



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA
AVANZADA

MODELACIÓN DE CRECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN TECNOLOGÍA

PRESENTA:

ERICK ANDRES HERNANDEZ ORTEGA

TUTORES:

DR. GUILLERMO RAMÍREZ SANTIAGO
M. EN C. CARLOS GONZÁLEZ CASTRO

Querétaro, Querétaro. 21 de octubre 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi madre y mi hermano, pilares de mi vida.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi tutor y director de tesis, Dr. Guillermo Ramírez Santiago. Cada día del proyecto compartió su amor por la ciencia. Por mostrarme la importancia de la formalidad, la precisión y la paciencia. “Espacio que llevamos prisa.”.

Al M. en C. Carlos Alberto González Castro, por compartir su entusiasmo y pasión por la resolución de problemas a través de la programación desde el primer día. Por su tiempo, entrega, y compromiso.

A la Dra. Corina Diana Ceapă, por su contribución en la revisión reiterada del trabajo, y sus aportaciones en consideraciones biológicas, específicamente en el mecanismo de percepción de cuórum.

Al Dr. Jorge Velasco, por su revisión detallada y enriquecedora, así como por traer a mi atención el número 10, volumen **20**, de la revista “Nature Reviews Microbiology” de octubre de 2022, dedicado al tema de biopelículas.

Al Dr. Esteban, por su apoyo y contribuciones durante el proceso de revisión, especialmente en el análisis del alcance y formulación de objetivos del trabajo.

Al Dr. Alejandro, por sus contribuciones en la consideración y explicación geométrica de los modelos, así como en la redacción correcta y precisa de esta tesis.

A mi madre, por todo lo que me ha dado.

A mi padre, por el apoyo que me brindó en múltiples aspectos.

A mi hermano, motivo de mi felicidad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme adquirir una educación del más alto nivel, mediante clases, instalaciones y oportunidades invaluable.

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, que me permitió indagar en la

ciencia, conocer investigadores y compañeros con diferentes perspectivas y aspiraciones.

Al Instituto de Matemáticas, por brindarme un espacio seguro, con oportunidades de crecimiento.

Índice general

Resumen	x
1 Introducción	1
1.0.1 Hipótesis	3
1.0.2 Preguntas por responder	4
1.1 Biopelículas	4
1.1.1 Composición	5
1.1.2 Percepción de cuórum	6
1.2 Antibióticos	7
1.3 Bacterias en estado inactivo o latente	7
1.4 Fases de implementación del modelo	8
2 Modelo matemático	10
2.1 Ecuación de difusión	11
2.2 Ecuación de difusión en dos dimensiones	12
2.2.1 Solución analítica	13
2.2.2 Solución numérica	15
2.3 Dinámica de transporte y consumo de nutrientes	17
2.4 Percepción de cuórum	19
3 Implementación numérica	21
3.1 Ecuación de difusión en diferencias finitas	21
3.2 Estabilidad de las soluciones numéricas	23
3.3 Algoritmo para la percepción de cuórum	25
3.4 Parámetros de las simulaciones	27

3.5	Características generales de la simulación	28
3.6	Modelos de reproducción bacteriana	30
3.6.1	Modelo A1	31
3.6.2	Modelo A2	31
3.6.3	Modelo B1	31
3.6.4	Modelo B2	32
4	Resultados	33
4.1	Difusión de nutrientes y oxígeno	33
4.2	Consumo de nutrientes	36
4.3	Modelos de consumo de nutrientes y oxígeno con crecimiento de la biopelícula	38
4.3.1	Modelo A1	40
4.3.2	Modelo A2	40
4.3.3	Modelo B1	43
4.4	Modelo con cinética de percepción de cuórum	46
4.5	Mecanismos de latencia de las bacterias	53
4.5.1	Modelo de senescencia	54
4.5.2	Modelo híbrido	56
5	Conclusiones	59

Índice de figuras

1.1	Biopelícula de <i>Staphylococcus aureus</i> en un catéter permanente. Imagen de dominio público, realizada por CFC y HHS de los Estados Unidos de América.	3
2.1	Solución analítica 2.6 en varios tiempos empleando valores de k y l desde 0 a 16.	15
2.2	Solución numérica al problema de difusión de partículas en una placa cuadrada para los mismos tiempos de la figura 2.1.	16
2.3	Diferencia porcentual entre las soluciones numérica y analítica.	17
3.1	Solución de ecuación de difusión con el parámetro de estabilidad $r < 0.5$.	24
3.2	Solución de ecuación de difusión con el parámetro de estabilidad $r > 0.5$.	25
3.3	Crecimiento bacteriano alrededor de un tubo. La imagen se obtuvo de la referencia [14].	28
3.4	Modelos de crecimiento de la biopelícula.	30
4.1	Difusión de nutrientes en un medio de dos dimensiones. El tiempo al que corresponde cada imagen se indica en la parte superior de cada cuadro.	35
4.2	Difusión de oxígeno en un medio de dos dimensiones. El tiempo al que corresponde cada imagen se indica en la parte superior de cada cuadro.	36
4.3	En la parte superior de cada figura se indica el tiempo al que corresponde la distribución de nutrientes. Los cuadros verdes muestran el perímetro de la región que contiene bacterias.	38
4.4	Crecimiento de la biopelícula con el modelