropogénica por fármacos y la selección de la resistencia a los antibióticos en patógenos humanos [128, 129, 130].

En términos generales, nuestros resultados sugieren que dosis subletales de antibióticos que, en principio, solo imponen una selección media de resistencia [131, 132], mantienen mutaciones de resistencia en la población, acelerando así la tasa de adaptación después de introducir antibióticos nuevamente.

Artículo de titulación

**Acceleration in antibiotic resistance adaptation is
contingent on evolutionary history**

Journal:	<i>Molecular Biology and Evolution</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cisneros-Mayoral, Sandra; Universidad Nacional Autónoma de México, Center for Genomic Sciences, Graña-Miraglia, Lucía; University of Toronto, Centre for the Analysis of Genome Evolution and Function; University of Toronto, Department of Cell & Systems Biology Pena-Miller, Rafael; Universidad Nacional Autónoma de México, Center for Genomic Sciences, Fuentes-Hernandez, Ayari; Universidad Nacional Autónoma de México, Center for Genomic Sciences,
Key Words:	antibiotic resistance, experimental evolution, bacterial genomics, mathematical modeling

SCHOLARONE™
Manuscripts

Acceleration in antibiotic resistance adaptation is contingent on evolutionary history

Sandra Cisneros-Mayoral¹, Lucía Graña-Miraglia^{2,3}, Rafael Peña-Miller^{1,*}, and Ayari Fuentes-Hernández^{1,*}

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

²Centre for the Analysis of Genome Evolution & Function, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

³Department of Cell & Systems Biology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

*Corresponding authors: ayarifh@ccg.unam.mx, rpm@ccg.unam.mx

ABSTRACT

Bacterial adaptation to stressful environments often produces evolutionary constraints whereby increases in resistance are associated with reduced fitness under different environmental conditions. The exploitation of this resistance-cost trade-off has been proposed as the basis of rational antimicrobial strategies designed to limit the evolution of drug resistance in bacterial pathogens. Recent theoretical and laboratory studies have shown that fluctuating selection can maintain drug efficacy and even restore drug susceptibility, but can also increase the rate of adaptation and promote cross-resistance to other antibiotics. Here we combine mathematical modeling, experimental evolution, and whole-genome sequencing to follow evolutionary trajectories towards β -lactam resistance under fluctuating selective conditions. Our experimental system consists of eight populations of *Escherichia coli* K12 evolving in parallel to a serial dilution protocol designed to dynamically control the strength of the selective pressure. In particular, we implement adaptive ramps with mild and strong selection, resulting in evolved populations with similar levels of resistance, but with diverging genotypic profiles and evolutionary dynamics. We find that mutations that emerged under strong selection reduced in frequency in the absence of selection, in contrast to resistance mutations previously selected for in the mild selection regime that were stably maintained in the population. In consequence, in subsequent drug exposures, the rate of resistance adaptation accelerated in populations that evolved under intermediate levels of selection. We conclude by arguing that the strength of selection is a significant parameter for the design of optimal treatment protocols that suppress bacterial growth while controlling the evolution of antibiotic resistance.

Keywords: antibiotic resistance, experimental evolution, bacterial genomics, mathematical modeling

Introduction

Antibiotic resistance evolution in response to the industrialized consumption of antibiotics represents one of the most critical problems in human health.^{1,2} Indeed, the scarcity of new antibiotics under development contrasts with the widespread prevalence of resistant strains to all classes of antibiotics discovered to date.^{3,4} The increasing frequency of drug-resistant pathogens has forced the issue of how to best exploit antibiotics in order to preserve their efficacy.^{5,6} In general, antimicrobial chemotherapy is based on high-dose, long-course, antibiotic treatments, a treatment strategy based on the notion that overdosing

with antibiotics is, at worst, a therapeutically neutral choice and as a result, there is no harm in taking drugs for prolonged periods. But recent clinical studies have argued that the same clinical outcome can be achieved with a short-course antibiotic therapy, without imposing such strong selective pressure in favor of drug-resistance.^{7,8}

Another plausible strategy to reduce the selective pressure to any given antimicrobial substance is by alternating different drugs in time. In principle, sequential treatment regimens minimize resistance by exploiting an evolutionary trade-off, known as collateral sensitivity, where evolving resistance to one antibiotic causes hypersensitivity to a different drug. This strategy is based on the assumption that, by alternating selective pressures, the physiological cost of maintaining resistance mechanisms would be strong enough to select for loss of the resistance allele and thus restore drug susceptibility.⁹ Indeed, sequential treatments have been shown, both in theory^{10,11} and in laboratory conditions,^{12–18} to slow the rate of resistance adaptation compared to single-drug treatments.

Unfortunately, restricting the use of antimicrobial substances, either by reducing overall drug consumption^{19,20} or by designing treatment protocols based on prioritizing and restricting certain antibiotics,²¹ does not necessarily correlate with a decrease in resistance.²² Moreover, even if drug efficacy is restored after a period of relaxed selection, it is unclear what the rate of resistance acquisition would be if antibiotics are reintroduced into the environment. Do evolutionary trajectories follow the same path as before? Or are there historical contingencies that modify the rate of adaptation when exposed again to the antibiotic?

Experimental evolution has been an essential tool to address these questions and to unravel the interaction between selection, chance, and historical contingency in microbial populations.^{23–27} In this paper, we combine a population dynamics model with experimental evolution and whole-genome sequencing to show that bacterial populations evolved under different selective pressures produce similar levels of resistance, but with different genotypic profiles that result in differences in the stability of resistance in drug-free environments. In particular, we will show that mutations selected for under mild selection are stably maintained in the population and, in consequence, the rate of resistance adaptation accelerates when antibiotics are re-introduced into the environment.

Results

We performed a parallel evolutionary experiment consisting of eight different clonal populations of *Escherichia coli* MG1655 evolving to increasing concentrations of ampicillin (AMP). Each replicate population is exposed to 22 logarithmically-spaced vector of increasing antibiotic concentrations (see [Table S1](#) for antibiotic concentrations used). After 24 hours, we transferred one of these populations into environments with fresh media and the same range of drug concentrations. The population transferred was determined following two different protocols we refer to as mild selection (MS, illustrated [Figure 1A](#)) and

strong selection (SS; Figure 1D). Each day we determined the critical drug concentration such that the optical density (OD) was below detectable limits ($OD_{600} < 0.05$), a quantity referred to as the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). For the two different protocols, if we detected an increased in MIC, a sample was frozen for further analysis and genome sequencing.

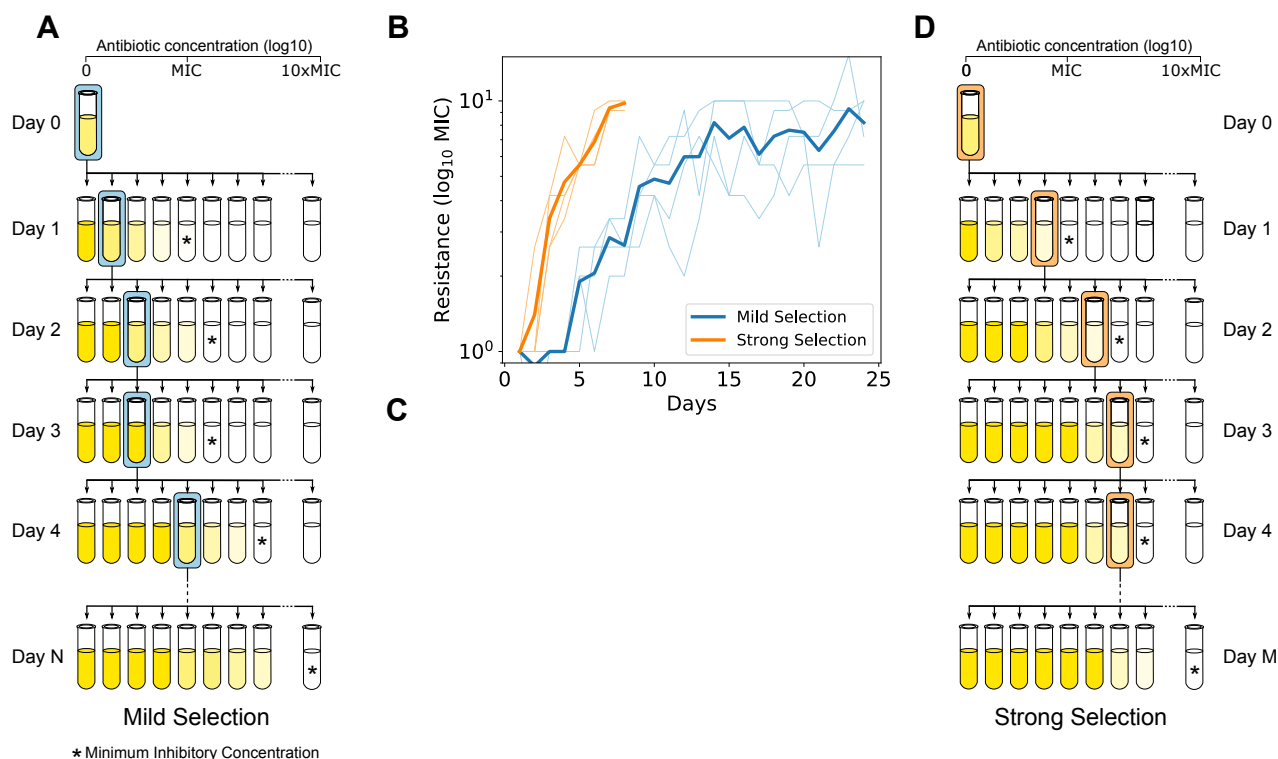


Figure 1. Adaptive ramp with different strengths of selection. A) Schematic illustration of the mild selection regime (MS), consisting of exposing a clonal population (Day 0) into a range of 22 drug concentrations (increasing AMP concentrations are represented from left to right and MIC is denoted with a star). After 24 hours of growth, we measure the resulting optical density achieved in each drug concentration (illustrated in yellow) and obtain a sample of the population that exhibited 50% inhibition with respect to the drug-free control (Day 1). Thereafter, the selected population (highlighted by the blue box) is used to inoculate another dose-response experiment (Day 2). We repeat this process until observing an order of magnitude increase in resistance in the evolved populations (Day N). B) Resistance levels (measured in terms of *-fold* increase in MIC) as a function of time, for both selection regimes (MS in blue, SS in orange). Each line denotes an independent replicate, with the mean resistance represented with the solid line. Notably, 10×MIC is achieved in 7 days under SS and 22 days under MS (dotted lines). C) Rate of adaptation estimated for each replicate exposed to adaptive ramps with different strengths of selection (blue bars represent replicates evolved under MS, and orange bars under SS). In all replicates, resistance adaptation is accelerated under strong selection. D) Illustration of an adaptive ramp with strong selection (SS). This protocol is based on transferring daily the population surviving in the highest drug concentration (denoted with an orange box) into another dose-response experiment. As with MS, the serial transfer experiment was performed until achieving a ten-fold increase in resistance relative to Day 1.

Rate of adaptation is correlated with the intensity of the selective pressure

In the first phase of the experiment (PHASE 1), the population to be transferred each day was determined based on the level of resistance exhibited by the population; for MS we transfer every day populations exhibiting 50% inhibition with respect to the drug-free control, while for SS regime we transfer each day a sample obtained from the environment with the highest concentration of antibiotics with observable growth. For each treatment protocol we considered four replicates and performed serial dilutions until the resistance level of the evolved populations was $10\times\text{MIC}$.

Figure 1B shows how resistance increases in time. Note how, regardless the selection regime, all populations achieved analogous levels of resistance. However, the number of transfers needed before achieving a ten-fold increase in drug resistance varied dramatically between selection regimes, as in the MS regime a ten-fold increase in resistance was achieved after 22 days, while populations exposed to SS reached the same level of resistance after only 7 days.

To measure the difference in the adaptation of the populations between the two regimes, we estimated the rate of adaptation in an experiment of duration of N days, in terms of the total resistance improvement, $\Delta\text{MIC} = \text{MIC}_N - \text{MIC}_0$, and the interpolated time at which resistance of the population reached half its maximum value, measure in days, t_{adapt} . Then we define that the rate of adaptation of this bacterial population under this selection regime is $\rho = \Delta\text{MIC}/(2 * t_{\text{adapt}})$.^{28,29} As illustrated in Figure 1C, the rate of adaptation for replicates evolved under strong selection is larger (mean $\rho = 0.006$, s.e.= 0.0001, $n = 4$) than replicates evolved under the mild selection regime (mean $\rho = 0.002$, s.e. = 0.0003, $n = 4$).

Genome sequencing revealed that strength of selection shapes mutation spectra

We performed whole-genome sequencing of the evolved populations and the ancestral strain and observed that, although all populations presented the same resistance phenotype, the mutational spectrum differed between selection regimes (see Table S2-S3 and Figure 2). For SS, we identified a mutation in *acrR*, a transcriptional regulator of an efflux pump operon²⁹⁻³¹ that modulates the level of expression of *acrAB*.³² For MS we identified mutations in *ftsI*, a gene involved in cell division³³ that has been previously reported as a β -lactam resistant determinant.^{17,34-36} Moreover, we found mutations in *phoQ* and *mgrB*, which have been shown to increase adaptation to stressful environments by remodeling lipid A in the outer membrane³⁷⁻⁴⁰.

Previous studies have shown that, as selection increases, the benefit associated with drug-resistance mutations is enhanced and, as it increases in frequency in the population, overall genetic diversity is reduced. In consequence, strong selective pressures can display similar phenotypic trajectories towards resistance⁴¹ and also mitigate the effect of historical contingencies.^{25,42} Indeed, as illustrated in Figure 2D, we found reduced genetic diversity in the SS regime (with only two drug resistance mutations identified and present in 100% of the population) with respect to the MS regime (with seven resistant mutations

identified in the population).

To further explore the mutational profile of both regimes, we sequenced 47 representative colonies isolated from evolved populations (from two replicates of each selection regime; see Methods and Figure S2). As anticipated by the population-level sequencing, mutations in *phoQ* and *ftsI* were prevalent in clones obtained from the mild-selection regime. Other resistant mutations, notably *dauA*, were found in both selection regimes (a complete list of mutations can be found in Table S5).

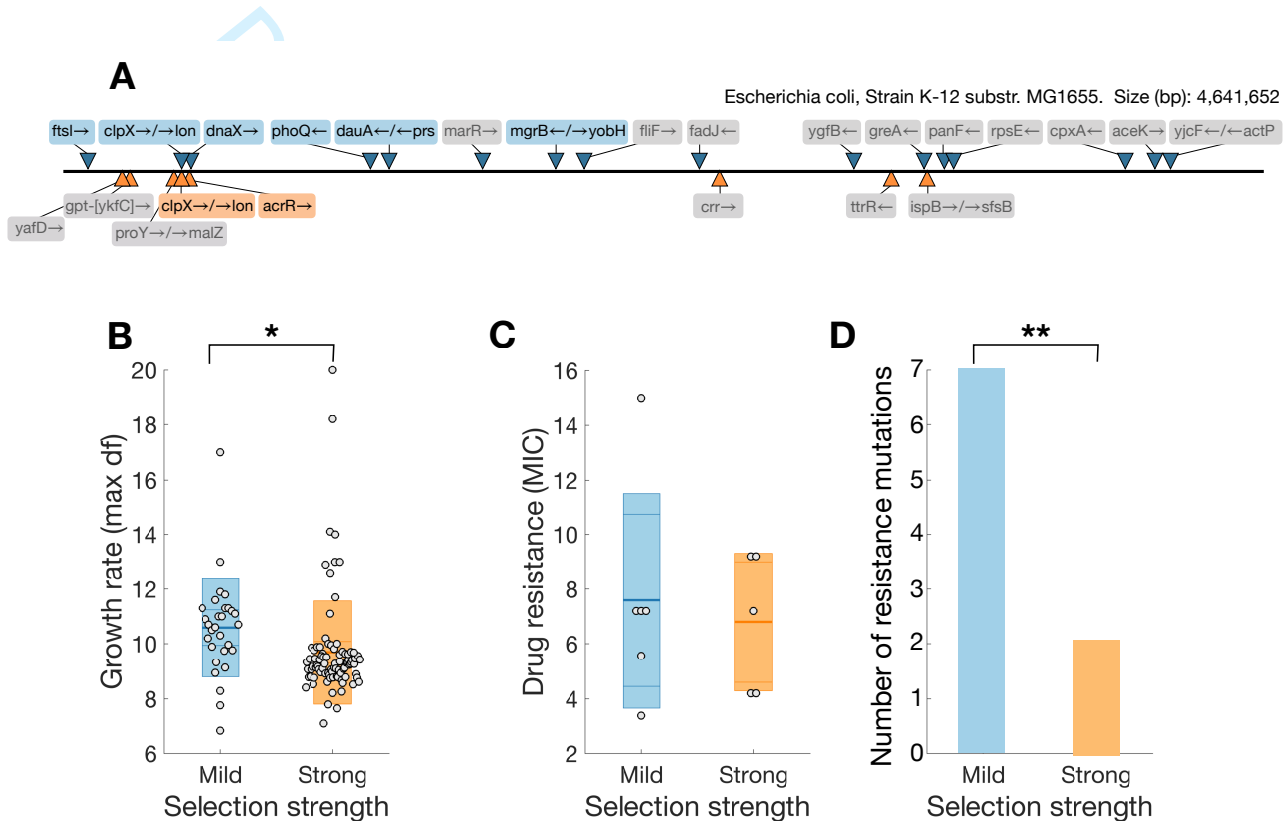


Figure 2. Genotyping and phenotyping evolved populations. A) Mutated genes ordered by position identified after exposing a clonal population to adaptive ramps with different strengths of selection (mild selection on top, and strong selection at bottom). Only genes not present in the drug-free control, and with frequencies of at least 10% or that appeared in more than one population are shown (in blue genes selected for during PHASE 1 in MS, and in orange in SS. Tables S2-S3 for a complete list of mutations, here shown in grey). B) Boxplot showing the maximum growth rate estimated for sequenced clones obtained for each selection regime (MS in blue, and SS in orange). Note that clones evolved under MS present increased growth rate with respect to clones that evolved under SS (two-tailed t-test, p -value < 0.05). C) MIC estimated for each evolved population. By experimental design, the MIC of evolved strains in both selection regimes is similar (two-tailed t-test, p -value > 0.1). D) Number of drug resistance mutations identified by whole genome sequencing the evolved population at the end of (PHASE 1). As expected, mild selection maintains a more genetically-diverse population than strong selection.

We also performed a dose-response experiment to determine the susceptibility profile of each sequenced clone. Figure 2C shows that the average resistance of clones evolved under strong selection (mean MIC = $6.8 \mu\text{g}/\text{mL}$, s.e. = 1.12, $n = 5$) was similar to clones obtained from the mild selection regime

1
2
3 100 (mean MIC=7.59 μ g/mL, s.e.=1.6, $n = 6$). Then we cultivated each clonal population in drug-free media
4 101 to obtain time-resolved optical densities that we then used to characterize its growth dynamics in the
5 102 absence of antibiotics.⁴³ As shown in Figure 2B, growth rates for strong and mild selection regimes are
6 103 significantly different (two-tailed t-test, p-value < 0.05), with isolates obtained from the mild-selection
7 104 regime presenting, on average, an increased growth rate (max df=10.5883, s.e.=0.332, $n = 29$) in the
8 105 absence of antibiotics with respect to clones that had evolved under strong selection (max df=9.6902,
9 106 s.e.=0.199, $n = 89$). This observation is consistent with a previous study showing that strong selection
10 107 produces pathway-specific mutations that are generally associated with a higher fitness cost.³⁶ In conse-
11 108 quence, we hypothesized that populations evolved in the strong selection regime would present reduced
12 109 stability in the absence of selection for resistance.
13
14
15
16
17
18
19

20 110 **Rapid resistance acquisition is unstable in drug-free environments**

21 111 We transferred each of the highly resistant populations (10 \times MIC) into drug-free environments and
22 112 performed serial dilutions for eight days, and measured the MIC each day. Figure 3A shows how resistance
23 113 of the population decreases in the absence of selection. We refer to the non-selective phase of the
24 114 evolutionary experiment as PHASE 2. Indeed, for both selection regimes, we found a significant reduction
25 115 of resistance relative to the levels presented at the end of the antibiotic ramp (two-tail t-test, p-value < 0.05,
26 116 df = 6). Note, however, resistance decreased faster in populations evolved under strong selection than in
27 117 populations adapted in the mild selection regime (see Figure 3B-C). After eight days without selection
28 118 for resistance, populations evolved under SS presented, on average, a 73% decrease in resistance, while
29 119 populations under MS only 47%. This result is consistent with previous studies that have shown that the
30 120 higher the selective pressure, resistance is cleared more rapidly from the population once the antibiotic is
31 121 removed.^{18, 44, 45}
32
33
34
35
36
37
38

39 122 We performed whole-genome sequencing of the evolved populations and compared the mutational
40 123 profile with the observed in PHASE 1. Crucially, resistance mutations in *phoQ* and *ftsI*, that were present
41 124 in 100% under MS, were still fixed in the population at the end PHASE 2. Of note, other mutations in
42 125 *dauA* and *mrgB* were present at lower frequencies during PHASE 1, and were observed in 100% of the
43 126 population after a period of relaxed selection for resistance (see Tables S3 and S3). In contrast, resistance
44 127 mutations in *acrR* and *clpX* identified in the strong selective regime at 100% of the population, decreased
45 128 in frequency and were observed in around 60% of the population after the non-selective phase.
46
47
48
49

50
51 129 For studying how the stability of resistance changes through time, we sampled the bacterial population
52 130 during PHASE 1 every time that there was an increase in resistance. As with the end-point of PHASE
53 131 2, we performed serial dilutions for eight days of these populations in the absence of antibiotics. Supp
54 132 Figure S3 shows that all replicate populations decreased their level of resistance significantly. Note that,
55 133 independently of the selective pressure, stability of resistance appears to be negatively correlated with the
56
57
58
59

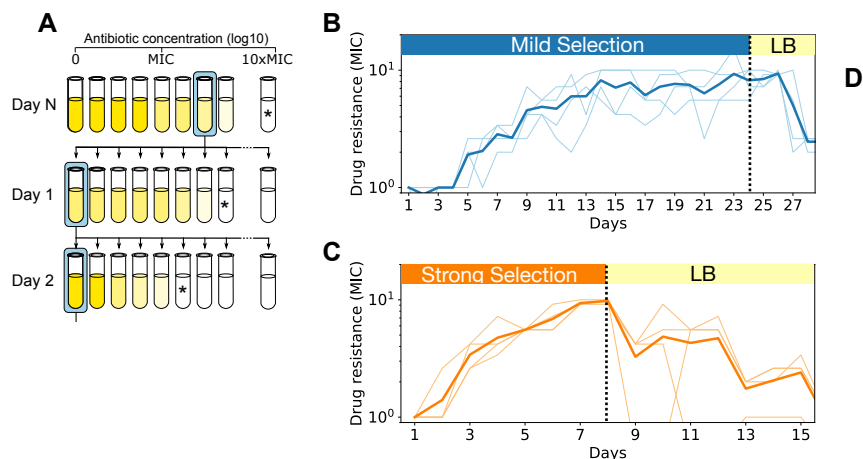


Figure 3. Evaluating the stability of resistance of populations evolved under different selection regimes. A) Schematic representation of PHASE 2 of the evolutionary experiment consisting on transferring the evolved populations obtained at the end of PHASE 1 into a drug-free environment, and performing an 8-day serial dilution protocol in the absence of selection for resistance. B) Resistance level of each population measured daily (blue bar in the top indicates the selective phase and yellow bar the drug-free phase). Of note, resistance levels decrease in time when antibiotics are withdrawn from the environment (different replicates denoted with light blue lines, with mean resistance represented with a solid blue line). C) Populations evolved under strong selection (orange lines) also present a reduction in resistance after growing in a drug-free environment for eight days. D) Reduction in resistance after a period of relaxed selection (PHASE 2) appears to be negatively correlated with the level of resistance achieved after the adaptive ramp (PHASE 1). Each point corresponds to a population sampled at different time-points of PHASE 1 (every time there was a measurable increase in MIC of the population). Lines denote best fit linear regression for data obtained for each regime ($R^2 = 0.844$ and $R^2 = 0.714$ for MS and SS, respectively). Note how populations that evolved under strong selection appear to be more unstable than mutations emerging under mild selection, independently of the degree of resistance.

level of drug resistance (see Figure 3D; $R^2 = 0.844$ for MS, and $R^2 = 0.714$ for SS).

Moreover, even for populations with the same resistance levels, those that evolved under SS were more susceptible than their MS counterparts (slope of the best-fit line: 0.12181 for MS and 0.18995 for SS). This suggests that resistance mutations acquired during strong selection are more costly than mildly selected mutations³⁶ and, therefore, in the absence of the selective pressure, are rapidly cleared from the population.⁴⁴ We argue that this difference in stability patterns could have significant consequences when re-introducing antibiotics.

Resistance adaptation acceleration is contingent upon evolutionary history

In order to quantify the rate of adaptation to antibiotics after a period of relaxed selection, we transferred the samples obtained from PHASE 2 into an antibiotic ramp (following the same serial dilution protocol used in PHASE 1). We will refer to this phase of the experiment as PHASE 3. We measured the MIC daily, and, as before, we observed a rapid increase in resistance in all replicate populations, regardless of the

1
2
3 146 treatment protocol used. Again, we continued the serial dilution experiment until all populations reached
4 147 at least a ten-fold increase in MIC (mean MIC=12.8, s.e.=4.3 for MS, and mean MIC=13.4, s.e.=1.8 for
5
6 148 SS). [Supp Figure S1](#) shows changes in resistance throughout all phases of the experiment.

7
8 149 For MS, while in PHASE 1 a ten-fold increase in resistance was obtained after 22 days, the same level
9 150 of resistance was achieved in only 9 days during PHASE 3 (see [Figure 4A](#)). As a result, we argue that the
10
11 151 rate of resistance adaptation accelerated when antibiotics are reintroduced into the environment, as shown
12 152 in [Figure 4B](#). Furthermore, we compared the rate of adaptation of both selection regimes in PHASE 3, and
13
14 153 found that MS exhibited a higher rate of adaptation than SS (t-test p-value < 0.005).

15
16 154 In contrast, for SS, we did not observe a significance acceleration in the rate of adaptation in PHASE
17 155 3 with respect to PHASE 1 (t-test p-value=0.35; H_0 : mean rate of adaptation in both phases are equal).
18
19 156 This is expected, as for the strong selection regime, mutations identified during the first selective phase
20
21 157 decreased substantially in frequency in the population. Although in PHASE 3 mutations in *clpX* and *acrR*
22 158 appeared again in high frequencies, the total number of mutations was still less than in the MS selection
23
24 159 regime (see [Table S3](#)).

25
26 160 Genome sequencing revealed that the resistance acceleration observed under MS is a consequence of
27 161 resistance mutations being maintained in the population during the non-selective phase of the experiment
28
29 162 (see [Figure 2A](#) and [Table S2](#)). In particular, when antibiotics were reintroduced into the environment,
30
31 163 mutations in *ftsI*, *phoQ*, and *dauA* were still present at high frequencies in the population. [Figure 4C](#) and
32 164 [4D](#) illustrate the genomic profile of both treatments at the end of each phase of the experiment. Note that,
33
34 165 for the MS regime, resistance mutations that were present in the population since PHASE 1 can be found
35 166 in 100% of the population at the end of PHASE 3. In this case, mutations present in PHASE 1 increased in
36
37 167 frequency again when the antibiotic is reintroduced, and therefore, at the end of PHASE 3, both mutations
38
39 168 appear in 100% of the population. As in PHASE 1, the number of mutations was larger in the MS treatment
40
41 169 compared to the SS treatment.

44 170 **Modeling the impact of selection and evolutionary history in drug resistance acceleration**

45
46 171 To further explore the interaction between the strength of selection and the evolutionary history, we used a
47 172 simple mathematical model consisting on multiple subpopulations exposed to a bactericidal antibiotic
48
49 173 and competing for a single exhaustible resource. First, let us assume the population is composed of three
50
51 174 bacterial types: a susceptible bacteria, denoted B_{wt} , and two resistant subpopulations, B_m and B_s , emerging
52 175 from B_{wt} through a single-point mutation occurring at a rate ε (see inset diagram in [Figure 5](#)).

53
54 176 If we denote with $S \geq 0$ the concentration of a single limiting resource, then its uptake rate can be
55 177 modeled through a function denoted $u(S)$, a Monod-type term that depends on the extracellular resource
56
57 178 concentration.^{46,47} Therefore growth rate of different strains can be characterized by the following

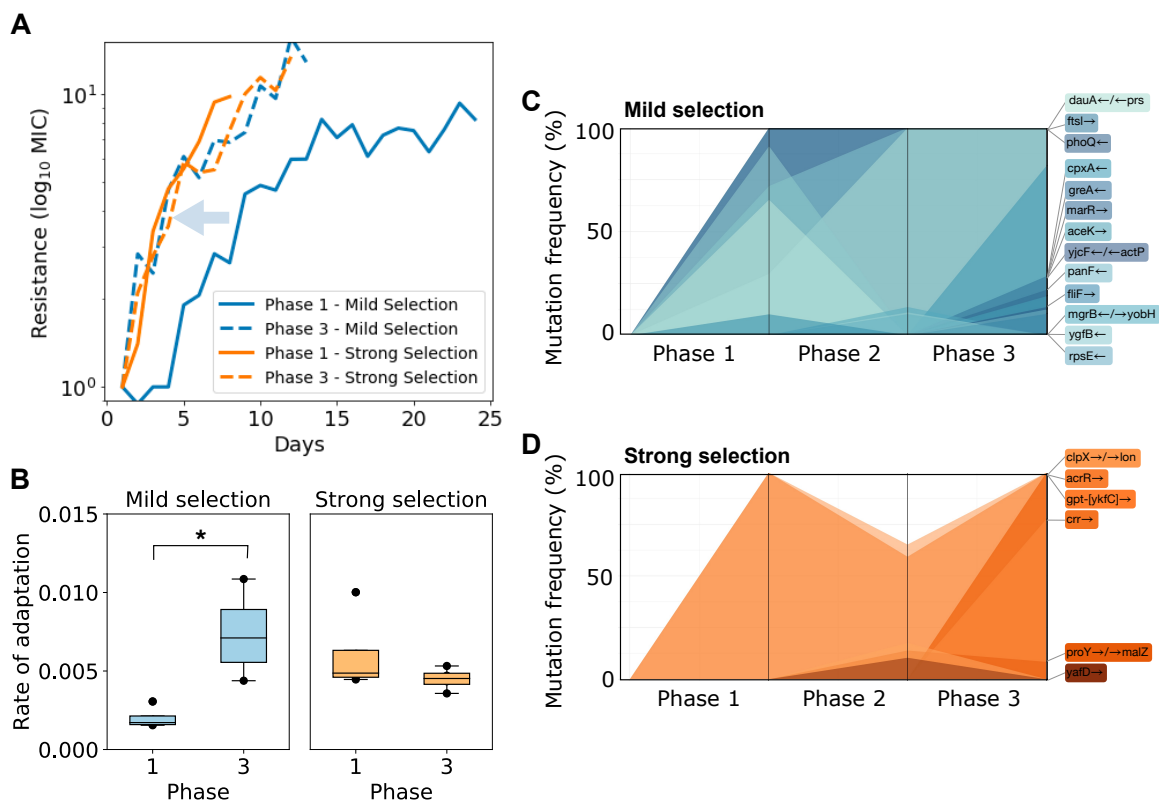


Figure 4. Drug resistance acceleration when antibiotics are re-introduced into the environment. A) -fold increase in resistance as a function of time; solid lines represent the first adaptive ramp (PHASE 1) and dotted lines the daily resistance when performing the adaptive ramp with the evolved populations obtained at the end of (PHASE 2). Note how phenotypic trajectories are similar for strong selection (orange lines), contrarily to mild selection (blue lines), where resistance adaptation is significantly faster in PHASE 3 compared to PHASE 1 (acceleration highlighted with the blue arrow). B) Comparison between rates of adaptation estimated for PHASE 1 and PHASE 3 (left: MS, right: SS) shows that resistance accelerated under mild selection, but not under strong selection. C-D) Frequency of mutations observed at different phases of the experiment (MS in blue, SS in orange). Note how resistant mutations that reach 100% frequency during PHASE 1 under SS (i.e. *acrR*, *clpX*) are unstable in the absence of selection, thus reducing in frequency during PHASE 2. In contrast, resistant mutations appearing at the end of PHASE 1 under mild selection are stable in the absence of selection (notably, *phoQ*), resulting in an accelerated rate of adaptation when antibiotics are re-introduced into the environment.

179 growth kinetic parameters: ρ , denoting the resource conversion rate, K the half-saturation constant, and a
 180 maximum resource uptake rate, μ . In our experimental system we observed a trade-off between the degree
 181 of resistance and fitness cost in the absence of antibiotics, a property that can be expressed theoretically by
 182 considering that, at low antibiotic concentrations, $u_{wt}(S) > u_m(S) > u_s(S)$.

183 To model the bactericidal effect by AMP, we consider that killing rate of each bacterial type is
 184 proportional to its density and the environmental drug concentration, with κ denoting the killing efficacy
 185 of the antibiotic. If we consider that $\kappa_{wt} > \kappa_m > \kappa_s$ then, at high antibiotic concentrations, resistant strains
 186 (i.e. B_m and B_s) present larger bacterial densities than the susceptible strain (B_s), as illustrated in Figure

187 5A.

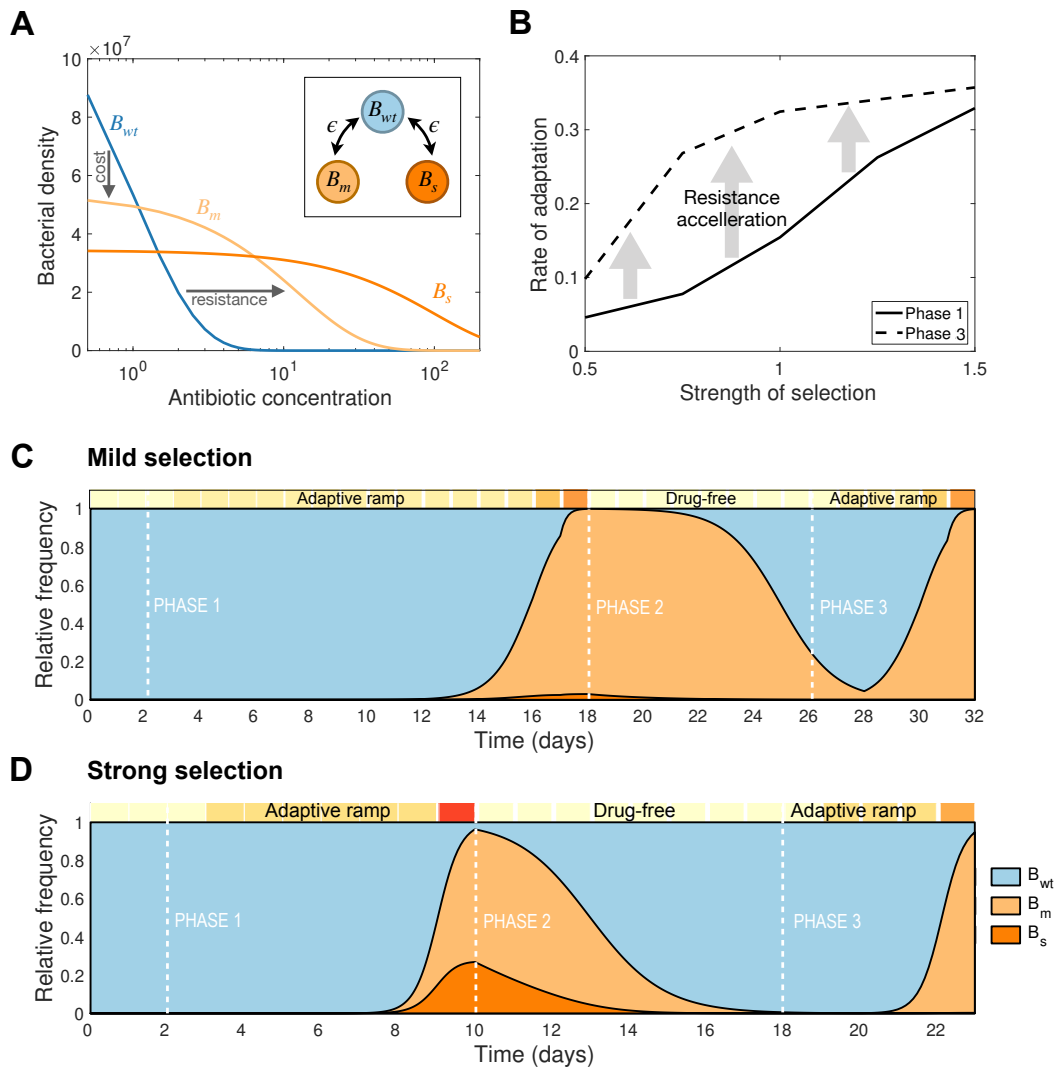


Figure 5. Numerical simulations of the population dynamics model. A) Theoretical dose-response curves estimated for each bacterial strain: a susceptible wild-type (B_{wt} , in blue), a mildly-resistant type (B_m , light orange) and a strongly-resistant strain (B_s , dark orange). Resistant mutations occur at a rate ϵ (see inset). A trade-off between resistance and fitness-cost is represented by resistant strains surviving at higher drug concentrations, albeit with a reduced density at lower doses with respect to B_{wt} . B) Rate of adaptation as a function of the strength of selection. Solid lines represent the rate of adaptation computed for PHASE 1, while dotted lines denote the rate of adaptation estimated for PHASE 3. The increase in rate of adaptation is maximized at intermediate strengths of selection, therefore we argue resistance acquisition accelerates (gray arrows). C-D) Relative frequencies of each bacterial type as a function of time computed by numerically simulating the evolutionary experiment; from an initial population composed exclusively of B_{wt} cells, we simulate a serial dilution experiment (boxes on top of each plot denote the environmental conditions: drug-free in yellow and high drug concentrations in red). After solving the system for two days in drug-free media, we simulate an adaptive ramp with different strengths of selection (PHASE 1): C) considering mild-selection, and, D) under strong selection. In both cases, once the level of resistance has achieved a 10-fold increase relative to the first day, the antibiotic is withdrawn from the environment for 8 days ((PHASE 2)), before re-starting the adaptive ramp (PHASE 3). Crucially, the duration of PHASE 3 is shorter than PHASE 1, suggesting that drug resistance adaptation accelerated at intermediate selective pressures.

1
2
3 188 We simulated all phases of the evolutionary experiment by numerically solving the system of ordinary
4 189 differential equations (described in the Methods, with parameter values defined in Table S6). As observed
5
6 190 in the experimental data, the rate of adaptation for the mild selection regime is lower than for strong
7
8 191 selection (10-fold increase in resistance was achieved in 18 days for MS, and in 10 days in SS). Note that,
9
10 192 at the end of the adaptive ramp (PHASE 1), the population structure was significantly different in both
11
12 193 cases; while in MS the population consisted almost entirely by B_m , the population that evolved under SS
13
14 194 was composed of both resistant types (B_m and B_s). As a result, when removing the antibiotic from the
15
16 195 environment (PHASE 2), both drug-resistant subpopulations are outcompeted by the susceptible strain and
17
18 196 eventually cleared from the population. But, crucially, the rate of decay of the resistant subpopulation is
19
20 197 faster under strong selection (Figure 5D) than in the mild selection regime (Figure 5C).

19 198 In consequence, when antibiotics are reintroduced into the system after a period of 8 days of relaxed
20
21 199 selection, a 10-fold increase in resistance is achieved faster than during PHASE 1 for both selective regimes.
22
23 200 Moreover, for MS, resistance adaptation was more than 60% faster in PHASE 3 than in PHASE 1, while
24
25 201 for SS the same level of resistance was achieved only 25% faster than before. We repeated this numerical
26
27 202 experiment for adaptive ramps with a range of selective pressures, and found that, as anticipated by the
28
29 203 experimental data, drug resistance acceleration is maximized at intermediate strengths of selection (grey
30
31 204 arrows in Figure 5B).

205 Discussion

32
33
34 206 Antimicrobial substances are the main selective agents responsible for the evolution and dissemination of
35
36 207 antibiotic resistance, both in the environment⁴⁸ and in clinical settings.⁴⁹ However, many fundamental
37
38 208 questions about the ecological and evolutionary forces that drive resistance adaptation remain largely
39
40 209 unexplored. Experimental evolution in controlled laboratory conditions has shown to be a powerful tool to
41
42 210 study the interaction between chance, selection and evolutionary history, as it enables to precisely control
43
44 211 the environmental conditions and to follow evolutionary trajectories towards resistance. Moreover, with
45
46 212 the use of bioinformatics and genomic analysis it is possible to study the accumulation of mutations when
47
48 213 antibiotic substances are used in combination^{28,29} or deployed sequentially,¹²⁻¹⁸ as well as to explore the
49
50 214 evolutionary consequences of temporal⁴¹ and spatial^{6,50} changes in the environmental drug concentration.

51 215 For instance, a recent study showed that strains that evolved in drug-free environments for over 50,000
52
53 216 generations were more susceptible to most antibiotics than their ancestor, with most of the change occurring
54
55 217 during the first 2,000 generations.⁵¹ When these strains were challenged to a range of drug concentrations,
56
57 218 evolved mutants showed, on average, a reduced capacity to evolve resistance relative to their ancestor, thus
58
59 219 suggesting that genetic background influences evolutionary pathways towards phenotypic resistance.⁵²
60 220 Whole-genome sequencing revealed that resistance was produced by divergent genetic changes resulting

1
2
3 221 from the exposure to different drugs, but also a consequence of different genetic backgrounds.⁵³

4
5 222 Furthermore, evolutionary change is driven by the interaction between the deterministic force of natural
6 223 selection and genetic variation produced by random mutations. But mutations may exhibit epistatic
7 224 interactions and express different phenotypes when present in different genetic backgrounds.^{52,54,55} As
8 225 a result, evolutionary history can produce contingencies that modify the *tempo* and *mode* of evolution,
9 226 with examples ranging from the evolution of innovation⁵⁶ and loss-of-function,⁵⁷ to compensation⁵⁸ and
10 227 reversibility of costly mutations.^{59,60}

11
12
13
14 228 In this paper, we used a high-throughput evolutionary experiment to probe the effect of different selec-
15 229 tive pressures in the evolutionary dynamics of recurrent drug exposures. We showed that different selective
16 230 pressures produce different genotypic profiles, and therefore we argue that phenotypic characterization
17 231 of strains (e.g. using MICs) is not informative enough when trying to design optimal drug therapies,
18 232 as equally resistant strains (although with different evolutionary histories) can result in very different
19 233 evolutionary dynamics towards resistance.

20
21
22
23
24 234 We also demonstrated that different mutational profiles produce differences in the stability of resistance
25 235 in the absence of selection. In particular, we found that strong selective pressures select for highly-resistant
26 236 mutants that are readily cleared in the absence of selection. This is consistent with previous studies
27 237 showing that high doses of antibiotics select for pathway-specific mutations that are generally associated
28 238 with a higher fitness cost.³⁶ In contrast, we found that mild selective pressures produce stable mutations
29 239 that are maintained in the absence of selection, resulting in a different evolutionary dynamics upon
30 240 antibiotic reintroduction.

31
32
33
34
35
36 241 Altogether, we have shown that the strength of selection is a critical parameter to be considered for the
37 242 design of rational treatment strategies. Indeed, most of our understanding of drug resistance evolution is
38 243 based on high-dose concentrations of antibiotics, but drug-polluted natural environments are ubiquitous due
39 244 to the use of antimicrobials in agriculture and as animal growth promotion,⁶¹⁻⁶³ with mounting evidence
40 245 demonstrating a correlation between anthropogenic drug pollution and selection for antibiotic-resistance
41 246 in human pathogens.^{48,64,65} Both our theoretical and experimental results suggest that sub-lethal doses of
42 247 antibiotics which, in principle, only impose a mild selection for resistance,^{50,66} select for stable resistance
43 248 mutations that can accelerate the rate of adaptation upon antibiotic reintroduction.

49 249 **Acknowledgements**

50 250 We thank S. Castillo and J. Silva for useful discussions. We are also thankful with A. Saralegui from
51 251 Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada for assistance using the flow cytometer and L. Lozano
52 252 from de Unit of Bioinformatics Analysis of the Center for Genome Sciences, UNAM. This project was
53 253 partially funded by CONACYT Ciencia Básica (grant A1-S-32164) awarded to RPM. SCM (a.k.a. Sandra
54 254 Mayoral Alvarez) is a doctoral student in Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad

255 Nacional Autónoma de México, and received fellowship 596192 from CONACYT. LGM and AFH were
256 funded by PAPIIT-UNAM (grant IN215920).

257 **Materials and Methods**

258 **Strains and culture condition**

259 All experiments were conducted using *Escherichia coli* MG1655 grown in M9 minimal media supple-
260 mented with 1 gr/L of casaminoacids, 2 gr/L of glucose and 5% of glycerol. All cultures were grown in
261 96 well plates at a maximum volume of 200 μ /L, incubated at a temperature of 30°C, and shaken at 150
262 rpm using an orbital incubator. We used Ampicillin sodium salt (A0166 from SIGMA) in stock at 100
263 mg/ml diluted water.

264 **Antibiotic susceptibility determination**

265 To determine the susceptibility to the antibiotic, we performed dose-response curves to Ampicillin in 96
266 microtitre plates with a maximum volume of 200 μ l. The experiment started with a stock solution of
267 Ampicillin at a concentration of 100mg/ml, which we diluted to make a dose-response curve consisting of
268 22 concentrations Table S1. Cultures in the plates were incubated at a temperature of 30°C, and shaken at
269 150 rpm using an orbital incubator. After 22 hours of growth, optical density at 630nm (OD) using a plate
270 reader (BioTek EL808x). To estimate the MIC of the population, we used dose-response experiments in
271 liquid media by exposing the population to a logarithmically-spaced vector of drug concentrations. We
272 estimated the percentage of inhibition based on the final OD of each population with respect to the control
273 with no antibiotic. By numerically interpolating the dose-response curve, we estimated the critical doses
274 used for MS (50% inhibition, IC50), and for SS (90% inhibition, IC90).

275 **Experimental evolution**

276 Our experimental protocol is adapted from.³⁶ For the evolutionary experiments, the antibiotics dilutions
277 of all 96-well plates were prepared with an OpenTrons pipetting robot using a bespoke script coded in
278 Python. The experiment is based on four replicates of a dose-response curve of Ampicillin with a range of
279 22 different concentrations (see Table S1). We evolved eight populations evolved in parallel following
280 two strategies: four populations were sampled each day based on sampled the populations that grew on
281 concentrations where inhibition achieved 90% (referred to as SS), and also populations that exhibited 50%
282 inhibition (MS) with respect to the drug-free control. The volume of each selected populations was diluted
283 at 1:5 in fresh medium, before transferring a sample of each population into a dose-response experiment
284 (with the same range of drug concentrations as before). We repeated this serial dilution protocol until all
285 populations achieved a 10-fold increase in resistance (8 days for SS, and 22 days for MS). Every time we
286 observed an increase in the MIC in one of the replicates, we froze the population at -80°C for subsequent
287 phenotypic and genotypic analysis. We then continued the serial dilution protocol for eight additional
288 days in the absence of antibiotics (Phase 2), and measured the MIC of the evolved populations every
289 day using the same range of drug concentrations as before. Finally, Phase 3 consists in transferring the
290 resulting populations to the adaptive ramp described in Phase 1. All the experiment was done following
291 the previous protocol, the cultures were grown for 22 hours, and we estimated the final optical density
292 with a plate reader (BioTeK EL808x) and measured the MIC as before, these populations were kept in
293 the freezer for subsequent analysis. Raw data and Python code used for analysis and visualization can be
294 found in <https://github.com/ccg-esb-lab/evoamp/>.

Genome Sequencing

The sequencing was made for whole populations at the end of the 3 Phases and clones at the end of Phase 1. Over three days, frozen samples from evolutionary experiments was revived overnight and gradually increased the volume and concentration of Ampicillin until the populations reached a high optical density and 10 MIC of resistance. We sample 2 of the 4 replicas for each experiment at the end of the 3 phases; Genomic DNA was isolated from each population using the DNeasy Blood & Tissue, QIAGEN kit. To select the clones, we dilute the final population 1:5 at the end of Phase 1. We plated 150 μ l of each sample in 3 petri dishes with Lb agar with pearls at an appropriate dilution and selected all the individual clones that appeared on the plate after 1 day of incubation at 30°C; then we grew each clone in a 96 well plate in M9 incubated at 30°C for 24h with liquid media to obtain growth curves and enough culture to isolate DNA. The growth rate of each sample was analyzed using the fitderiv program,⁶⁷ with a K-means algorithm that generates groups that are potentially different from each other. The algorithm randomly selected one member from each group for sequencing. Genomic DNA was isolated from each clone using the DNeasy Blood & Tissue, QIAGEN kit.

All samples were genotyped by Illumina WGS using a NextSeq platform in a 2 x 75 bp paired-end configuration. We sequenced clones of each population with 40x coverage and populations with 100x coverage for each sample. Reads were trimmed using Trimmomatic⁶⁸ with the following parameters: LEADING:3 TRAILING:3303SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:50. Clones and populations variant calling analysis was performed with breseq v0.35.7,⁶⁹ using default parameter settings. Option -p was used when analyzing population samples. We used Escherichia coli K12 substrain MG1655 genome as reference (Refseq sequence: NC_000913.3). Different phases of the experiment were compared with gdttools from breseq. To avoid false positives we removed mutations that never reached a frequency of 0.10 and mutations also present in the ancestor genome but not in the reference genome. To assign mutated genes to functional categories defined in the Cluster of Orthologous Groups database,⁷⁰ we used RPS-BLAST+ and the NCBI Conserved Domain Database. The output was analyzed as in.⁷¹ For the analysis of genotypes, we choose 2 replicas of the 4 of each treatment, with a control at the end of the experiment and the parental strain for each treatment, resulting in a total of 28 time points. Sequencing data was deposited at the NCBI under the [BioProject ID PRJNA771356](#).

Population dynamics model

We used a simple mathematical model of microbial growth under resource limitation to study the evolutionary dynamics of a clonal bacterial population exposed to increasing concentrations of antibiotic. Bacterial growth rate was modeled as a saturating function of the environmental resource concentration, S , with the Monod term: $u(S) = \frac{\mu B}{K+B}$ where μ represents the maximum resource uptake rate and K the half-saturation constant. Therefore bacterial growth rate of each bacterial strain is given the resource uptake function multiplied by ρ , a resource conversion coefficient that represents the efficiency of each bacterial type in converting resource molecules into biomass.

For simplicity, we consider three bacterial types: a susceptible wild-type (B_{wt}), a mildly-resistant resistant strain (B_m), and a strongly-resistant strain (B_s). If we denote the concentration of antibiotic as $A \geq 0$, then bactericidal activity can be represented by parameter κ (by definition, $\kappa_{wt} > \kappa_m > \kappa_s$). We consider that resistance is associated with a fitness cost in the absence of positive selection for genes encoding resistance mechanisms, by introducing constraints in parameter values such that, in low-drug environments, $u_{wt}(S) > u_m(S) > u_s(S)$ (see [Table S6](#) for parameter values used). Resistance acquisition occurs by a single point mutation occurring at a rate $0 < \varepsilon \ll 1$. We consider that resistance can be reversed at a rate ε , but that B_s cannot mutate into B_m , or vice versa.

Then the population dynamics occurring in a single day can be written as a set of ordinary differential equations:

$$\frac{dS}{dt} = -u_{wt}(S) \cdot B_{wt} - u_m(S) \cdot B_m - u_s(S) \cdot B_s, \quad (1a)$$

$$\frac{dA}{dt} = -A(\alpha_{wt}B_{wt} + \alpha_m B_m + \alpha_s B_s), \quad (1b)$$

$$\frac{dB_{wt}}{dt} = (1 - 2\varepsilon)\rho_{wt} \cdot u_{wt}(S) \cdot B_{wt} + \varepsilon(\rho_s \cdot u_s(S) \cdot B_s + \rho_r \cdot u_r(S)B_r) - \kappa_{wt}B_{wt}A, \quad (1c)$$

$$\frac{dB_m}{dt} = (1 - \varepsilon)\rho_m \cdot u_m(S) \cdot B_m + \varepsilon\rho_{wt} \cdot u_{wt}(S) \cdot B_{wt} - \kappa_m B_s A, \quad (1d)$$

$$\frac{dB_s}{dt} = (1 - \varepsilon)\rho \cdot u_s(S) \cdot B_s + \varepsilon\rho_{wt} \cdot u_{wt}(S) \cdot B_{wt} - \kappa_s B_s A. \quad (1e)$$

Now, to model a serial dilution experiment we will consider that each transfer has a duration of T hours, with $t \in [0, T]$. Therefore the state of the system in day i can be represented with the vector $x^i(t) = (S^i(t), A^i(t), B_{wt}^i(t), B_m^i(t), B_s^i(t))$. In particular, to reflect that the evolutionary experiment considers an initial population consisting exclusively of susceptible cells, we consider that the initial conditions the first day are $x^0(0) = (S^0(0), A^0(0), B_{wt}^0, 0, 0)$. For subsequent days, $i > 0$, the initial conditions of the system can be written as $x^i(0) = (S^i(0), A^i(0), B_{wt}^i(0), B_m^i(0), B_s^i(0)) = (S_0, A_0^i, \eta \cdot B_{wt}^{i-1}(T), \eta \cdot B_m^{i-1}(T), \eta \cdot B_s^{i-1}(T))$, where $\eta > 0$ represents a dilution parameter, and S_0 is a fixed parameter denoting the daily initial concentration of limiting resource. Finally, the drug concentration used each day, A_0^i , is defined based on the treatment regime under consideration. Numerical simulations of the model were performed in Matlab, with scripts available in <https://github.com/ccg-esb-lab/evoamp/>.

References

1. Kåhrström, C. T. Entering a post-antibiotic era? *Nature Reviews Microbiology* **11**, 146–146 (2013).
2. Davies, J. & Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 417–433 (2010).
3. Årdal, C. *et al.* Antibiotic development — economic, regulatory and societal challenges. *Nature Reviews Microbiology* **18**, 267–274 (2020).
4. Alanis, A. J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research* **36**, 697–705 (2005).
5. Bush, K. *et al.* Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 894–896 (2011).
6. Baym, M., Stone, L. K. & Kishony, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science* **351** (2016).
7. De Waele, J. J. & Martin-Loeches, I. Optimal duration of antibiotic treatment in gram-negative infections. *Current opinion in infectious diseases* **31**, 606–611 (2018).
8. Spellberg, B. & Rice, L. B. Duration of antibiotic therapy: shorter is better. *Annals of internal medicine* **171**, 210–211 (2019).
9. Andersson, D. I. & Hughes, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology* **8**, 260–271 (2010).

- 366 **10.** Pena-Miller, R., Lähnemann, D., Schulenburg, H., Ackermann, M. & Beardmore, R. The optimal deployment
367 of synergistic antibiotics: a control-theoretic approach. *Journal of The Royal Society Interface* **9**, 2488–2502
368 (2012).
- 369 **11.** Aulin, L. B., Liakopoulos, A., van der Graaf, P. H., Rozen, D. E. & van Hasselt, J. C. Design principles of
370 collateral sensitivity-based dosing strategies. *Nature Communications* **12** (2021).
- 371 **12.** Imamovic, L. & Sommer, M. O. Use of collateral sensitivity networks to design drug cycling protocols that
372 avoid resistance development. *Science translational medicine* **5**, 204ra132–204ra132 (2013).
- 373 **13.** Kim, S., Lieberman, T. D. & Kishony, R. Alternating antibiotic treatments constrain evolutionary paths to
374 multidrug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 14494–14499 (2014).
- 375 **14.** Fuentes-Hernandez, A. *et al.* Using a sequential regimen to eliminate bacteria at sublethal antibiotic dosages.
376 *PLoS biology* **13**, e1002104 (2015).
- 377 **15.** Pál, C., Papp, B. & Lázár, V. Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. *Trends in microbiology* **23**,
378 401–407 (2015).
- 379 **16.** Roemhild, R. & Schulenburg, H. Evolutionary ecology meets the antibiotic crisis: Can we control pathogen
380 adaptation through sequential therapy? *Evolution, medicine, and public health* **2019**, 37–45 (2019).
- 381 **17.** Batra, A. *et al.* High potency of sequential therapy with only β -lactam antibiotics. *Elife* **10** (2021).
- 382 **18.** Barbosa, C. *et al.* The genomic basis of rapid adaptation to antibiotic combination therapy in pseudomonas
383 aeruginosa. *Molecular Biology and Evolution* **38**, 449–464 (2021).
- 384 **19.** Sabuncu, E. *et al.* Significant reduction of antibiotic use in the community after a nationwide campaign in
385 france, 2002–2007. *PLoS Med* **6**, e1000084 (2009).
- 386 **20.** De Bus, L. *et al.* Impact of de-escalation of beta-lactam antibiotics on the emergence of antibiotic resistance in
387 icu patients: a retrospective observational study. *Intensive care medicine* **42**, 1029–1039 (2016).
- 388 **21.** van Duijn, P. J. *et al.* The effects of antibiotic cycling and mixing on antibiotic resistance in intensive care units:
389 a cluster-randomised crossover trial. *The Lancet Infectious Diseases* **18**, 401–409 (2018).
- 390 **22.** Beardmore, R. E., Peña-Miller, R., Gori, F. & Iredell, J. Antibiotic cycling and antibiotic mixing: which one
391 best mitigates antibiotic resistance? *Molecular biology and evolution* **34**, 802–817 (2017).
- 392 **23.** Weinreich, D. M., Delaney, N. F., DePristo, M. A. & Hartl, D. L. Darwinian evolution can follow only very few
393 mutational paths to fitter proteins. *science* **312**, 111–114 (2006).
- 394 **24.** Blount, Z. D., Lenski, R. E. & Losos, J. B. Contingency and determinism in evolution: Replaying life's tape.
395 *Science* **362** (2018).
- 396 **25.** Santos-Lopez, A. *et al.* The roles of history, chance, and natural selection in the evolution of antibiotic resistance.
397 *Elife* **10**, e70676 (2021).
- 398 **26.** Roemhild, R. *et al.* Cellular hysteresis as a principle to maximize the efficacy of antibiotic therapy. *Proceedings*
399 *of the National Academy of Sciences* **115**, 9767–9772 (2018).
- 400 **27.** Jansen, G., Barbosa, C. & Schulenburg, H. Experimental evolution as an efficient tool to dissect adaptive paths
401 to antibiotic resistance. *Drug Resistance Updates* **16**, 96–107 (2013).
- 402 **28.** Hegreness, M., Shores, N., Damian, D., Hartl, D. & Kishony, R. Accelerated evolution of resistance in
403 multidrug environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 13977–13981 (2008).

- 1
2
3 404 **29.** Pena-Miller, R. *et al.* When the most potent combination of antibiotics selects for the greatest bacterial load:
4 405 the smile-frown transition. *PLoS Biol* **11**, e1001540 (2013).
- 5
6 406 **30.** Olliver, A., Vallé, M., Chaslus-Dancla, E. & Cloeckaert, A. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance
7 407 of in vitro-selected fluoroquinolone-resistant mutants of salmonella enterica serovar typhimurium. *FEMS*
8 408 *Microbiol. Lett.* **238**, 267–272 (2004).
- 9
10 409 **31.** Wang, H., Dzink-Fox, J. L., Chen, M. & Levy, S. B. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant
11 410 clinical escherichia coli strains from china: role of *acrR* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1515–1521
12 411 (2001).
- 13
14 412 **32.** Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H. & Hearst, J. E. The local repressor AcrR plays a modulating role in
15 413 the regulation of *acrAB* genes of escherichia coli by global stress signals. *Mol. Microbiol.* **19**, 101–112 (1996).
- 16
17 414 **33.** Yao, Z., Kahne, D. & Kishony, R. Distinct single-cell morphological dynamics under beta-lactam antibiotics.
18 415 *Mol. Cell* **48**, 705–712 (2012).
- 19
20 416 **34.** Ghigo Jean-Marc & Beckwith Jon. Cell division in escherichia coli: Role of FtsL domains in septal localization,
21 417 function, and oligomerization. *J. Bacteriol.* **182**, 116–129 (2000).
- 22
23 418 **35.** Buddelmeijer, N. & Beckwith, J. A complex of the escherichia coli cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ
24 419 forms independently of its localization to the septal region. *Mol. Microbiol.* **52**, 1315–1327 (2004).
- 25
26 420 **36.** Oz, T. *et al.* Strength of selection pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic
27 421 resistance evolution. *Molecular biology and evolution* **31**, 2387–2401 (2014).
- 28
29 422 **37.** Barbosa, C., Römhild, R., Rosenstiel, P. & Schulenburg, H. Evolutionary stability of collateral sensitivity to
30 423 antibiotics in the model pathogen pseudomonas aeruginosa. *Elife* **8**, e51481 (2019).
- 31
32 424 **38.** Barbosa, C. *et al.* Alternative evolutionary paths to bacterial antibiotic resistance cause distinct collateral effects.
33 425 *Mol. Biol. Evol.* **34**, 2229–2244 (2017).
- 34
35 426 **39.** Kato, A., Tanabe, H. & Utsumi, R. Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in
36 427 escherichia coli k-12: identification of extracellular mg²⁺-responsive promoters. *J. Bacteriol.* **181**, 5516–5520
37 428 (1999).
- 38
39 429 **40.** Prost, L. R. *et al.* Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic ph. *Mol. Cell* **26**, 165–174 (2007).
- 40
41 430 **41.** Toprak, E. *et al.* Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nature*
42 431 *genetics* **44**, 101–105 (2012).
- 43
44 432 **42.** Pennings, P. S. Standing genetic variation and the evolution of drug resistance in hiv. *PLoS Comput Biol* **8**,
45 433 e1002527 (2012).
- 46
47 434 **43.** Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A. & Barlow, M. Growth rates made easy. *Molecular biology and evolution*
48 435 **31**, 232–238 (2014).
- 49
50 436 **44.** Andersson, D. I. & Hughes, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev.*
51 437 *Microbiol.* **8**, 260–271 (2010).
- 52
53 438 **45.** Card, K. J., Jordan, J. A. & Lenski, R. E. Idiosyncratic variation in the fitness costs of tetracycline-resistance
54 439 mutations in escherichia coli. *Evolution* **75**, 1230–1238 (2021).
- 55
56 440 **46.** Smith, H. L. & Waltman, P. *The theory of the chemostat: dynamics of microbial competition*, vol. 13 (Cambridge
57 441 university press, 1995).

- 1
2
3 442 **47.** Peña-Miller, R., Lähnemann, D., Schulenburg, H., Ackermann, M. & Beardmore, R. Selecting against antibiotic-
4 443 resistant pathogens: optimal treatments in the presence of commensal bacteria. *Bulletin of mathematical biology*
5 444 **74**, 908–934 (2012).
- 6
7 445 **48.** Berendonk, T. U. *et al.* Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiol-*
8 446 *ogy* **13**, 310–317 (2015).
- 9
10 447 **49.** Medeiros, A. A. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics.
11 448 *Clinical Infectious Diseases* **24**, S19–S45 (1997).
- 12
13 449 **50.** Fuentes-Hernández, A., Hernández-Koutoucheva, A., Muñoz, A. F., Domínguez Palestino, R. & Peña-Miller,
14 450 R. Diffusion-driven enhancement of the antibiotic resistance selection window. *Journal of the Royal Society*
15 451 *Interface* **16**, 20190363 (2019).
- 16
17 452 **51.** Lamrabet, O., Martin, M., Lenski, R. E. & Schneider, D. Changes in intrinsic antibiotic susceptibility during a
18 453 long-term evolution experiment with escherichia coli. *Mbio* **10** (2019).
- 19
20 454 **52.** Card, K. J., LaBar, T., Gomez, J. B. & Lenski, R. E. Historical contingency in the evolution of antibiotic
21 455 resistance after decades of relaxed selection. *PLoS biology* **17**, e3000397 (2019).
- 22
23 456 **53.** Card, K. J., Thomas, M. D., Graves, J. L., Barrick, J. E. & Lenski, R. E. Genomic evolution of antibiotic resis-
24 457 tance is contingent on genetic background following a long-term experiment with escherichia coli. *Proceedings*
25 458 *of the National Academy of Sciences* **118** (2021).
- 26
27 459 **54.** Lukačišinová, M., Fernando, B. & Bollenbach, T. Highly parallel lab evolution reveals that epistasis can curb
28 460 the evolution of antibiotic resistance. *Nature communications* **11**, 1–14 (2020).
- 29
30 461 **55.** Rousset, F. *et al.* The impact of genetic diversity on gene essentiality within the e. coli species. *Nature*
31 462 *Microbiology* (2021).
- 32
33 463 **56.** Meyer, J. R. *et al.* Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda. *Science*
34 464 **335**, 428–432 (2012).
- 35
36 465 **57.** Galardini, M. *et al.* The impact of the genetic background on gene deletion phenotypes in saccharomyces
37 466 cerevisiae. *Molecular systems biology* **15**, e8831 (2019).
- 38
39 467 **58.** Levin, B. R., Perrot, V. & Walker, N. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics
40 468 of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* **154**, 985–997 (2000).
- 41
42 469 **59.** Crill, W. D., Wichman, H. A. & Bull, J. Evolutionary reversals during viral adaptation to alternating hosts.
43 470 *Genetics* **154**, 27–37 (2000).
- 44
45 471 **60.** Rebolleda-Gómez, M. & Travisano, M. Adaptation, chance, and history in experimental evolution reversals to
46 472 unicellularity. *Evolution* **73**, 73–83 (2019).
- 47
48 473 **61.** Szekeres, E. *et al.* Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in ground-
49 474 water in relation to the proximity of urban areas. *Environ. Pollut.* **236**, 734–744 (2018).
- 50
51 475 **62.** Zhou, L. *et al.* Environmental concentrations of antibiotics impair zebrafish gut health. *Environ. Pollut.* **235**,
52 476 245–254 (2018).
- 53
54 477 **63.** Martinez, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.*
55 478 **157**, 2893–2902 (2009).
- 56
57 479 **64.** Kraemer, S. A., Ramachandran, A. & Perron, G. G. Antibiotic pollution in the environment: from microbial
58 480 ecology to public policy. *Microorganisms* **7**, 180 (2019).

- 1
2
3 481 **65.** Hernández-González, I. L. & Castillo-Ramírez, S. Antibiotic-resistant acinetobacter baumannii is a one health
4 482 problem. *The Lancet Microbe* **1**, e279 (2020).
- 5
6 483 **66.** Gullberg, E. *et al.* Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens* **7**,
7 484 e1002158 (2011).
- 8
9 485 **67.** Swain, P. *et al.* Inferring time derivatives including cell growth rates using gaussian processes. *Nature*
10 486 *Communications* **7** (2016).
- 11
12 487 **68.** Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinfor-*
13 488 *matics* **30**, 2114–2120 (2014).
- 14
15 489 **69.** Deatherage, D. E. & Barrick, J. E. Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-
16 490 generation sequencing data using breseq. *Methods Mol. Biol.* **1151**, 165–188 (2014).
- 17
18 491 **70.** Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A. & Koonin, E. V. The COG database: a tool for genome-scale
19 492 analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* **28**, 33–36 (2000).
- 20 493 **71.** Leimbach, A. bac-genomics-scripts: Bovine e. coli mastitis comparative genomics edition (2016).
- 21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table S1. Ampicillin concentrations used in the dose-response experiments.

Key	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	MIC relative to WT
M	0	0
D1	1	0.25
D2	2	1
D3	4	2
D4	5.2	2.6
D5	6.8	3.4
D6	8.4	4.2
D7	11.2	5.6
D8	14.4	7.2
D9	18.4	9.4
D10	20	10
D11	30.8	15.4
D12	40	20
D13	52	26
D14	68	34
D15	86	43
D16	111.2	55.6
D17	144	72
D18	184	92
D19	240	160
D20	309.6	154.8
D21	400	200

Table S6. Parameters used in the numerical solutions of the population dynamics model

Parameter	Value	Description
ρ_*	$(1.5 \times 10^9, 1.5 \times 10^9, 1.5 \times 10^9)$ cell μg^{-1}	resource conversion coefficient (B_{wt}, B_m, B_s)
μ_*	$(3.6 \times 10^{-9}, 2.25 \times 10^{-9}, 1.65 \times 10^{-9})$ $\mu\text{g cell}^{-1}\text{h}^{-1}$	maximum uptake rate (B_{wt}, B_m, B_s)
K_*	$(1, 1, 1)$ $\mu\text{g ml}^{-1}$	half-saturation constant (B_{wt}, B_m, B_s)
κ_*	$(1, 0.08, 0.01)$	antibiotic killing efficacy (B_{wt}, B_m, B_s)
ε	1×10^{-8} per locus, per cell, per division	mutation rate
η	0.1% of biomass	dilution parameter
S_0	$1 \mu\text{g ml}^{-1}$	resource supply concentration
T	24 hours	duration of each season

Table S2. List of mutated genes from the sequenced populations from the mild selection regime.

	Gene	Phase 1 (%)	Phase 2 (%)	Phase 3 (%)	Diversity	Category
Mild selection	clpX → / → Ion	65.3	0	0	Indel	O/O
	dauA ← / ← prs	26.9	100	100	Intergenic SNP	P/F,E
	mgrB ← / →yobH	91.1	0	0	Indel	
	mgrB ← / →yobH	71.9	100	100	Indel	
	fadJ←	0	11	0	Non-Syn SNP	I
	ygfB ←	0	13.6	0	Non-Syn SNP	S
	panF →	0	0	12.4	Non-Syn SNP	H
	rpsE →	0	10.2	0	Syn SNP	J
	ftsI ←	100	100	100	Non-Syn SNP	M
	dnaX →	10.1	0	0	Non-Syn SNP	L
	phoQ →	100	100	100	Non-Syn SNP	T
	marR →	0	0	21.9	Indel	K
	cpxA ←	0	0	81.7	Indel	T
	fliF →	0	0	10.3	Non-Syn SNP	N,U
	greA ←	0	0	28.5	Indel	K
	aceK ←	0	0	18.8	Non-Syn SNP	T
yjcF ← / ← actP	0	0	13.6	Intergenic SNP	S/R	

Table S3. List of mutated genes from the sequenced populations from the strong selection regime.

	Gene	Phase 1 (%)	Phase 2 (%)	Phase 3 (%)	Diversity	Category
Strong selection	yafD →	0	10.4	0	Non-Syn SNP	S
	clpX → / → Ion	100	65.2	100	Indel	O/O
	acrR →	100	59.3	100	Indel	S
	crr →	0	0	77.5	Indel	G
	ttdr←	0	17.6	0	Non-Syn SNP	K
	gpt-[ykfC]	0	0	100	Indel	
	proY →/→ malZ	0	13.9	8.4	Intergenic SNP	E/G
	ispB →/→ sfsB	0	0	100	Indel	H/K

Table S4. Functional categories

E	Amino Acid metabolism and transport
G	Carbohydrate metabolism and transport
H	Coenzyme metabolism
I	Lipid metabolism
J	Translation
K	Transcription
L	Replication and repair
M	Cell wall/membrane/envelop biogenesis
N	Cell motility
O	Post-trasnlational modification, protein turnover, chaperone functions
P	Inorganic ion transport and metabolism
S	Function Unknown

Table S5. Complete list of mutated genes from the sequenced clones.

	Replicate ID	Clone ID	Gene	Cluster	%	V_{max}	MIC
Mild selection	MS_R1_A17+M0	C2	dauA → / ← prs	2	100	6.86	3.4
	MS_R1_A17+M7	C50	kdsA → / ← ldrD_1	1	94	9.48	2.0
		C9		2	2	9.48	2.0
	MS_R4_A12+M0	C9	phoQ →	1	32.1	9.48	5.56
		C26	phoQ →	2	7.1	7.77	15.0
		C16	phoQ →, ftsI ←	3	3.6	13.0	7.2
		C8	phoQ →, ftsI ←	4	53.6	10.5	7.2
	MS_R4_A12+M7	C10	phoQ →, ftsI ←	6	3.6	17.0	7.2
		C5	phoQ →, ftsI ←	1	77.1	9.47	9.2
	C13	phoQ →, ftsI ←	5	22.9	10.4	9.2	
Strong selection	SS_R1_A7+M0	C6	dauA → / ← prs	2	22.2	13.70	4.20
	SS_R1_A7+M7	C19		3	83.3	12.8	2.6
		C8		5	8.3	12.3	2.6
		C7		6	4.2	16.6	2.6
	SS_R3_A7+M0	C73		1	83.8	9.46	7.2
		C26		2	12.5	7.77	9.2
		C70		3	2.5	14	9.2
		C71		5	1.25	11.7	4.2
	SS_R3_A7+M7	C7	typA ← / → glnA	1	74.4	16.6	4.2
		C38		2	20.5	8.32	9.2
C1		rhsC_1 →, kdsA → / ← ldrD_1	5	5.2	11.1	4.2	

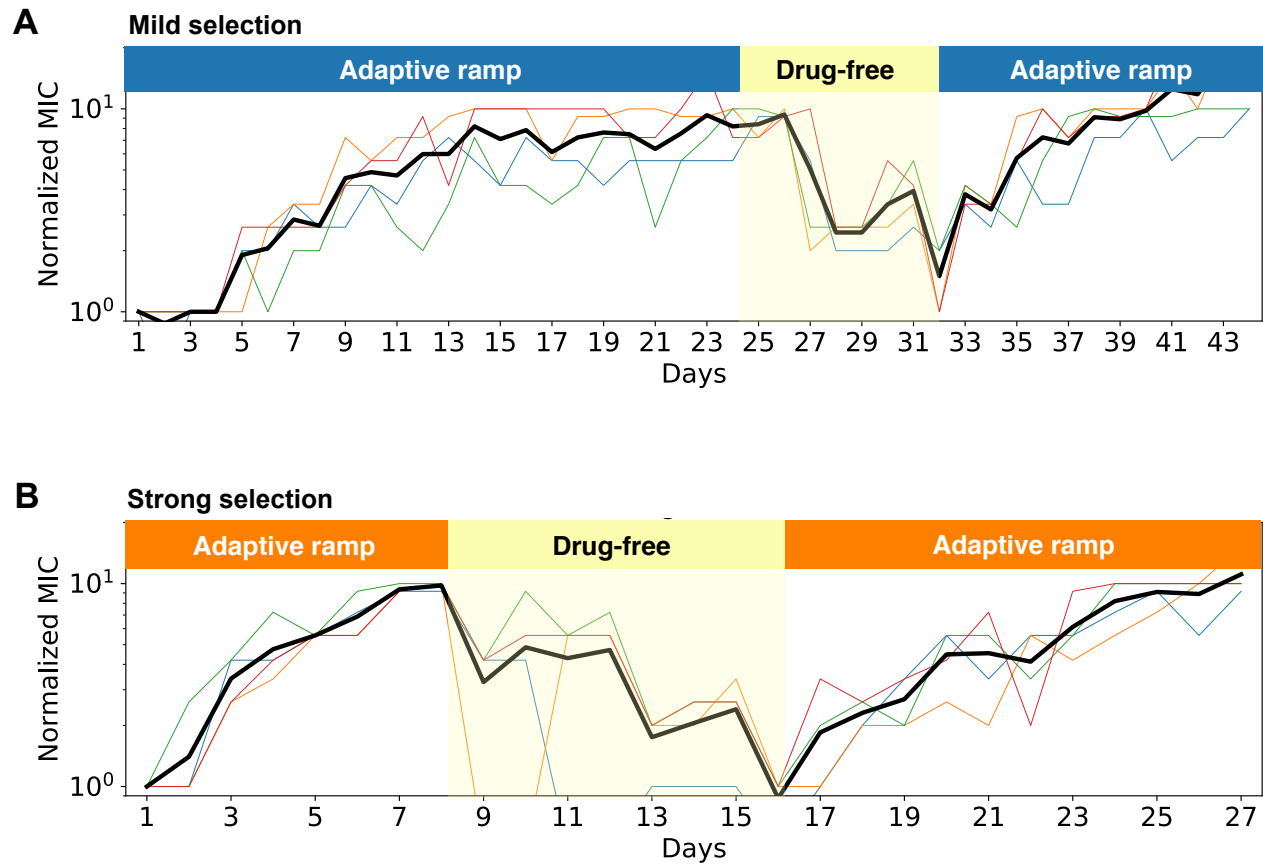


Figure S1. Resistance levels (in units of MIC) during all phases of the evolutionary experiment. Colored lines represent each replicate population, and black line the mean resistance. A) Mild selection. B) Strong selection.

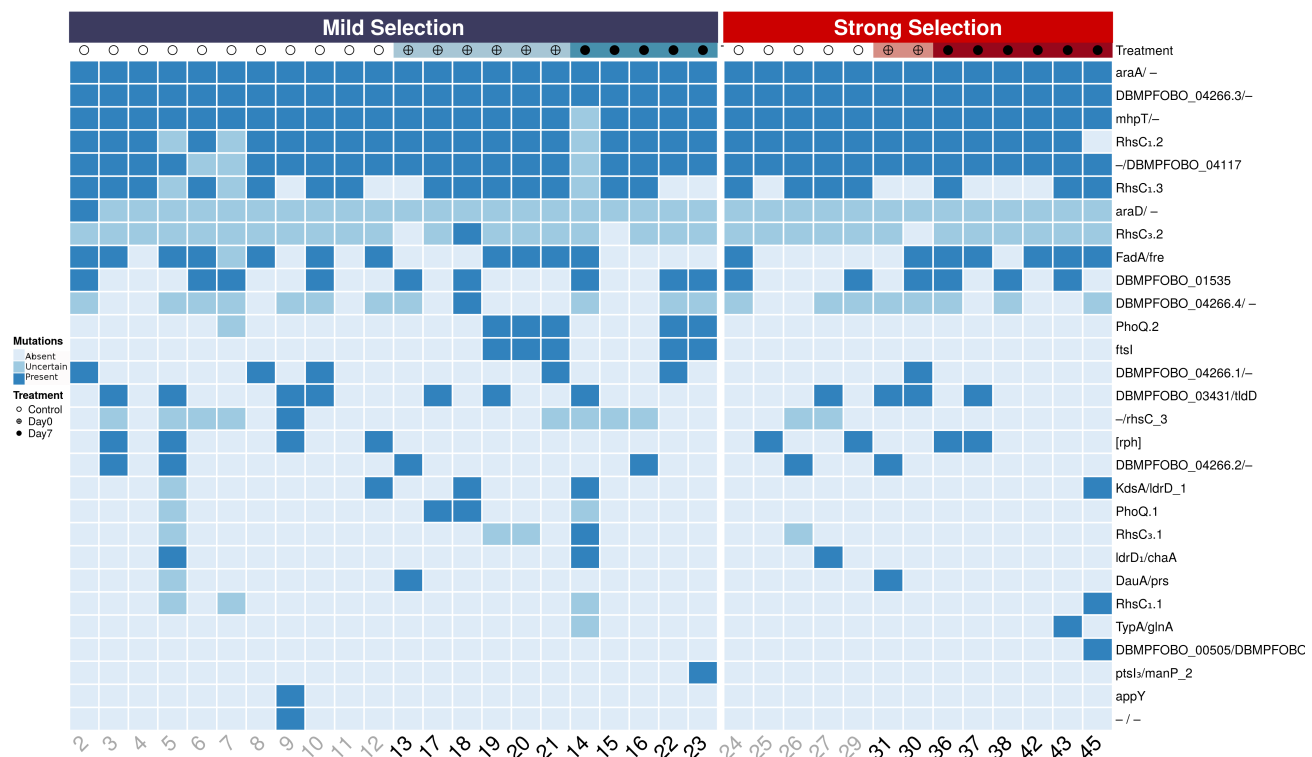


Figure S2. Heatmap illustrating the mutational profile obtained for each selection regime by sequencing clones randomly sampled from the evolved populations (left: mild selection, right: strong selection). Rows correspond to resistance genes, while columns represent clones sampled from the population.

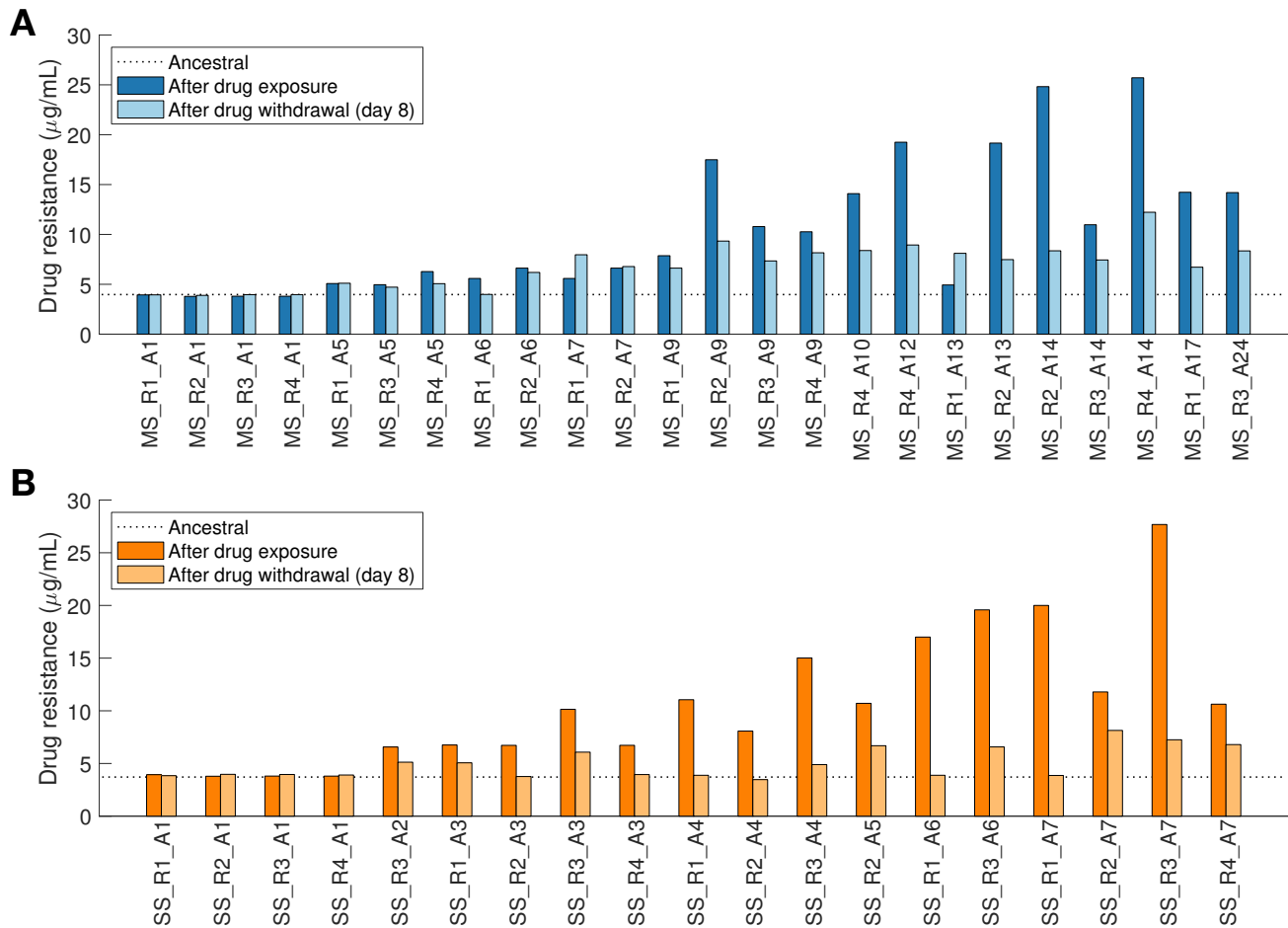


Figure S3. Bar plots illustrating drug resistance levels estimated for sample populations obtained during the adaptive ramp (dark color), and after eight days of relaxed selection (light color). Replicate populations were selected from PHASE 1 and every time there was an observable increase in resistance. A) Mild selection (blue). B) Strong selection (orange).

Material Suplementario

Script de Python

Script personalizado en Python para el uso del robot pipeteador OpenTrons (OT-1). Este script nos permitía preparar dos microplacas de 96 pozos, utilizando las concentraciones de la Tabla S1.

#####

#

SCRIPT GENERATED ON 06/02/2017 FROM THE FOLLOWING LAYOUT FILES:

fileDictName=layouts/EvoAMP_key_dict.txt

fileTroughName=layouts/EvoAMP_trough_layout.txt

fileLayoutName=layouts/EvoAMP_layout_2plates.txt

#

#####

from opentrons import Robot

from opentrons import containers, instruments

from itertools import chain

robot = Robot()

p200rack = containers.load('tiprack-200ul', 'A2', 'tiprack')

trough = containers.load('tube-rack-15_50ml', 'B2', 'trough')

for tube in trough:

 tube.properties['height']+=50

plate1 = containers.load('96-PCR-flat', 'C2', 'plate-1')

plate2 = containers.load('96-PCR-flat', 'D2', 'plate-2')

trash = containers.load('point', 'A1', 'trash')

p200 = instruments.Pipette(name='p200', trash_container=trash, tip_racks=[p200rack], min_volume=18, axis='b', channels=1)

p200.set_max_volume(180)

p200.pick_up_tip(p200rack['0'])#

#p200.move_to(plate1[0].bottom(), 'arc')

#p200.move_to(plate1[95].bottom(), 'arc')

#p200.move_to(plate2[0].bottom(), 'arc')

#p200.move_to(plate2[95].bottom(), 'arc')

***** Dispense M9

p200.aspirate(158, trough['A3'].bottom(90))

p200.dispense(25, plate1[41].top(-2)).touch_tip() #1: <Slot C2><Well B6>

p200.dispense(25, plate1[43].top(-2)).touch_tip() #2: <Slot C2><Well D6>

p200.dispense(25, plate1[45].top(-2)).touch_tip() #3: <Slot C2><Well F6>

p200.dispense(25, plate1[47].top(-2)).touch_tip() #4: <Slot C2><Well H6>

p200.dispense(29, plate1[64].top(-2)).touch_tip() #5: <Slot C2><Well A9>

p200.dispense(29, plate1[66].top(-2)).touch_tip() #6: <Slot C2><Well C9>

p200.aspirate(174, trough['A3'].bottom(89))

p200.dispense(29, plate1[68].top(-2)).touch_tip() #7: <Slot C2><Well E9>

p200.dispense(29, plate1[70].top(-2)).touch_tip() #8: <Slot C2><Well G9>

p200.dispense(58, plate1[56].top(-2)).touch_tip() #9: <Slot C2><Well A8>

p200.dispense(58, plate1[33].top(-2)).touch_tip() #10: <Slot C2><Well B5>

p200.aspirate(174, trough['A3'].bottom(89))

p200.dispense(58, plate1[58].top(-2)).touch_tip() #11: <Slot C2><Well C8>

p200.dispense(58, plate1[35].top(-2)).touch_tip() #12: <Slot C2><Well D5>

p200.dispense(58, plate1[60].top(-2)).touch_tip() #13: <Slot C2><Well E8>

p200.aspirate(174, trough['A3'].bottom(89))

p200.dispense(58, plate1[37].top(-2)).touch_tip() #14: <Slot C2><Well F5>

p200.dispense(58, plate1[62].top(-2)).touch_tip() #15: <Slot C2><Well G8>

p200.dispense(58, plate1[39].top(-2)).touch_tip() #16: <Slot C2><Well H5>

p200.aspirate(172, trough['A3'].bottom(88))

p200.dispense(86, plate1[48].top(-2)).touch_tip() #17: <Slot C2><Well A7>

p200.dispense(86, plate1[25].top(-2)).touch_tip() #18: <Slot C2><Well B4>

p200.aspirate(172, trough['A3'].bottom(88))

p200.dispense(86, plate1[50].top(-2)).touch_tip() #19: <Slot C2><Well C7>

p200.dispense(86, plate1[27].top(-2)).touch_tip() #20: <Slot C2><Well D4>

p200.aspirate(172, trough['A3'].bottom(88))

p200.dispense(86, plate1[52].top(-2)).touch_tip() #21: <Slot C2><Well E7>

p200.dispense(86, plate1[29].top(-2)).touch_tip() #22: <Slot C2><Well F4>

p200.aspirate(172, trough['A3'].bottom(87))

p200.dispense(86, plate1[54].top(-2)).touch_tip() #23: <Slot C2><Well G7>

p200.dispense(86, plate1[31].top(-2)).touch_tip() #24: <Slot C2><Well H4>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(87))

p200.dispense(108, plate1[40].top(-2)).touch_tip() #25: <Slot C2><Well A6>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(87))

p200.dispense(108, plate1[17].top(-2)).touch_tip() #26: <Slot C2><Well B3>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(87))

p200.dispense(108, plate1[89].top(-2)).touch_tip() #27: <Slot C2><Well B12>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(87))

p200.dispense(108, plate1[42].top(-2)).touch_tip() #28: <Slot C2><Well C6>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(86))

p200.dispense(108, plate1[19].top(-2)).touch_tip() #29: <Slot C2><Well D3>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(86))

p200.dispense(108, plate1[91].top(-2)).touch_tip() #30: <Slot C2><Well D12>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(86))

p200.dispense(108, plate1[44].top(-2)).touch_tip() #31: <Slot C2><Well E6>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(86))

p200.dispense(108, plate1[21].top(-2)).touch_tip() #32: <Slot C2><Well F3>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(86))

p200.dispense(108, plate1[93].top(-2)).touch_tip() #33: <Slot C2><Well F12>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(85))

p200.dispense(108, plate1[46].top(-2)).touch_tip() #34: <Slot C2><Well G6>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(85))

p200.dispense(108, plate1[23].top(-2)).touch_tip() #35: <Slot C2><Well H3>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(85))

p200.dispense(108, plate1[95].top(-2)).touch_tip() #36: <Slot C2><Well H12>

p200.aspirate(124, trough['A3'].bottom(85))

p200.dispense(124, plate1[81].top(-2)).touch_tip() #37: <Slot C2><Well B11>

p200.aspirate(124, trough['A3'].bottom(85))
p200.dispense(124, plate1[83].top(-2)).touch_tip() #38: <Slot C2><Well D11>

p200.aspirate(124, trough['A3'].bottom(84))
p200.dispense(124, plate1[85].top(-2)).touch_tip() #39: <Slot C2><Well F11>

p200.aspirate(124, trough['A3'].bottom(84))
p200.dispense(124, plate1[87].top(-2)).touch_tip() #40: <Slot C2><Well H11>

p200.aspirate(125, trough['A3'].bottom(84))
p200.dispense(125, plate1[9].top(-2)).touch_tip() #41: <Slot C2><Well B2>

p200.aspirate(125, trough['A3'].bottom(84))
p200.dispense(125, plate1[11].top(-2)).touch_tip() #42: <Slot C2><Well D2>

p200.aspirate(125, trough['A3'].bottom(83))
p200.dispense(125, plate1[13].top(-2)).touch_tip() #43: <Slot C2><Well F2>

p200.aspirate(125, trough['A3'].bottom(83))
p200.dispense(125, plate1[15].top(-2)).touch_tip() #44: <Slot C2><Well H2>

p200.aspirate(137, trough['A3'].bottom(83))
p200.dispense(137, plate1[73].top(-2)).touch_tip() #45: <Slot C2><Well B10>

p200.aspirate(137, trough['A3'].bottom(83))
p200.dispense(137, plate1[75].top(-2)).touch_tip() #46: <Slot C2><Well D10>

p200.aspirate(137, trough['A3'].bottom(82))
p200.dispense(137, plate1[77].top(-2)).touch_tip() #47: <Slot C2><Well F10>

p200.aspirate(137, trough['A3'].bottom(82))
p200.dispense(137, plate1[79].top(-2)).touch_tip() #48: <Slot C2><Well H10>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(82))
p200.dispense(144, plate1[32].top(-2)).touch_tip() #49: <Slot C2><Well A5>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(82))
p200.dispense(144, plate1[1].top(-2)).touch_tip() #50: <Slot C2><Well B1>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(81))
p200.dispense(144, plate1[34].top(-2)).touch_tip() #51: <Slot C2><Well C5>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(81))
p200.dispense(144, plate1[3].top(-2)).touch_tip() #52: <Slot C2><Well D1>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(81))
p200.dispense(144, plate1[36].top(-2)).touch_tip() #53: <Slot C2><Well E5>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(81))
p200.dispense(144, plate1[5].top(-2)).touch_tip() #54: <Slot C2><Well F1>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(80))
p200.dispense(144, plate1[38].top(-2)).touch_tip() #55: <Slot C2><Well G5>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(80))
p200.dispense(144, plate1[7].top(-2)).touch_tip() #56: <Slot C2><Well H1>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(80))
p200.dispense(147, plate1[88].top(-2)).touch_tip() #57: <Slot C2><Well A12>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(80))
p200.dispense(147, plate1[65].top(-2)).touch_tip() #58: <Slot C2><Well B9>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(79))
p200.dispense(147, plate1[90].top(-2)).touch_tip() #59: <Slot C2><Well C12>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(79))
p200.dispense(147, plate1[67].top(-2)).touch_tip() #60: <Slot C2><Well D9>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(79))
p200.dispense(147, plate1[92].top(-2)).touch_tip() #61: <Slot C2><Well E12>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(78))
p200.dispense(147, plate1[69].top(-2)).touch_tip() #62: <Slot C2><Well F9>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(78))
p200.dispense(147, plate1[94].top(-2)).touch_tip() #63: <Slot C2><Well G12>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(78))
p200.dispense(147, plate1[71].top(-2)).touch_tip() #64: <Slot C2><Well H9>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(78))
p200.dispense(154, plate1[80].top(-2)).touch_tip() #65: <Slot C2><Well A11>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(77))
p200.dispense(154, plate1[57].top(-2)).touch_tip() #66: <Slot C2><Well B8>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(77))
p200.dispense(154, plate1[82].top(-2)).touch_tip() #67: <Slot C2><Well C11>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(77))
p200.dispense(154, plate1[59].top(-2)).touch_tip() #68: <Slot C2><Well D8>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(77))
p200.dispense(154, plate1[84].top(-2)).touch_tip() #69: <Slot C2><Well E11>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(76))
p200.dispense(154, plate1[61].top(-2)).touch_tip() #70: <Slot C2><Well F8>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(76))
p200.dispense(154, plate1[86].top(-2)).touch_tip() #71: <Slot C2><Well G11>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(76))
p200.dispense(154, plate1[63].top(-2)).touch_tip() #72: <Slot C2><Well H8>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(75))
p200.dispense(160, plate1[72].top(-2)).touch_tip() #73: <Slot C2><Well A10>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(75))

p200.dispense(160, plate1[49].top(-2)).touch_tip() #74: <Slot C2><Well B7>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(75))

p200.dispense(160, plate1[74].top(-2)).touch_tip() #75: <Slot C2><Well C10>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(75))

p200.dispense(160, plate1[51].top(-2)).touch_tip() #76: <Slot C2><Well D7>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(74))

p200.dispense(160, plate1[76].top(-2)).touch_tip() #77: <Slot C2><Well E10>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(74))

p200.dispense(160, plate1[53].top(-2)).touch_tip() #78: <Slot C2><Well F7>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(74))

p200.dispense(160, plate1[78].top(-2)).touch_tip() #79: <Slot C2><Well G10>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(73))

p200.dispense(160, plate1[55].top(-2)).touch_tip() #80: <Slot C2><Well H7>

p200.aspirate(162, trough['A3'].bottom(73))

p200.dispense(162, plate1[24].top(-2)).touch_tip() #81: <Slot C2><Well A4>

p200.aspirate(162, trough['A3'].bottom(73))

p200.dispense(162, plate1[26].top(-2)).touch_tip() #82: <Slot C2><Well C4>

p200.aspirate(162, trough['A3'].bottom(73))

p200.dispense(162, plate1[28].top(-2)).touch_tip() #83: <Slot C2><Well E4>

p200.aspirate(162, trough['A3'].bottom(72))

p200.dispense(162, plate1[30].top(-2)).touch_tip() #84: <Slot C2><Well G4>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(72))

p200.dispense(180, plate1[0].top(-2)).touch_tip() #85: <Slot C2><Well A1>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(72))

p200.dispense(180, plate1[8].top(-2)).touch_tip() #86: <Slot C2><Well A2>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(71))

p200.dispense(180, plate1[16].top(-2)).touch_tip() #87: <Slot C2><Well A3>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(71))

p200.dispense(180, plate1[2].top(-2)).touch_tip() #88: <Slot C2><Well C1>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(71))

p200.dispense(180, plate1[10].top(-2)).touch_tip() #89: <Slot C2><Well C2>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(70))

p200.dispense(180, plate1[18].top(-2)).touch_tip() #90: <Slot C2><Well C3>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(70))

p200.dispense(180, plate1[4].top(-2)).touch_tip() #91: <Slot C2><Well E1>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(70))

p200.dispense(180, plate1[12].top(-2)).touch_tip() #92: <Slot C2><Well E2>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(69))
p200.dispense(180, plate1[20].top(-2)).touch_tip() #93: <Slot C2><Well E3>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(69))
p200.dispense(180, plate1[6].top(-2)).touch_tip() #94: <Slot C2><Well G1>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(69))
p200.dispense(180, plate1[14].top(-2)).touch_tip() #95: <Slot C2><Well G2>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(69))
p200.dispense(180, plate1[22].top(-2)).touch_tip() #96: <Slot C2><Well G3>

p200.aspirate(158, trough['A3'].bottom(68))
p200.dispense(25, plate2[41].top(-2)).touch_tip() #97: <Slot D2><Well B6>
p200.dispense(25, plate2[43].top(-2)).touch_tip() #98: <Slot D2><Well D6>
p200.dispense(25, plate2[45].top(-2)).touch_tip() #99: <Slot D2><Well F6>
p200.dispense(25, plate2[47].top(-2)).touch_tip() #100: <Slot D2><Well H6>
p200.dispense(29, plate2[64].top(-2)).touch_tip() #101: <Slot D2><Well A9>
p200.dispense(29, plate2[66].top(-2)).touch_tip() #102: <Slot D2><Well C9>

p200.aspirate(174, trough['A3'].bottom(68))
p200.dispense(29, plate2[68].top(-2)).touch_tip() #103: <Slot D2><Well E9>
p200.dispense(29, plate2[70].top(-2)).touch_tip() #104: <Slot D2><Well G9>
p200.dispense(58, plate2[56].top(-2)).touch_tip() #105: <Slot D2><Well A8>
p200.dispense(58, plate2[33].top(-2)).touch_tip() #106: <Slot D2><Well B5>

p200.aspirate(174, trough['A3'].bottom(68))
p200.dispense(58, plate2[58].top(-2)).touch_tip() #107: <Slot D2><Well C8>
p200.dispense(58, plate2[35].top(-2)).touch_tip() #108: <Slot D2><Well D5>
p200.dispense(58, plate2[60].top(-2)).touch_tip() #109: <Slot D2><Well E8>

p200.aspirate(174, trough['A3'].bottom(67))
p200.dispense(58, plate2[37].top(-2)).touch_tip() #110: <Slot D2><Well F5>
p200.dispense(58, plate2[62].top(-2)).touch_tip() #111: <Slot D2><Well G8>
p200.dispense(58, plate2[39].top(-2)).touch_tip() #112: <Slot D2><Well H5>

p200.aspirate(172, trough['A3'].bottom(67))
p200.dispense(86, plate2[48].top(-2)).touch_tip() #113: <Slot D2><Well A7>
p200.dispense(86, plate2[25].top(-2)).touch_tip() #114: <Slot D2><Well B4>

p200.aspirate(172, trough['A3'].bottom(67))
p200.dispense(86, plate2[50].top(-2)).touch_tip() #115: <Slot D2><Well C7>
p200.dispense(86, plate2[27].top(-2)).touch_tip() #116: <Slot D2><Well D4>

p200.aspirate(172, trough['A3'].bottom(66))
p200.dispense(86, plate2[52].top(-2)).touch_tip() #117: <Slot D2><Well E7>
p200.dispense(86, plate2[29].top(-2)).touch_tip() #118: <Slot D2><Well F4>

p200.aspirate(172, trough['A3'].bottom(66))
p200.dispense(86, plate2[54].top(-2)).touch_tip() #119: <Slot D2><Well G7>
p200.dispense(86, plate2[31].top(-2)).touch_tip() #120: <Slot D2><Well H4>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(66))
p200.dispense(108, plate2[40].top(-2)).touch_tip() #121: <Slot D2><Well A6>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(66))
p200.dispense(108, plate2[17].top(-2)).touch_tip() #122: <Slot D2><Well B3>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(65))
p200.dispense(108, plate2[89].top(-2)).touch_tip() #123: <Slot D2><Well B12>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(65))
p200.dispense(108, plate2[42].top(-2)).touch_tip() #124: <Slot D2><Well C6>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(65))
p200.dispense(108, plate2[19].top(-2)).touch_tip() #125: <Slot D2><Well D3>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(65))
p200.dispense(108, plate2[91].top(-2)).touch_tip() #126: <Slot D2><Well D12>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(65))
p200.dispense(108, plate2[44].top(-2)).touch_tip() #127: <Slot D2><Well E6>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(64))
p200.dispense(108, plate2[21].top(-2)).touch_tip() #128: <Slot D2><Well F3>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(64))
p200.dispense(108, plate2[93].top(-2)).touch_tip() #129: <Slot D2><Well F12>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(64))
p200.dispense(108, plate2[46].top(-2)).touch_tip() #130: <Slot D2><Well G6>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(64))
p200.dispense(108, plate2[23].top(-2)).touch_tip() #131: <Slot D2><Well H3>

p200.aspirate(108, trough['A3'].bottom(64))
p200.dispense(108, plate2[95].top(-2)).touch_tip() #132: <Slot D2><Well H12>

p200.aspirate(124, trough['A3'].bottom(63))
p200.dispense(124, plate2[81].top(-2)).touch_tip() #133: <Slot D2><Well B11>

p200.aspirate(124, trough['A3'].bottom(63))
p200.dispense(124, plate2[83].top(-2)).touch_tip() #134: <Slot D2><Well D11>

p200.aspirate(124, trough['A3'].bottom(63))
p200.dispense(124, plate2[85].top(-2)).touch_tip() #135: <Slot D2><Well F11>

p200.aspirate(124, trough['A3'].bottom(63))
p200.dispense(124, plate2[87].top(-2)).touch_tip() #136: <Slot D2><Well H11>

p200.aspirate(125, trough['A3'].bottom(63))
p200.dispense(125, plate2[9].top(-2)).touch_tip() #137: <Slot D2><Well B2>

p200.aspirate(125, trough['A3'].bottom(62))
p200.dispense(125, plate2[11].top(-2)).touch_tip() #138: <Slot D2><Well D2>

p200.aspirate(125, trough['A3'].bottom(62))
p200.dispense(125, plate2[13].top(-2)).touch_tip() #139: <Slot D2><Well F2>

p200.aspirate(125, trough['A3'].bottom(62))
p200.dispense(125, plate2[15].top(-2)).touch_tip() #140: <Slot D2><Well H2>

p200.aspirate(137, trough['A3'].bottom(62))
p200.dispense(137, plate2[73].top(-2)).touch_tip() #141: <Slot D2><Well B10>

p200.aspirate(137, trough['A3'].bottom(61))
p200.dispense(137, plate2[75].top(-2)).touch_tip() #142: <Slot D2><Well D10>

p200.aspirate(137, trough['A3'].bottom(61))
p200.dispense(137, plate2[77].top(-2)).touch_tip() #143: <Slot D2><Well F10>

p200.aspirate(137, trough['A3'].bottom(61))
p200.dispense(137, plate2[79].top(-2)).touch_tip() #144: <Slot D2><Well H10>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(61))
p200.dispense(144, plate2[32].top(-2)).touch_tip() #145: <Slot D2><Well A5>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(60))
p200.dispense(144, plate2[1].top(-2)).touch_tip() #146: <Slot D2><Well B1>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(60))
p200.dispense(144, plate2[34].top(-2)).touch_tip() #147: <Slot D2><Well C5>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(60))
p200.dispense(144, plate2[3].top(-2)).touch_tip() #148: <Slot D2><Well D1>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(60))
p200.dispense(144, plate2[36].top(-2)).touch_tip() #149: <Slot D2><Well E5>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(59))
p200.dispense(144, plate2[5].top(-2)).touch_tip() #150: <Slot D2><Well F1>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(59))
p200.dispense(144, plate2[38].top(-2)).touch_tip() #151: <Slot D2><Well G5>

p200.aspirate(144, trough['A3'].bottom(59))
p200.dispense(144, plate2[7].top(-2)).touch_tip() #152: <Slot D2><Well H1>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(58))
p200.dispense(147, plate2[88].top(-2)).touch_tip() #153: <Slot D2><Well A12>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(58))
p200.dispense(147, plate2[65].top(-2)).touch_tip() #154: <Slot D2><Well B9>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(58))
p200.dispense(147, plate2[90].top(-2)).touch_tip() #155: <Slot D2><Well C12>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(58))
p200.dispense(147, plate2[67].top(-2)).touch_tip() #156: <Slot D2><Well D9>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(57))
p200.dispense(147, plate2[92].top(-2)).touch_tip() #157: <Slot D2><Well E12>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(57))

p200.dispense(147, plate2[69].top(-2)).touch_tip() #158: <Slot D2><Well F9>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(57))
p200.dispense(147, plate2[94].top(-2)).touch_tip() #159: <Slot D2><Well G12>

p200.aspirate(147, trough['A3'].bottom(57))
p200.dispense(147, plate2[71].top(-2)).touch_tip() #160: <Slot D2><Well H9>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(56))
p200.dispense(154, plate2[80].top(-2)).touch_tip() #161: <Slot D2><Well A11>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(56))
p200.dispense(154, plate2[57].top(-2)).touch_tip() #162: <Slot D2><Well B8>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(56))
p200.dispense(154, plate2[82].top(-2)).touch_tip() #163: <Slot D2><Well C11>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(56))
p200.dispense(154, plate2[59].top(-2)).touch_tip() #164: <Slot D2><Well D8>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(55))
p200.dispense(154, plate2[84].top(-2)).touch_tip() #165: <Slot D2><Well E11>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(55))
p200.dispense(154, plate2[61].top(-2)).touch_tip() #166: <Slot D2><Well F8>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(55))
p200.dispense(154, plate2[86].top(-2)).touch_tip() #167: <Slot D2><Well G11>

p200.aspirate(154, trough['A3'].bottom(54))
p200.dispense(154, plate2[63].top(-2)).touch_tip() #168: <Slot D2><Well H8>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(54))
p200.dispense(160, plate2[72].top(-2)).touch_tip() #169: <Slot D2><Well A10>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(54))
p200.dispense(160, plate2[49].top(-2)).touch_tip() #170: <Slot D2><Well B7>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(54))
p200.dispense(160, plate2[74].top(-2)).touch_tip() #171: <Slot D2><Well C10>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(53))
p200.dispense(160, plate2[51].top(-2)).touch_tip() #172: <Slot D2><Well D7>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(53))
p200.dispense(160, plate2[76].top(-2)).touch_tip() #173: <Slot D2><Well E10>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(53))
p200.dispense(160, plate2[53].top(-2)).touch_tip() #174: <Slot D2><Well F7>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(52))
p200.dispense(160, plate2[78].top(-2)).touch_tip() #175: <Slot D2><Well G10>

p200.aspirate(160, trough['A3'].bottom(52))
p200.dispense(160, plate2[55].top(-2)).touch_tip() #176: <Slot D2><Well H7>

p200.aspirate(162, trough['A3'].bottom(52))
p200.dispense(162, plate2[24].top(-2)).touch_tip() #177: <Slot D2><Well A4>

p200.aspirate(162, trough['A3'].bottom(51))
p200.dispense(162, plate2[26].top(-2)).touch_tip() #178: <Slot D2><Well C4>

p200.aspirate(162, trough['A3'].bottom(51))
p200.dispense(162, plate2[28].top(-2)).touch_tip() #179: <Slot D2><Well E4>

p200.aspirate(162, trough['A3'].bottom(51))
p200.dispense(162, plate2[30].top(-2)).touch_tip() #180: <Slot D2><Well G4>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(51))
p200.dispense(180, plate2[0].top(-2)).touch_tip() #181: <Slot D2><Well A1>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(50))
p200.dispense(180, plate2[8].top(-2)).touch_tip() #182: <Slot D2><Well A2>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(50))
p200.dispense(180, plate2[16].top(-2)).touch_tip() #183: <Slot D2><Well A3>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(50))
p200.dispense(180, plate2[2].top(-2)).touch_tip() #184: <Slot D2><Well C1>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(49))
p200.dispense(180, plate2[10].top(-2)).touch_tip() #185: <Slot D2><Well C2>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(49))
p200.dispense(180, plate2[18].top(-2)).touch_tip() #186: <Slot D2><Well C3>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(49))
p200.dispense(180, plate2[4].top(-2)).touch_tip() #187: <Slot D2><Well E1>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(48))
p200.dispense(180, plate2[12].top(-2)).touch_tip() #188: <Slot D2><Well E2>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(48))
p200.dispense(180, plate2[20].top(-2)).touch_tip() #189: <Slot D2><Well E3>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(48))
p200.dispense(180, plate2[6].top(-2)).touch_tip() #190: <Slot D2><Well G1>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(47))
p200.dispense(180, plate2[14].top(-2)).touch_tip() #191: <Slot D2><Well G2>

p200.aspirate(180, trough['A3'].bottom(47))
p200.dispense(180, plate2[22].top(-2)).touch_tip() #192: <Slot D2><Well G3>

p200.drop_tip()
p200.pick_up_tip(p200rack['1'])

***** Dispense WS_100

p200.aspirate(158, trough['C1'].bottom(89))

p200.dispense(20, plate1[49].top(-2)).touch_tip() #193: <Slot C2><Well B7>
p200.dispense(20, plate1[51].top(-2)).touch_tip() #194: <Slot C2><Well D7>
p200.dispense(20, plate1[53].top(-2)).touch_tip() #195: <Slot C2><Well F7>
p200.dispense(20, plate1[55].top(-2)).touch_tip() #196: <Slot C2><Well H7>
p200.dispense(26, plate1[57].top(-2)).touch_tip() #197: <Slot C2><Well B8>
p200.dispense(26, plate1[59].top(-2)).touch_tip() #198: <Slot C2><Well D8>
p200.dispense(26, plate1[61].top(-2)).touch_tip() #199: <Slot C2><Well F8>

p200.aspirate(158, trough['C1'].bottom(88))
p200.dispense(26, plate1[63].top(-2)).touch_tip() #200: <Slot C2><Well H8>
p200.dispense(33, plate1[65].top(-2)).touch_tip() #201: <Slot C2><Well B9>
p200.dispense(33, plate1[67].top(-2)).touch_tip() #202: <Slot C2><Well D9>
p200.dispense(33, plate1[69].top(-2)).touch_tip() #203: <Slot C2><Well F9>
p200.dispense(33, plate1[71].top(-2)).touch_tip() #204: <Slot C2><Well H9>

p200.aspirate(172, trough['C1'].bottom(87))
p200.dispense(43, plate1[73].top(-2)).touch_tip() #205: <Slot C2><Well B10>
p200.dispense(43, plate1[75].top(-2)).touch_tip() #206: <Slot C2><Well D10>
p200.dispense(43, plate1[77].top(-2)).touch_tip() #207: <Slot C2><Well F10>
p200.dispense(43, plate1[79].top(-2)).touch_tip() #208: <Slot C2><Well H10>

p200.aspirate(168, trough['C1'].bottom(86))
p200.dispense(56, plate1[81].top(-2)).touch_tip() #209: <Slot C2><Well B11>
p200.dispense(56, plate1[83].top(-2)).touch_tip() #210: <Slot C2><Well D11>
p200.dispense(56, plate1[85].top(-2)).touch_tip() #211: <Slot C2><Well F11>

p200.aspirate(128, trough['C1'].bottom(85))
p200.dispense(56, plate1[87].top(-2)).touch_tip() #212: <Slot C2><Well H11>
p200.dispense(72, plate1[89].top(-2)).touch_tip() #213: <Slot C2><Well B12>

p200.aspirate(144, trough['C1'].bottom(84))
p200.dispense(72, plate1[91].top(-2)).touch_tip() #214: <Slot C2><Well D12>
p200.dispense(72, plate1[93].top(-2)).touch_tip() #215: <Slot C2><Well F12>

p200.aspirate(178, trough['C1'].bottom(83))
p200.dispense(72, plate1[95].top(-2)).touch_tip() #216: <Slot C2><Well H12>
p200.dispense(20, plate2[49].top(-2)).touch_tip() #217: <Slot D2><Well B7>
p200.dispense(20, plate2[51].top(-2)).touch_tip() #218: <Slot D2><Well D7>
p200.dispense(20, plate2[53].top(-2)).touch_tip() #219: <Slot D2><Well F7>
p200.dispense(20, plate2[55].top(-2)).touch_tip() #220: <Slot D2><Well H7>
p200.dispense(26, plate2[57].top(-2)).touch_tip() #221: <Slot D2><Well B8>

p200.aspirate(177, trough['C1'].bottom(82))
p200.dispense(26, plate2[59].top(-2)).touch_tip() #222: <Slot D2><Well D8>
p200.dispense(26, plate2[61].top(-2)).touch_tip() #223: <Slot D2><Well F8>
p200.dispense(26, plate2[63].top(-2)).touch_tip() #224: <Slot D2><Well H8>
p200.dispense(33, plate2[65].top(-2)).touch_tip() #225: <Slot D2><Well B9>
p200.dispense(33, plate2[67].top(-2)).touch_tip() #226: <Slot D2><Well D9>
p200.dispense(33, plate2[69].top(-2)).touch_tip() #227: <Slot D2><Well F9>

p200.aspirate(162, trough['C1'].bottom(81))
p200.dispense(33, plate2[71].top(-2)).touch_tip() #228: <Slot D2><Well H9>
p200.dispense(43, plate2[73].top(-2)).touch_tip() #229: <Slot D2><Well B10>
p200.dispense(43, plate2[75].top(-2)).touch_tip() #230: <Slot D2><Well D10>
p200.dispense(43, plate2[77].top(-2)).touch_tip() #231: <Slot D2><Well F10>

p200.aspirate(155, trough['C1'].bottom(80))
p200.dispense(43, plate2[79].top(-2)).touch_tip() #232: <Slot D2><Well H10>
p200.dispense(56, plate2[81].top(-2)).touch_tip() #233: <Slot D2><Well B11>
p200.dispense(56, plate2[83].top(-2)).touch_tip() #234: <Slot D2><Well D11>

p200.aspirate(112, trough['C1'].bottom(79))
p200.dispense(56, plate2[85].top(-2)).touch_tip() #235: <Slot D2><Well F11>
p200.dispense(56, plate2[87].top(-2)).touch_tip() #236: <Slot D2><Well H11>

p200.aspirate(144, trough['C1'].bottom(78))
p200.dispense(72, plate2[89].top(-2)).touch_tip() #237: <Slot D2><Well B12>
p200.dispense(72, plate2[91].top(-2)).touch_tip() #238: <Slot D2><Well D12>

p200.aspirate(144, trough['C1'].bottom(78))
p200.dispense(72, plate2[93].top(-2)).touch_tip() #239: <Slot D2><Well F12>
p200.dispense(72, plate2[95].top(-2)).touch_tip() #240: <Slot D2><Well H12>

p200.drop_tip()
p200.pick_up_tip(p200rack['2'])

***** Dispense WS_1000

p200.aspirate(158, trough['B1'].bottom(89))
p200.dispense(20, plate1[72].top(-2)).touch_tip() #241 <Slot C2><Well A10>
p200.dispense(20, plate1[74].top(-2)).touch_tip() #242: <Slot C2><Well C10>
p200.dispense(20, plate1[76].top(-2)).touch_tip() #243: <Slot C2><Well E10>
p200.dispense(20, plate1[78].top(-2)).touch_tip() #244: <Slot C2><Well G10>
p200.dispense(26, plate1[80].top(-2)).touch_tip() #245: <Slot C2><Well A11>
p200.dispense(26, plate1[82].top(-2)).touch_tip() #246: <Slot C2><Well C11>
p200.dispense(26, plate1[84].top(-2)).touch_tip() #247: <Slot C2><Well E11>

p200.aspirate(158, trough['B1'].bottom(88))
p200.dispense(26, plate1[86].top(-2)).touch_tip() #248: <Slot C2><Well G11>
p200.dispense(33, plate1[88].top(-2)).touch_tip() #249: <Slot C2><Well A12>
p200.dispense(33, plate1[90].top(-2)).touch_tip() #250: <Slot C2><Well C12>
p200.dispense(33, plate1[92].top(-2)).touch_tip() #251: <Slot C2><Well E12>
p200.dispense(33, plate1[94].top(-2)).touch_tip() #252: <Slot C2><Well G12>

p200.aspirate(144, trough['B1'].bottom(87))
p200.dispense(36, plate1[1].top(-2)).touch_tip() #253: <Slot C2><Well B1>
p200.dispense(36, plate1[3].top(-2)).touch_tip() #254: <Slot C2><Well D1>
p200.dispense(36, plate1[5].top(-2)).touch_tip() #255: <Slot C2><Well F1>
p200.dispense(36, plate1[7].top(-2)).touch_tip() #256: <Slot C2><Well H1>

p200.aspirate(165, trough['B1'].bottom(86))
p200.dispense(55, plate1[9].top(-2)).touch_tip() #257: <Slot C2><Well B2>
p200.dispense(55, plate1[11].top(-2)).touch_tip() #258: <Slot C2><Well D2>
p200.dispense(55, plate1[13].top(-2)).touch_tip() #259: <Slot C2><Well F2>

p200.aspirate(127, trough['B1'].bottom(85))
p200.dispense(55, plate1[15].top(-2)).touch_tip() #260: <Slot C2><Well H2>
p200.dispense(72, plate1[17].top(-2)).touch_tip() #261: <Slot C2><Well B3>

p200.aspirate(144, trough['B1'].bottom(84))
p200.dispense(72, plate1[19].top(-2)).touch_tip() #262: <Slot C2><Well D3>
p200.dispense(72, plate1[21].top(-2)).touch_tip() #263: <Slot C2><Well F3>

p200.aspirate(166, trough['B1'].bottom(83))
p200.dispense(72, plate1[23].top(-2)).touch_tip() #264: <Slot C2><Well H3>
p200.dispense(94, plate1[25].top(-2)).touch_tip() #265: <Slot C2><Well B4>

p200.aspirate(94, trough['B1'].bottom(82))
p200.dispense(94, plate1[27].top(-2)).touch_tip() #266: <Slot C2><Well D4>

p200.aspirate(94, trough['B1'].bottom(82))
p200.dispense(94, plate1[29].top(-2)).touch_tip() #267: <Slot C2><Well F4>

p200.aspirate(94, trough['B1'].bottom(81))
p200.dispense(94, plate1[31].top(-2)).touch_tip() #268: <Slot C2><Well H4>

p200.aspirate(122, trough['B1'].bottom(80))
p200.dispense(122, plate1[33].top(-2)).touch_tip() #269: <Slot C2><Well B5>

p200.aspirate(122, trough['B1'].bottom(80))
p200.dispense(122, plate1[35].top(-2)).touch_tip() #270: <Slot C2><Well D5>

p200.aspirate(122, trough['B1'].bottom(79))
p200.dispense(122, plate1[37].top(-2)).touch_tip() #271: <Slot C2><Well F5>

p200.aspirate(122, trough['B1'].bottom(78))
p200.dispense(122, plate1[39].top(-2)).touch_tip() #272: <Slot C2><Well H5>

p200.aspirate(155, trough['B1'].bottom(77))
p200.dispense(155, plate1[41].top(-2)).touch_tip() #273: <Slot C2><Well B6>

p200.aspirate(155, trough['B1'].bottom(76))
p200.dispense(155, plate1[43].top(-2)).touch_tip() #274: <Slot C2><Well D6>

p200.aspirate(155, trough['B1'].bottom(75))
p200.dispense(155, plate1[45].top(-2)).touch_tip() #275: <Slot C2><Well F6>

p200.aspirate(175, trough['B1'].bottom(75))
p200.dispense(155, plate1[47].top(-2)).touch_tip() #276: <Slot C2><Well H6>
p200.dispense(20, plate2[72].top(-2)).touch_tip() #277: <Slot D2><Well A10>

p200.aspirate(164, trough['B1'].bottom(74))
p200.dispense(20, plate2[74].top(-2)).touch_tip() #278: <Slot D2><Well C10>
p200.dispense(20, plate2[76].top(-2)).touch_tip() #279: <Slot D2><Well E10>
p200.dispense(20, plate2[78].top(-2)).touch_tip() #280: <Slot D2><Well G10>
p200.dispense(26, plate2[80].top(-2)).touch_tip() #281: <Slot D2><Well A11>
p200.dispense(26, plate2[82].top(-2)).touch_tip() #282: <Slot D2><Well C11>
p200.dispense(26, plate2[84].top(-2)).touch_tip() #283: <Slot D2><Well E11>
p200.dispense(26, plate2[86].top(-2)).touch_tip() #284: <Slot D2><Well G11>

p200.aspirate(168, trough['B1'].bottom(73))
p200.dispense(33, plate2[88].top(-2)).touch_tip() #285: <Slot D2><Well A12>
p200.dispense(33, plate2[90].top(-2)).touch_tip() #286: <Slot D2><Well C12>
p200.dispense(33, plate2[92].top(-2)).touch_tip() #287: <Slot D2><Well E12>

p200.dispense(33, plate2[94].top(-2)).touch_tip() #288: <Slot D2><Well G12>
p200.dispense(36, plate2[1].top(-2)).touch_tip() #289: <Slot D2><Well B1>

p200.aspirate(163, trough['B1'].bottom(72))
p200.dispense(36, plate2[3].top(-2)).touch_tip() #290: <Slot D2><Well D1>
p200.dispense(36, plate2[5].top(-2)).touch_tip() #291: <Slot D2><Well F1>
p200.dispense(36, plate2[7].top(-2)).touch_tip() #292: <Slot D2><Well H1>
p200.dispense(55, plate2[9].top(-2)).touch_tip() #293: <Slot D2><Well B2>

p200.aspirate(165, trough['B1'].bottom(71))
p200.dispense(55, plate2[11].top(-2)).touch_tip() #294: <Slot D2><Well D2>
p200.dispense(55, plate2[13].top(-2)).touch_tip() #295: <Slot D2><Well F2>
p200.dispense(55, plate2[15].top(-2)).touch_tip() #296: <Slot D2><Well H2>

p200.aspirate(144, trough['B1'].bottom(70))
p200.dispense(72, plate2[17].top(-2)).touch_tip() #297: <Slot D2><Well B3>
p200.dispense(72, plate2[19].top(-2)).touch_tip() #298: <Slot D2><Well D3>

p200.aspirate(144, trough['B1'].bottom(69))
p200.dispense(72, plate2[21].top(-2)).touch_tip() #299: <Slot D2><Well F3>
p200.dispense(72, plate2[23].top(-2)).touch_tip() #300: <Slot D2><Well H3>

p200.aspirate(94, trough['B1'].bottom(68))
p200.dispense(94, plate2[25].top(-2)).touch_tip() #301: <Slot D2><Well B4>

p200.aspirate(94, trough['B1'].bottom(68))
p200.dispense(94, plate2[27].top(-2)).touch_tip() #302: <Slot D2><Well D4>

p200.aspirate(94, trough['B1'].bottom(67))
p200.dispense(94, plate2[29].top(-2)).touch_tip() #303: <Slot D2><Well F4>

p200.aspirate(94, trough['B1'].bottom(66))
p200.dispense(94, plate2[31].top(-2)).touch_tip() #304: <Slot D2><Well H4>

p200.aspirate(122, trough['B1'].bottom(66))
p200.dispense(122, plate2[33].top(-2)).touch_tip() #305: <Slot D2><Well B5>

p200.aspirate(122, trough['B1'].bottom(65))
p200.dispense(122, plate2[35].top(-2)).touch_tip() #306: <Slot D2><Well D5>

p200.aspirate(122, trough['B1'].bottom(64))
p200.dispense(122, plate2[37].top(-2)).touch_tip() #307: <Slot D2><Well F5>

p200.aspirate(122, trough['B1'].bottom(63))
p200.dispense(122, plate2[39].top(-2)).touch_tip() #308: <Slot D2><Well H5>

p200.aspirate(155, trough['B1'].bottom(62))
p200.dispense(155, plate2[41].top(-2)).touch_tip() #309: <Slot D2><Well B6>

p200.aspirate(155, trough['B1'].bottom(62))
p200.dispense(155, plate2[43].top(-2)).touch_tip() #310: <Slot D2><Well D6>

p200.aspirate(155, trough['B1'].bottom(61))
p200.dispense(155, plate2[45].top(-2)).touch_tip() #311: <Slot D2><Well F6>

p200.aspirate(155, trough['B1'].bottom(61))
p200.dispense(155, plate2[47].top(-2)).touch_tip() #312: <Slot D2><Well H6>

p200.drop_tip()
p200.pick_up_tip(p200rack['3'])

***** Dispense WS_10000

p200.aspirate(180, trough['A1'].bottom(89))
p200.dispense(18, plate1[24].top(-2)).touch_tip() #313 <Slot C2><Well A4>
p200.dispense(18, plate1[26].top(-2)).touch_tip() #314: <Slot C2><Well C4>
p200.dispense(18, plate1[28].top(-2)).touch_tip() #315: <Slot C2><Well E4>
p200.dispense(18, plate1[30].top(-2)).touch_tip() #316: <Slot C2><Well G4>
p200.dispense(36, plate1[32].top(-2)).touch_tip() #317: <Slot C2><Well A5>
p200.dispense(36, plate1[34].top(-2)).touch_tip() #318: <Slot C2><Well C5>
p200.dispense(36, plate1[36].top(-2)).touch_tip() #319: <Slot C2><Well E5>

p200.aspirate(180, trough['A1'].bottom(87))
p200.dispense(36, plate1[38].top(-2)).touch_tip() #320: <Slot C2><Well G5>
p200.dispense(72, plate1[40].top(-2)).touch_tip() #321: <Slot C2><Well A6>
p200.dispense(72, plate1[42].top(-2)).touch_tip() #322: <Slot C2><Well C6>

p200.aspirate(144, trough['A1'].bottom(86))
p200.dispense(72, plate1[44].top(-2)).touch_tip() #323: <Slot C2><Well E6>
p200.dispense(72, plate1[46].top(-2)).touch_tip() #324: <Slot C2><Well G6>

p200.aspirate(94, trough['A1'].bottom(86))
p200.dispense(94, plate1[48].top(-2)).touch_tip() #325: <Slot C2><Well A7>

p200.aspirate(94, trough['A1'].bottom(85))
p200.dispense(94, plate1[50].top(-2)).touch_tip() #326: <Slot C2><Well C7>

p200.aspirate(94, trough['A1'].bottom(85))
p200.dispense(94, plate1[52].top(-2)).touch_tip() #327: <Slot C2><Well E7>

p200.aspirate(94, trough['A1'].bottom(84))
p200.dispense(94, plate1[54].top(-2)).touch_tip() #328: <Slot C2><Well G7>

p200.aspirate(122, trough['A1'].bottom(83))
p200.dispense(122, plate1[56].top(-2)).touch_tip() #329: <Slot C2><Well A8>

p200.aspirate(122, trough['A1'].bottom(83))
p200.dispense(122, plate1[58].top(-2)).touch_tip() #330: <Slot C2><Well C8>

p200.aspirate(122, trough['A1'].bottom(82))
p200.dispense(122, plate1[60].top(-2)).touch_tip() #331: <Slot C2><Well E8>

p200.aspirate(122, trough['A1'].bottom(81))
p200.dispense(122, plate1[62].top(-2)).touch_tip() #332: <Slot C2><Well G8>

p200.aspirate(151, trough['A1'].bottom(80))
p200.dispense(151, plate1[64].top(-2)).touch_tip() #333: <Slot C2><Well A9>

p200.aspirate(151, trough['A1'].bottom(79))

p200.dispense(151, plate1[66].top(-2)).touch_tip() #334: <Slot C2><Well C9>

p200.aspirate(151, trough['A1'].bottom(78))

p200.dispense(151, plate1[68].top(-2)).touch_tip() #335: <Slot C2><Well E9>

p200.aspirate(169, trough['A1'].bottom(78))

p200.dispense(151, plate1[70].top(-2)).touch_tip() #336: <Slot C2><Well G9>

p200.dispense(18, plate2[24].top(-2)).touch_tip() #337: <Slot D2><Well A4>

p200.aspirate(162, trough['A1'].bottom(77))

p200.dispense(18, plate2[26].top(-2)).touch_tip() #338: <Slot D2><Well C4>

p200.dispense(18, plate2[28].top(-2)).touch_tip() #339: <Slot D2><Well E4>

p200.dispense(18, plate2[30].top(-2)).touch_tip() #340: <Slot D2><Well G4>

p200.dispense(36, plate2[32].top(-2)).touch_tip() #341: <Slot D2><Well A5>

p200.dispense(36, plate2[34].top(-2)).touch_tip() #342: <Slot D2><Well C5>

p200.dispense(36, plate2[36].top(-2)).touch_tip() #343: <Slot D2><Well E5>

p200.aspirate(180, trough['A1'].bottom(76))

p200.dispense(36, plate2[38].top(-2)).touch_tip() #344: <Slot D2><Well G5>

p200.dispense(72, plate2[40].top(-2)).touch_tip() #345: <Slot D2><Well A6>

p200.dispense(72, plate2[42].top(-2)).touch_tip() #346: <Slot D2><Well C6>

p200.aspirate(144, trough['A1'].bottom(75))

p200.dispense(72, plate2[44].top(-2)).touch_tip() #347: <Slot D2><Well E6>

p200.dispense(72, plate2[46].top(-2)).touch_tip() #348: <Slot D2><Well G6>

p200.aspirate(94, trough['A1'].bottom(74))

p200.dispense(94, plate2[48].top(-2)).touch_tip() #349: <Slot D2><Well A7>

p200.aspirate(94, trough['A1'].bottom(73))

p200.dispense(94, plate2[50].top(-2)).touch_tip() #350: <Slot D2><Well C7>

p200.aspirate(94, trough['A1'].bottom(73))

p200.dispense(94, plate2[52].top(-2)).touch_tip() #351: <Slot D2><Well E7>

p200.aspirate(94, trough['A1'].bottom(72))

p200.dispense(94, plate2[54].top(-2)).touch_tip() #352: <Slot D2><Well G7>

p200.aspirate(122, trough['A1'].bottom(71))

p200.dispense(122, plate2[56].top(-2)).touch_tip() #353: <Slot D2><Well A8>

p200.aspirate(122, trough['A1'].bottom(71))

p200.dispense(122, plate2[58].top(-2)).touch_tip() #354: <Slot D2><Well C8>

p200.aspirate(122, trough['A1'].bottom(70))

p200.dispense(122, plate2[60].top(-2)).touch_tip() #355: <Slot D2><Well E8>

p200.aspirate(122, trough['A1'].bottom(69))

p200.dispense(122, plate2[62].top(-2)).touch_tip() #356: <Slot D2><Well G8>

p200.aspirate(151, trough['A1'].bottom(68))

p200.dispense(151, plate2[64].top(-2)).touch_tip() #357: <Slot D2><Well A9>

p200.aspirate(151, trough['A1'].bottom(67))

p200.dispense(151, plate2[66].top(-2)).touch_tip() #358: <Slot D2><Well C9>

```
p200.aspirate(151, trough['A1'].bottom(66))  
p200.dispense(151, plate2[68].top(-2)).touch_tip() #359: <Slot D2><Well E9>
```

```
p200.aspirate(151, trough['A1'].bottom(66))  
p200.dispense(151, plate2[70].top(-2)).touch_tip() #360: <Slot D2><Well G9>
```

```
p200.drop_tip()  
##
```


Secuenciación de Genoma (Métodos)

La secuenciación se realizó del genoma completo de las poblaciones bacterianas evolucionadas al final de las tres fases y de clones al final de la primera y segunda fase. Durante tres días, las muestras congeladas de experimentos evolutivos se revivieron durante en cultivo overnight y aumentamos gradualmente el volumen y la concentración de ampicilina hasta que las poblaciones alcanzaron una alta densidad óptica y 10 CMI de resistencia. Tomamos muestras de 2 de las 4 réplicas de cada experimento al final de las 3 fases; Se aisló ADN genómico de cada población utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue, QIAGEN.

Para seleccionar los clones, diluimos la población final 1: 5 al final de la FASE 1. Se sembraron 150 μ l de cada muestra en 3 cajas de Petri con agar LB con perlas y seleccionamos todos los clones individuales que aparecieron en el caja después de un día de incubación a 30°C; luego cultivamos 5 ml de cada clon en medio M9 líquido, de los cuales 180 μ l se incubaron en una microplaca de titulación de 96 pocillos en un lector de placas (BioTek EL808x), para obtener curvas de crecimiento y el resto de cultivo se incubó en una incubadora orbital, para tener cultivo suficiente para aislar el ADN, ambos a 30°C durante 24 h.

La tasa de crecimiento de cada muestra se analizó mediante el programa fitteriv [133], con un algoritmo de K-medias que genera grupos que son potencialmente diferentes entre sí. El algoritmo seleccionó al azar a un miembro de cada grupo para secuenciarlo. Se aisló ADN genómico de cada clon usando el kit DNeasy Blood & Tissue, QIAGEN.

Todas las muestras fueron genotipadas por Illumina WGS utilizando una plataforma NextSeq en una configuración de 2 x 75 pb de extremos emparejados. Se secuenciaron los clones de cada población con cobertura de 40x y poblaciones con cobertura de 100x para cada muestra. Las lecturas se recortaron utilizando Trimmomatic [134] con los siguientes parámetros: LEADING:3 TRAILING:3303SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:50. El análisis de llamadas de variantes de clones y poblaciones se realizó con breseq v0.35.7 [135], utilizando la configuración de parámetros predeterminada. La opción -p se utilizó al analizar muestras de población. Usamos como referencia el genoma de la cepa de *Escherichia coli* K12, MG1655 (Secuencia Refseq: NC_000913.3). Se compararon diferentes fases del experimento con gdttools de breseq. Para evitar falsos positivos, eliminamos mutaciones que nunca alcanzaron una frecuencia de 0.10 y mutaciones también presentes en

el genoma del ancestro pero no en el genoma de referencia.

Para asignar genes mutados a categorías funcionales definidas en la base de datos Cluster of Orthologous Groups [136], utilizamos RPS-BLAST+ y Conserved Domain Database, NCBI. Los datos resultantes se analizaron como en [137]. Para el análisis de genotipos, elegimos 2 réplicas de las 4 de cada tratamiento, con un control al final del experimento y la cepa parental para cada tratamiento, resultando un total de 28 puntos de tiempo. Los datos de secuenciación se depositaron en el NCBI con el ID de proyecto [PRJNA771356](#).

Cuadro S1: Concentraciones de Ampicilina utilizadas en las curvas dosis-respuesta de los experimentos evolutivos.

ID	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	MIC relativa a la WT
M	0	0
D1	1	0.25
D2	2	0.5
D3	4	1
D4	5.2	1.3
D5	6.8	1.7
D6	8.4	2.1
D7	11.2	2.8
D8	14.4	3.6
D9	18.4	4.6
D10	20	5
D11	30.8	7.7
D12	40	10
D13	52	13
D14	68	17
D15	86	21.5
D16	111.2	27.8
D17	144	36
D18	184	46
D19	240	80
D20	309.6	77.4
D21	400	100

Cuadro S2: Lista de genes mutados obtenidos de la secuenciación de todo el genoma de poblaciones bajo selección media (MS).

	Gen	Fase 1 (%)	Fase 2 (%)	Fase 3 (%)	Diversidad	Categoría
Selección Media (MS)	clpX → / → Ion	65.3	0	0	Indel	O/O
	dauA ← / ← prs	26.9	100	100	SNP Intergénico	P/F,E
	mgrB ← / →yobH	91.1	0	0	Indel	
	mgrB ← / →yobH	71.9	100	100	Indel	
	fadJ←	0	11	0	SNP No-Sin	I
	ygfB ←	0	13.6	0	SNP No-Sin	S
	panF →	0	0	12.4	SNP No-Sin	H
	rpsE →	0	10.2	0	SNP-Sin	J
	ftsI ←	100	100	100	SNP No-Sin	M
	dnaX →	10.1	0	0	SNP No-Sin	L
	phoQ →	100	100	100	SNP No-Sin	T
	marR →	0	0	21.9	Indel	K
	cpxA ←	0	0	81.7	Indel	T
	fliF →	0	0	10.3	SNP No-Sin	N,U
	greA ←	0	0	28.5	Indel	K
	aceK ←	0	0	18.8	SNP No-Sin	T
yjcF ← / ← actP	0	0	13.6	SNP Intergénico	S/R	

Cuadro S3: Lista de genes mutados obtenidos de la secuenciación de todo el genoma de poblaciones bajo selección fuerte (SS).

	Gen	Fase 1 (%)	Fase 2 (%)	Fase 3 (%)	Diversidad	Categoría
Selección Fuerte (SS)	yafD →	0	10.4	0	SNP No-Sin	S
	clpX → / → Ion	100	65.2	100	Indel	O/O
	acrR →	100	59.3	100	Indel	S
	crr →	0	0	77.5	Indel	G
	ttdr←	0	17.6	0	SNP No-Sin	K
	gpt-[ykcC]	0	0	100	Indel	
	proY →/→ malZ	0	13.9	8.4	SNP Intergénico	E/G
	ispB →/→ sfsB	0	0	100	Indel	H/K

Cuadro S4: Categorías Funcionales

E	Metabolismo y transporte de aminoácidos
G	Metabolismo y transporte de carbohidratos
H	Metabolismo de coenzimas
I	Metabolismo de lípidos
J	Traducción
K	Transcripción
L	Replicación y reparación
M	Pared celular / Membrana / Biosíntesis
N	Motilidad celular
O	Modificación postraduccional, recambio de proteínas, funciones de chaperona
P	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
S	Función desconocida

Cuadro S5: Lista completa de genes mutados provenientes de las clonas

	Réplica (ID)	Clon (ID)	Gen	Cluster	%	V_{max}	MIC
Mild selection	MS_R1_A17+M0	C2	dauA → / ← prs	2	100	6.86	3.4
		C50	kdsA → / ← ldrD_1	1	94	9.48	2.0
	MS_R1_A17+M7	C9		2	2	9.48	2.0
		MS_R4_A12+M0	C9	phoQ →	1	32.1	9.48
	C26		phoQ →	2	7.1	7.77	15.0
	C16		phoQ →, ftsI ←	3	3.6	13.0	7.2
	C8		phoQ →, ftsI ←	4	53.6	10.5	7.2
	C10		phoQ →, ftsI ←	6	3.6	17.0	7.2
	MS_R4_A12+M7	C5	phoQ →, ftsI ←	1	77.1	9.47	9.2
C13		phoQ →, ftsI ←	5	22.9	10.4	9.2	
Strong selection	SS_R1_A7+M0	C6	dauA → / ← prs	2	22.2	13.70	4.20
		C19		3	83.3	12.8	2.6
	SS_R1_A7+M7	C8		5	8.3	12.3	2.6
		C7		6	4.2	16.6	2.6
		SS_R3_A7+M0	C73		1	83.8	9.46
	C26			2	12.5	7.77	9.2
	C70			3	2.5	14	9.2
	C71			5	1.25	11.7	4.2
	SS_R3_A7+M7	C7	typA ← / → glnA	1	74.4	16.6	4.2
		C38		2	20.5	8.32	9.2
		C1	rhsC_1 →, kdsA → / ← ldrD_1	5	5.2	11.1	4.2

Índice de figuras

1.1.	Principales mecanismos de acción de los antibióticos. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de pared celular, la síntesis de proteínas y el metabolismo de ácido fólico, donde se bloquea la enzima DHF, inhibiendo la formación de THF.	18
1.2.	Mecanismos de resistencia a los antibióticos. Las enzimas que alteran o degradan los antibióticos, las bombas que expulsan el antibiótico de la célula, la modificación de blancos, así como los plásmidos y genes, son los principales mecanismos de resistencia bacteriana.	20
1.3.	Estructuras químicas de los antibióticos β -lactámicos [65].	21
2.1.	Curva dosis respuesta de la cepa silvestre MG1655 en ampicilina, donde establecimos su CMI en 2 μ g/ml. Cada línea representa una réplica, denotamos con puntos el crecimiento en densidad óptica (eje Y) en cada concentración (eje X).	24
2.2.	Ilustración esquemática del protocolo de evolución adaptativa utilizado para evaluar la tasa de adaptación en diferentes presiones selectivas. Selección media (a la izquierda) que consiste en realizar un experimento dosis-respuesta y transferir cada día la población que exhibió no más del 50% de inhibición con respecto a las cepas que no percibieron antibiótico (recuadro azul). La CMI, que corresponde a la concentración crítica de antibiótico, de manera que no se detecta crecimiento bacteriano (indicado con un asterisco). El experimento de dilución en serie se realizó hasta lograr un aumento diez veces mayor que la cepa silvestre. Para el régimen de selección fuerte (a la derecha), la población que sobrevivió a la concentración más alta de antibiótico (recuadro naranja) se transfirió a medio sin antibiótico y a las mismas concentraciones de antibiótico que para selección media hasta observar un aumento de diez veces en la resistencia con respecto al primer día.	25
2.3.	Niveles de resistencia (incremento en la CMI) en función del tiempo para ambos regímenes de selección. Se puede observar como el nivel de resistencia bajo el régimen de selección fuerte (línea naranja) alcanzó el mismo nivel de resistencia en menor tiempo que en el régimen de selección media (línea azul). Cada línea denota una réplica independiente, con el promedio representada con una línea gruesa.	26

2.4.	Mapa de color que muestra las mutaciones identificadas para cada régimen de selección, mediante la secuenciación de todo el genoma de las poblaciones de la FASE 1. MS en color azul a la izquierda y SS a la derecha en naranja. Las filas corresponden a los genes de resistencia, mientras que las columnas representan el régimen de selección. La intensidad del color representa la frecuencia con que cada mutación está presente en los genes. Observamos que para MS hay mayor expresión de mutaciones que para SS, compartiendo la mutación que afecta los genes <i>clpX/lon</i> , que codifican la expresión de proteínas involucradas en transporte y división celular.	28
2.5.	Tasa de adaptación de las diferentes réplicas en nuestro experimento. Las barras azules corresponden a las réplicas adaptadas bajo una selección media y las naranjas en el régimen de selección fuerte.	29
3.1.	Trayectorias evolutivas de las poblaciones sin presión selectiva. A) Ilustración esquemática de la FASE 2 de nuestro experimento, que consiste en hacer diluciones seriadas por ocho días sin antibiótico en poblaciones evolucionadas obtenidas de la FASE 1 (poblaciones con $\sim 10xMIC$ de la cepa ancestral). Las poblaciones evolucionadas bajo B) Selección media en azul y C) Selección fuerte en naranja provenientes de la FASE 1 muestran una reducción en la resistencia cuando el antibiótico es retirado del medio. Las barras en la parte superior, en azul (MS) o naranja (SS) indican la fase selectiva, mientras que la barra amarilla indica cuando el antibiótico se retira del medio, las líneas delgadas representan las réplicas y la gruesa el promedio de las poblaciones.	32
3.2.	Estabilidad de resistencia sin presión selectiva. A) Poblaciones bajo selección media con diferentes niveles de resistencia durante la Fase 1 (barras azul intenso) y después de 8 días de retirar el antibiótico del medio (barras azul claro). B) Poblaciones bajo selección fuerte con diferentes niveles de resistencia durante la Fase 1 (barras naranja intenso) y después de 8 días de retirar el antibiótico del medio (barras naranja claro). C) La reducción de resistencia está correlacionada negativamente con el nivel de resistencia alcanzado en la Fase 1. Cada punto corresponde a una población con diferentes niveles de resistencia antes y después de retirar la presión selectiva del medio. Las líneas denotan la regresión lineal de mejor ajuste para cada régimen ($R^2 = 0.844$ y $R^2 = 0.714$ para MS y SS, respectivamente).	33
3.3.	Mapa de color que muestra las mutaciones identificadas para cada régimen de selección, mediante la secuenciación de todo el genoma de las poblaciones de la FASE 2. MS en color azul a la izquierda y SS a la derecha en naranja. Las filas corresponden a los genes de resistencia, mientras que las columnas representan el régimen de selección. La intensidad del color representa la frecuencia con que cada mutación está presente en los genes. Observamos que para MS hay mayor expresión de mutaciones que para SS.	35

3.4.	Máxima tasa de crecimiento de todas las clonas de cada población. El color de cada punto representa el número de clúster al que pertenecen según el análisis, los puntos encerrados en un círculo negro representan las clonas que son potencialmente diferentes entre sí, según la max df alcanzada.	37
3.5.	Mapa de color que muestra las mutaciones identificadas para cada régimen de selección, mediante la secuenciación de clonas obtenidas de las poblaciones evolucionadas. Selección media en color azul a la izquierda y selección fuerte a la derecha en naranja. Las filas corresponden a los genes de resistencia, mientras que las columnas representan los clones. El tratamiento de cada clon está indicado con círculo blanco (cepa silvestre que nunca percibió antibiótico), círculo con cruz (clonas de las poblaciones de la FASE 1) y círculo negro (clonas de las poblaciones de la FASE 2).	38
4.1.	Niveles de resistencia alcanzados cuando el antibiótico fue introducido nuevamente en el medio (incremento en la CMI) en función del tiempo (en días) para ambos regímenes de selección, FASE 3. El régimen de selección fuerte (líneas naranjas) y media (líneas azules), cada línea denota una réplica independiente con el promedio representado con una línea gruesa.	41
4.2.	Trayectorias de adaptación de las poblaciones evolucionadas bajo ambos regímenes de selección durante las tres fases. Las barras en la parte superior, en azul (MS) o naranja (SS) indican la fase selectiva, mientras que la barra beige indica cuando el antibiótico se retira del medio, las líneas delgadas representan las réplicas y la gruesa el promedio de las poblaciones.	42
4.3.	Comparación entre las tasas de adaptación estimadas para FASE 1 y 3 para el régimen de selección media (izquierda, en azul) y selección fuerte (derecha, en naranja). La tasa de adaptación de resistencia fue mayor en las poblaciones bajo selección media (prueba t, valor $p < 0.05$) pero no para SS (prueba t, valor $p = 0.35$, H_0 : tasa media de adaptación entre ambas fases es igual).	43
4.4.	Incremento de la resistencia a través del tiempo; Las líneas continuas representan la primera evolución en presencia de antibiótico (FASE 1) y las líneas punteadas la resistencia adquirida de las poblaciones evolucionadas en antibiótico al final de la FASE 2. Se pueden observar las trayectorias de adaptación de la FASE 1 y 3 son similares para las poblaciones bajo selección fuerte (líneas naranjas), a diferencia de las poblaciones bajo selección media (líneas azules) donde la adaptación de resistencia es significativamente más rápida en la FASE 3 en comparación con la FASE 1.	44

4.5.	Frecuencia de mutaciones observadas durante las tres fases del experimento (MS en azul, SS en naranja). Se puede observar cómo las mutaciones que alcanzan el 100% de frecuencia durante FASE 1 bajo SS (es decir, <i>acrR</i> , <i>clpX/Ion</i>) son inestables en ausencia de antibiótico, reduciendo así su frecuencia durante FASE 2. Por el contrario, las mutaciones que aparecen al final de la FASE 1 bajo MS son estables en ausencia de antibiótico (en particular, <i>phoQ</i> , <i>ftsI</i> y <i>dauA/prs</i>), lo que da como resultado una tasa de adaptación acelerada cuando los antibióticos se introducen nuevamente en el medio.	45
5.1.	Curvas de crecimiento obtenidas para la FASE 1, 2 y 3, en color azul observamos la densidad óptica de las poblaciones bajo concentraciones medias y en naranja las poblaciones bajo concentración fuerte, en color tinto observamos el crecimiento de la cepa silvestre marcada con la proteína mCherry a través del tiempo. Las réplicas se observan con líneas punteadas y el promedio en la línea sólida.	49
5.2.	Comparación del <i>fitness</i> relativo estimado para la FASE 1, 2 y 3 para el régimen de selección media (en azul) y fuerte (en naranja). Por medio de un análisis de ANOVA de un factor encontramos que las poblaciones bajo selección fuerte durante la segunda fase son significativamente diferentes en comparación a las poblaciones de selección media en la segunda fase y con las poblaciones de la tercera fase bajo ambos regímenes de selección.	50
6.1.	Niveles de resistencia alcanzados cuando el antibiótico fue introducido nuevamente en el medio (incremento en la CMI) en función del tiempo (en días) para ambos regímenes de selección, FASE 3B. El régimen de selección fuerte (SS_3B, líneas naranjas) y media (MS_3B, líneas azules), cada línea denota una réplica independiente con el promedio representado con una línea gruesa.	54
6.2.	Comparación entre las tasas de adaptación estimadas para la FASE 1, 2 y 3B para el régimen de selección media (izquierda, en azul) y selección fuerte (derecha, en naranja). La tasa de adaptación de resistencia fue mayor en las poblaciones bajo selección media (prueba t, valor $p < 0.05$), tanto para la FASE 3 como 3B. Pero no para SS (prueba t, valor $p_{FASE\ 3} = 0.35$ y $p_{FASE\ 3B} = 0.177$, H_0 : tasa media de adaptación entre ambas fases es igual).	55

- 6.3. Incremento de la resistencia a través del tiempo; Las líneas continuas representan la primera evolución en presencia de antibiótico (FASE 1) y las líneas punteadas la resistencia adquirida de las poblaciones evolucionadas en antibiótico seleccionadas al final de la FASE 2 pero intercambiando los regímenes de selección (FASE 3B). Se pueden observar las trayectorias de adaptación para la FASE 1 (líneas solidas) y 3B (líneas punteadas) para el régimen de selección media (azul) y fuerte (naranja). Las trayectorias de adaptación para las poblaciones bajo selección media durante la FASE 3B son similares a las poblaciones bajo selección fuerte, donde la adquisición de resistencia es significativamente mayor comparada con las poblaciones bajo selección media de la FASE 1. 56

Bibliografía

- [1] R. Lenski and M. Wiser, “Evolution, theory and experiments with microorganisms,” 2009.
- [2] J. E. Barrick, D. S. Yu, S. H. Yoon, H. Jeong, T. K. Oh, D. Schneider, R. E. Lenski, and J. F. Kim, “Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*,” *Nature*, vol. 461, pp. 1243–1247, 10 2009.
- [3] J. Adams and F. Rosenzweig, “Experimental microbial evolution: history and conceptual underpinnings,” *Genomics*, vol. 104, no. 6, Part A, pp. 393 – 398, 2014. Experimental evolution and the use of genomics.
- [4] T. J. Kawecki, R. E. Lenski, D. Ebert, B. Hollis, I. Olivieri, and M. C. Whitlock, “Experimental evolution,” *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 27, no. 10, pp. 547 – 560, 2012.
- [5] S. F. Elena and R. E. Lenski, “Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 4, pp. 457–469, 2003.
- [6] W. H. Dallinger and T. H. Huxley, “I. on the life-history of a minute septic organisms with an account of experiments made to determine its thermal death point,” *Proceedings of the Royal Society of London*, vol. 27, no. 185-189, pp. 332–350, 1878.
- [7] A. Buckling, R. Craig Maclean, M. A. Brockhurst, and N. Colegrave, “The beagle in a bottle,” *Nature*, vol. 01, pp. 824–829, 02 2009.
- [8] R. E. Lenski, “What is adaptation by natural selection? perspectives of an experimental microbiologist,” *PLOS Genetics*, vol. 13, pp. 1–12, 04 2017.
- [9] H. B.S., “Experimental evolution of ribitol dehydrogenase.,” *Springer*, p. 23–54, 1984.
- [10] C. P.H., “Amidases of *Pseudomonas aeruginosa*.,” *Springer Nature*, p. 187–231,

1984.

- [11] H. B.G., “The evolved -galactosidase system of escherichia coli,” *Springer Nature*, pp. 165–185, 1984.
- [12] S. E. Luria and M. Delbrck, “Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance,” *Genetics*, vol. 28, no. 6, pp. 491–511, 1943.
- [13] F. M. Stewart, “Fluctuation tests: how reliable are the estimates of mutation rates?,” *Genetics*, vol. 137, no. 4, pp. 1139–1146, 1994.
- [14] R. E. Lenski, M. R. Rose, S. C. Simpson, and S. C. Tadler, “Long-term experimental evolution in escherichia coli. i. adaptation and divergence during 2,000 generations,” *The American Naturalist*, vol. 138, no. 6, pp. 1315–1341, 1991.
- [15] R. E. Lenski and M. Travisano, “Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 15, pp. 6808–6814, 1994.
- [16] Z. D. Blount, C. Z. Borland, and R. E. Lenski, “Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of escherichia coli,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 23, pp. 7899–7906, 2008.
- [17] D. Schneider, E. Duperchy, E. Coursange, R. E. Lenski, and M. Blot, “Long-term experimental evolution in escherichia coli. ix. characterization of insertion sequence-mediated mutations and rearrangements,” *Genetics*, vol. 156, pp. 477–488, 10 2000.
- [18] M. J. Wisser, N. Ribeck, and R. E. Lenski, “Long-term dynamics of adaptation in asexual populations,” *Science*, vol. 342, no. 6164, pp. 1364–1367, 2013.
- [19] R. Lenski, “Experimental evolution.” url <https://lenski.mmg.msu.edu/>, 2021.
- [20] C. B. Turner, C. W. Marshall, and V. S. Cooper, “Parallel genetic adaptation across environments differing in mode of growth or resource availability,” *Evolution Letters*, vol. 2, no. 4, pp. 355–367, 2018.
- [21] G. Saxer, M. Doebeli, and M. Travisano, “The repeatability of adaptive radiation during long-term experimental evolution of escherichia coli in a multiple nutrient environment,” *PLOS ONE*, vol. 5, pp. 1–11, 12 2010.
- [22] A. F. Bennet and R. E. Lenski, “Experimental Evolution and Its Role in Evolutionary Physiology1,” *American Zoologist*, vol. 39, pp. 346–362, 08 2015.
- [23] B. S. Hughes, A. J. Cullum, and A. F. Bennett, “Evolutionary adaptation to environmental ph in experimental lineages of escherichia coli,” *Evolution*, vol. 61, no. 7,

pp. 1725–1734, 2007.

- [24] N. Philippe, L. Pelosi, R. E. Lenski, and D. Schneider, “Evolution of penicillin-binding protein 2 concentration and cell shape during a long-term experiment with *escherichia coli*,” *Journal of Bacteriology*, vol. 191, no. 3, pp. 909–921, 2009.
- [25] C. E. L. R. S. D. Philippe, N., “Evolution of global regulatory networks during a long-term experiment with *escherichia coli*,” *Bioessays*, vol. 29 (9), Sep 2007.
- [26] M. . B. M. . T. J. . S. C. . H. R. . D. M. Le Gac, Mickaël Brazas, “Metabolic changes associated with adaptive diversification in *escherichia coli*,” *Genetics*, vol. 178, 02 2008.
- [27] A. . L. R. Leroi, A. Bennett, “Temperature acclimation and competitive fitness: an experimental test of the beneficial acclimation assumption,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, 03 1994.
- [28] A. F. Bradley S. Hughes Cullum, Alistair J. Bennett, “Evolutionary adaptation to environmental ph in experimental lineages of *escherichia coli*,” *Evolution*, vol. 61, Jul 2007.
- [29] R. Cooper, Tim Lenski, “Experimental evolution with *e. coli* in diverse resource environments. i. fluctuating environments promote divergence of replicate populations,” *BMC Evolutionary Biology*, vol. 10, 01 2010.
- [30] A. . P. B. Fong, Stephen Joyce, “Parallel adaptive evolution cultures of *escherichia coli* lead to convergent growth phenotypes with different gene expression states,” *Genome research*, vol. 15, 10 2005.
- [31] C. . E. M. . S. M. Jahn, Leonie J Munck, “Adaptive laboratory evolution of antibiotic resistance using different selection regimes lead to similar phenotypes and genotypes,” *Frontiers in microbiology*, vol. 8, p. 816, 2017.
- [32] J. E. Barrick and R. E. Lenski, “Genome dynamics during experimental evolution,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 14, 2013.
- [33] C. for Disease Control and Prevention, “Whole genome sequencing (wgs)” url <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/wgs.html>, 2016.
- [34] R. Hegreness, Matthew Kishony, “Analysis of genetic systems using experimental evolution and whole-genome sequencing,” *Genome Biology*, vol. 8, 02 2007.
- [35] F. Sanger and A. Coulson, “A rapid method for determining sequences in dna by primed synthesis with dna polymerase,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 94, no. 3, pp. 441–448, 1975.
- [36] F. Sanger, G. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, J. C. Fiddes, C. A.

Hutchison, P. M. Slocombe, and M. Smith, "Nucleotide sequence of bacteriophage x174 dna," *Nature*, vol. 265, no. 5596, pp. 687–695, 1977.

[37]

[38] R. Fleischmann, M. Adams, O. White, R. Clayton, E. Kirkness, A. Kerlavage, C. Bult, J. Tomb, B. Dougherty, J. Merrick, and e. al., "Whole-genome random sequencing and assembly of haemophilus influenzae rd," *Science*, vol. 269, no. 5223, pp. 496–512, 1995.

[39] S. Goodwin, J. D. McPherson, and W. R. McCombie, "Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies," *Nature Reviews Genetics*, vol. 17, no. 6, pp. 333–351, 2016.

[40] E. L. van Dijk, H. Auger, Y. Jaszczyszyn, and C. Thermes, "Ten years of next-generation sequencing technology," *Trends in Genetics*, vol. 30, no. 9, pp. 418–426, 2014.

[41] J. M. Rothberg and J. H. Leamon, "The development and impact of 454 sequencing," *Nature Biotechnology*, vol. 26, no. 10, pp. 1117–1124, 2008.

[42] I. Illumina, "Introduction to ngs." url <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>, 2021.

[43] I. Illumina, "Sequencing platform comparison tool." url <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/comparison-tool.html/research-use-only/microbiology/small-whole-genome-sequencing>, 2021.

[44] L. Uelze, M. Borowiak, M. Bönn, E. Brinks, C. Deneke, T. Hankeln, S. Kleta, L. Murr, K. Stingl, K. Szabo, S. H. Tausch, A. Wöhlke, and B. Malorny, "German-wide interlaboratory study compares consistency, accuracy and reproducibility of whole-genome short read sequencing," *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, 2020.

[45] I. Genohub, "Choosing the right ngs sequencing instrument for your study." url <https://genohub.com/ngs-instrument-guide/>, 2019.

[46] I. Illumina, "Specifications for the nextseq 550 system." url <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq/specifications.html>, 2021.

[47] I. DNA Link, "illumina (novaseq / nextseq)." url <https://www.dnalinkseqlab.com/illumina-hiseq-nextseq/>, 2017.

[48] L. Liu, Y. Li, S. Li, N. Hu, Y. He, R. Pong, D. Lin, L. Lu, and M. Law, *Comparison of Next-Generation Sequencing Systems*, vol. 1–11, pp. 1–25. 02 2014.

- [49] B. Merriman, I. T. RD Team, and J. M. Rothberg, “Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 33, no. 23, pp. 3397–3417, 2012.
- [50] A. Rhoads and K. F. Au, “Pacbio sequencing and its applications,” *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, vol. 13, no. 5, pp. 278–289, 2015. SI: Metagenomics of Marine Environments.
- [51] E. Toprak, A. Veres, J.-B. Michel, R. Chait, D. L. Hartl, and R. Kishony, “Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection,” *Nature Genetics*, vol. 44, 2012.
- [52] W. H. Organization, “Antimicrobial resistance.” url <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>, 2020.
- [53] B. Spellberg, J. H. Powers, E. P. Brass, L. G. Miller, and J. Edwards, John E., “Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 38, pp. 1279–1286, 05 2004.
- [54] T. Oz, A. Guvenek, S. Yildiz, E. Karaboga, Y. T. Tamer, N. Mumcuyan, V. B. Ozan, G. H. Senturk, M. Cokol, P. Yeh, and E. Toprak, “Strength of Selection Pressure Is an Important Parameter Contributing to the Complexity of Antibiotic Resistance Evolution,” *Molecular Biology and Evolution*, vol. 31, pp. 2387–2401, 06 2014.
- [55] R. Pena-Miller, D. Laehnemann, G. Jansen, A. Fuentes-Hernandez, P. Rosenstiel, H. Schulenburg, and R. Beardmore, “When the most potent combination of antibiotics selects for the greatest bacterial load: The smile-frown transition,” *PLOS Biology*, vol. 11, pp. 1–13, 04 2013.
- [56] P. J. Yeh, M. J. Hegreness, A. P. Aiden, and R. Kishony, “Drug interactions and the evolution of antibiotic resistance,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 7, pp. 460–466, 06 2009.
- [57] R. Chait, A. Craney, and R. Kishony, “Antibiotic interactions that select against resistance,” *Nature*, vol. 446, pp. 668–71, 05 2007.
- [58] L. Imamovic and M. O. A. Sommer, “Use of collateral sensitivity networks to design drug cycling protocols that avoid resistance development,” *Science Translational Medicine*, vol. 5, no. 204, pp. 204ra132–204ra132, 2013.
- [59] A. Fuentes-Hernandez, J. Plucain, F. Gori, R. Pena-Miller, C. Reding, G. Jansen, H. Schulenburg, I. Gudelj, and R. Beardmore, “Using a sequential regimen to eliminate bacteria at sublethal antibiotic dosages,” *PLOS Biology*, vol. 13, pp. 1–17, 04 2015.
- [60] J. Moura de Sousa, R. Balbontín, P. Durão, and I. Gordo, “Multidrug-resistant bacte-

- ria compensate for the epistasis between resistances,” *PLOS Biology*, vol. 15, pp. 1–24, 04 2017.
- [61] S. Sengupta, M. Chattopadhyay, and H.-P. Grossart, “The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 4, 2013.
- [62] D. Hughes and D. I. Andersson, “Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 41, pp. 374–391, 03 2017.
- [63] S. Kirmusaoglu, N. Gareayaghi, and B. S. Kocazeybek, “Introductory chapter: The action mechanisms of antibiotics and antibiotic resistance,” *IntechOpen.*, 2019.
- [64] G. Kapoor, S. Saigal, and A. Elongavan, “Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians,” *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 2017.
- [65] C. Walsh, “Antibiotics: Actions, origins, resistance.,” *American Society For Microbiology, Press*, 2003.
- [66] C. Walsh, “Where will new antibiotics come from?,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 1, no. 1, pp. 65–70, 2003.
- [67] A. Bermingham and J. P. Derrick, “The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery,” *BioEssays*, vol. 24, no. 7, pp. 637–648, 2002.
- [68] A. M. Sefton, “Mechanisms of antimicrobial resistance,” *Drugs*, vol. 62, no. 4, pp. 557–566, 2002.
- [69] J. Munita and C. Arias, “Mechanisms of antibiotic resistance,” *Microbiology spectrum*, 2016.
- [70] P. A. Lambert, “Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 10, pp. 1471–1485, 2005. Mechanisms of Antimicrobial Resistance: Opportunities for New Targeted Therapies.
- [71] G. D. Wright, “Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 10, pp. 1451–1470, 2005. Mechanisms of Antimicrobial Resistance: Opportunities for New Targeted Therapies.
- [72] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, and J. J. Collins, “How antibiotics kill bacteria: from targets to networks,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, pp. 423–435, 06 2010.
- [73] M. Travisano, J. Mongold, A. Bennett, and R. Lenski, “Experimental tests of the roles of adaptation, chance, and history in evolution,” *Science*, vol. 267, no. 5194,

pp. 87–90, 1995.

- [74] J. R. Meyer, D. T. Dobias, J. S. Weitz, J. E. Barrick, R. T. Quick, and R. E. Lenski, “Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda,” *Science*, vol. 335, no. 6067, pp. 428–432, 2012.
- [75] A. Santos-Lopez, C. W. Marshall, A. L. Haas, C. Turner, J. Rasero, and V. S. Cooper, “The roles of history, chance, and natural selection in the evolution of antibiotic resistance,” *Elife*, vol. 10, p. e70676, Aug. 2021.
- [76] M. Rebolleda-Gómez and M. Travisano, “Adaptation, chance, and history in experimental evolution reversals to unicellularity,” *Evolution*, vol. 73, no. 1, pp. 73–83, 2019.
- [77] Z. Yao, D. Kahne, and R. Kishony, “Distinct single-cell morphological dynamics under beta-lactam antibiotics,” *Mol. Cell*, vol. 48, pp. 705–712, Dec. 2012.
- [78] Ghigo Jean-Marc and Beckwith Jon, “Cell division in escherichia coli: Role of FtsL domains in septal localization, function, and oligomerization,” *J. Bacteriol.*, vol. 182, pp. 116–129, Jan. 2000.
- [79] N. Buddelmeijer and J. Beckwith, “A complex of the escherichia coli cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region,” *Mol. Microbiol.*, vol. 52, pp. 1315–1327, June 2004.
- [80] A. Batra, R. Roemhild, E. Rousseau, S. Franzenburg, S. Niemann, and H. Schulenburg, “High potency of sequential therapy with only β -lactam antibiotics,” *Elife*, vol. 10, July 2021.
- [81] E. L. A. Macfarlane, A. Kwasnicka, and R. E. W. Hancock, “Role of pseudomonas aeruginosa phop-phoq in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides,” *Microbiology*, vol. 146, no. 10, pp. 2543–2554, 2000.
- [82] M. Hoeksema, M. J. Jonker, K. Bel, S. Brul, and B. H. ter Kuile, “Genome rearrangements in escherichia coli during de novo acquisition of resistance to a single antibiotic or two antibiotics successively,” *BMC Genomics*, vol. 19.
- [83] A. M. Lippa and M. Goulian, “Feedback inhibition in the phoq/phop signaling system by a membrane peptide,” *PLoS genetics*, vol. 5, 2009.
- [84] L. Poirel, A. Jayol, S. Bontron, M.-V. Villegas, M. Ozdamar, S. Türkoglu, and P. Nordmann, “The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in Klebsiella pneumoniae,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 70, pp. 75–80, 09 2014.
- [85] C. Barbosa, R. Römhild, P. Rosenstiel, and H. Schulenburg, “Evolutionary stability

of collateral sensitivity to antibiotics in the model pathogen *Pseudomonas aeruginosa*,” *Elife*, vol. 8, p. e51481, Oct. 2019.

- [86] C. Barbosa, V. Trebosc, C. Kemmer, P. Rosenstiel, R. Beardmore, H. Schulenburg, and G. Jansen, “Alternative evolutionary paths to bacterial antibiotic resistance cause distinct collateral effects,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 34, pp. 2229–2244, Sept. 2017.
- [87] A. Kato, H. Tanabe, and R. Utsumi, “Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg²⁺-responsive promoters,” *J. Bacteriol.*, vol. 181, pp. 5516–5520, Sept. 1999.
- [88] L. R. Prost, M. E. Daley, V. Le Sage, M. W. Bader, H. Le Moual, R. E. Klevit, and S. I. Miller, “Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH,” *Mol. Cell*, vol. 26, pp. 165–174, Apr. 2007.
- [89] D. Wojtkowiak, C. Georgopoulos, and M. Zylicz, “Isolation and characterization of ClpX, a new ATP-dependent specificity component of the Clp protease of *Escherichia coli*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 30, pp. 22609–22617, 1993.
- [90] J. L. Camberg, J. R. Hoskins, and S. Wickner, “The interplay of ClpXP with the cell division machinery in *Escherichia coli*,” *Journal of Bacteriology*, vol. 193, no. 8, pp. 1911–1918, 2011.
- [91] S. Sugimoto, K. Yamanaka, S. Nishikori, A. Miyagi, T. Ando, and T. Ogura, “AaA⁺ chaperone ClpX regulates dynamics of prokaryotic cytoskeletal protein FtsZ,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 9, pp. 6648–6657, 2010.
- [92] R. B. Weart, S. Nakano, B. E. Lane, P. Zuber, and P. A. Levin, “The ClpX chaperone modulates assembly of the tubulin-like protein FtsZ,” *Molecular Microbiology*, vol. 57, no. 1, pp. 238–249, 2005.
- [93] H. S. Deter, A. H. Abualrahi, P. Jadhav, E. K. Schweer, C. T. Ogle, and N. C. Butzin, “Proteolytic queues at ClpXP increase antibiotic tolerance,” *American Chemical Society*, vol. 9, no. 1, pp. 95–103, 2020.
- [94] H. Nicoloff and D. I. Andersson, “Lon protease inactivation, or translocation of the lon gene, potentiates bacterial evolution to antibiotic resistance,” *Molecular Microbiology*, vol. 90, no. 6, pp. 1233–1248, 2013.
- [95] M. Knopp, D. I. Andersson, G. D. Wright, B. Levin, and J. Martinez, “Predictable phenotypes of antibiotic resistance mutations,” *mBio*, vol. 9, no. 3, pp. e00770–18, 2018.
- [96] H. Nicoloff, V. Perreten, L. M. McMurry, and S. B. Levy, “Role for tandem duplication and Lon protease in AcrAB-TolC-dependent multiple antibiotic resistance (mar) in

- an *escherichia coli* mutant without mutations in *marrab* or *acrrab*,” *Journal of Bacteriology*, vol. 188, no. 12, pp. 4413–4423, 2006.
- [97] B. Yan, M. Boitano, T. A. Clark, and L. Ettwiller, “Smrt-cappable-seq reveals complex operon variants in bacteria,” *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, 2018.
- [98] K. S. Chen, P. Saxena, and J. R. Walker, “Expression of the *escherichia coli* *dnax* gene,” *Journal of bacteriology*, vol. 175, no. 20, 1993.
- [99] J. Birnbaum, E. O. Stapley, A. K. Miller, H. Wallick, D. Hendlin, and H. B. Woodruff, “Cefoxitin, a semi-synthetic cephamycin: a microbiological overview,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 4, pp. 15–32, 08 1978.
- [100] H. Okusu, D. Ma, and H. Nikaido, “Acrab efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (*mar*) mutants,” *Journal of Bacteriology*, vol. 178, no. 1, pp. 306–308, 1996.
- [101] C. K. Smith, T. A. Baker, and R. T. Sauer, “Lon and clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, pp. 6678–6682, 1999.
- [102] R. A. Maillard, G. Chistol, M. Sen, M. Righini, J. Tan, C. M. Kaiser, C. Hodges, A. Martin, and C. Bustamante, “Clpx(p) generates mechanical force to unfold and translocate its protein substrates,” *Cell*, vol. 145, pp. 459–469, 2011.
- [103] M. Hegreness, N. Shores, D. Damian, D. Hartl, and R. Kishony, “Accelerated evolution of resistance in multidrug environments,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 37, pp. 13977–13981, 2008.
- [104] C. Barbosa, N. Mahrt, J. Bunk, M. Graßer, P. Rosenstiel, G. Jansen, and H. Schulenburg, “The genomic basis of rapid adaptation to antibiotic combination therapy in *pseudomonas aeruginosa*,” *Molecular Biology and Evolution*, vol. 38, no. 2, pp. 449–464, 2021.
- [105] E. Karinou, E. L. R. Compton, M. Morel, and A. Javelle, “The *escherichia coli* *slc26* homologue *yhm* (*daua*) is a c4-dicarboxylic acid transporter,” *Molecular Microbiology*, vol. 87, no. 3, pp. 623–640, 2013.
- [106] B. Hove-Jensen, K. W. Harlow, C. J. King, and R. L. Switzer, “Phosphoribosylpyrophosphate synthetase of *escherichia coli*. properties of the purified enzyme and primary structure of the *prs* gene,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 15, pp. 6765–6771, 1986.
- [107] A. Galkin, E. Sarikaya, C. Lehmann, A. Howard, and O. Herzberg, “X-ray structure of hi0817 from *haemophilus influenzae*: Protein of unknown function with a novel

- fold,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 57, no. 4, pp. 874–877, 2004.
- [108] S. H. Iram and J. E. Cronan, “The beta-oxidation systems of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are not functionally equivalent,” *Journal of bacteriology*, vol. 188, no. 2, pp. 599–608, 2006.
- [109] EcoCyc, “rpse, 30s ribosomal subunit protein s5.” url <https://biocyc.org/gene?orgid=ECOLIid=EG10904-MONOMER>, 2015.
- [110] T. Oshima and F. Biville, “Functional identification of *ygiP* as a positive regulator of the *ttdA-ttdB-ygjE* operon,” *Microbiology*, vol. 152, no. 7, pp. 2129–2135, 2006.
- [111] M. Masi, E. Pinet, and J.-M. Pagès, “Complex response of the *cpxAR* two-component system to β -lactams on antibiotic resistance and envelope homeostasis in *Enterobacteriaceae*,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 64, no. 6, pp. e00291–20, 2020.
- [112] T. F. Mahoney and T. J. Silhavy, “The *cpx* stress response confers resistance to some, but not all, bactericidal antibiotics,” *Journal of Bacteriology*, vol. 195, no. 9, pp. 1869–1874, 2013.
- [113] G. A. Beggs, R. G. Brennan, and M. Arshad, “Marr family proteins are important regulators of clinically relevant antibiotic resistance,” *Protein Science*, vol. 29, no. 3, pp. 647–653, 2020.
- [114] Z. Hao, H. Lou, R. Zhu, J. Zhu, D. Zhang, B. S. Zhao, S. Zeng, X. Chen, J. Chan, C. He, and P. R. Chen, “The multiple antibiotic resistance regulator *marr* is a copper sensor in *Escherichia coli*,” *Nature Chemical Biology*, vol. 10, no. 1, pp. 21–28, 2014.
- [115] P. S. Pennings, “Standing genetic variation and the evolution of drug resistance in HIV,” *PLoS Comput Biol*, vol. 8, no. 6, p. e1002527, 2012.
- [116] J. Björkman and D. I. Andersson, “The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective,” *Drug Resistance Updates*, vol. 3, no. 4, pp. 237–245, 2000.
- [117] R. E. Lenski, “Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance,” *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, vol. 14, pp. 265–70, 1998.
- [118] L. N. de Citometría de Flujo, “¿qué es la citometría de flujo?.” url <http://labnalcit.org/que-es-la-citometria-de-flujo/>, 2021.
- [119] K. J. Card, T. LaBar, J. B. Gomez, and R. E. Lenski, “Historical contingency in the evolution of antibiotic resistance after decades of relaxed selection,” *PLoS biology*,

vol. 17, no. 10, p. e3000397, 2019.

- [120] M. Lukačšínová, B. Fernando, and T. Bollenbach, “Highly parallel lab evolution reveals that epistasis can curb the evolution of antibiotic resistance,” *Nature communications*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, 2020.
- [121] F. Rousset, J. C. Caballero, F. Piastra-Facon, J. Fernández-Rodríguez, O. Clermont, E. Denamur, E. P. Rocha, and D. Bikard, “The impact of genetic diversity on gene essentiality within the e. coli species,” *Nature Microbiology*, 2021.
- [122] M. Galardini, B. P. Busby, C. Vieitez, A. S. Dunham, A. Typas, and P. Beltrao, “The impact of the genetic background on gene deletion phenotypes in *saccharomyces cerevisiae*,” *Molecular systems biology*, vol. 15, no. 12, p. e8831, 2019.
- [123] B. R. Levin, V. Perrot, and N. Walker, “Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria,” *Genetics*, vol. 154, no. 3, pp. 985–997, 2000.
- [124] W. D. Crill, H. A. Wichman, and J. Bull, “Evolutionary reversals during viral adaptation to alternating hosts,” *Genetics*, vol. 154, no. 1, pp. 27–37, 2000.
- [125] E. Szekeres, C. M. Chiriac, A. Baricz, T. Szőke-Nagy, I. Lung, M.-L. Soran, K. Rudi, N. Dragos, and C. Coman, “Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas,” *Environ. Pollut.*, vol. 236, pp. 734–744, May 2018.
- [126] L. Zhou, S. M. Limbu, M. Shen, W. Zhai, F. Qiao, A. He, Z.-Y. Du, and M. Zhang, “Environmental concentrations of antibiotics impair zebrafish gut health,” *Environ. Pollut.*, vol. 235, pp. 245–254, Apr. 2018.
- [127] J. L. Martinez, “Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants,” *Environ. Pollut.*, vol. 157, pp. 2893–2902, Nov. 2009.
- [128] S. A. Kraemer, A. Ramachandran, and G. G. Perron, “Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy,” *Microorganisms*, vol. 7, no. 6, p. 180, 2019.
- [129] T. U. Berendonk, C. M. Manaia, C. Merlin, D. Fatta-Kassinos, E. Cytryn, F. Walsh, H. Bürgmann, H. Sørum, M. Norström, M.-N. Pons, *et al.*, “Tackling antibiotic resistance: the environmental framework,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 13, no. 5, pp. 310–317, 2015.
- [130] I. L. Hernández-González and S. Castillo-Ramírez, “Antibiotic-resistant *acinetobacter baumannii* is a one health problem,” *The Lancet Microbe*, vol. 1, no. 7, p. e279, 2020.

- [131] E. Gullberg, S. Cao, O. G. Berg, C. Ilbäck, L. Sandegren, D. Hughes, and D. I. Andersson, “Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations,” *PLoS pathogens*, vol. 7, no. 7, p. e1002158, 2011.
- [132] A. Fuentes-Hernández, A. Hernández-Koutoucheva, A. F. Muñoz, R. Domínguez Palestino, and R. Peña-Miller, “Diffusion-driven enhancement of the antibiotic resistance selection window,” *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 16, no. 158, p. 20190363, 2019.
- [133] P. Swain, K. Stevenson, A. Leary, L. Montano-Gutierrez, I. Clark, J. Vogel, and T. Pilizota, “Inferring time derivatives including cell growth rates using gaussian processes,” *Nature Communications*, vol. 7, no. 13766, 2016.
- [134] A. M. Bolger, M. Lohse, and B. Usadel, “Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data,” *Bioinformatics*, vol. 30, pp. 2114–2120, Aug. 2014.
- [135] D. E. Deatherage and J. E. Barrick, “Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1151, pp. 165–188, 2014.
- [136] R. L. Tatusov, M. Y. Galperin, D. A. Natale, and E. V. Koonin, “The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, pp. 33–36, Jan. 2000.
- [137] A. Leimbach, “bac-genomics-scripts: Bovine e. coli mastitis comparative genomics edition,” Dec. 2016.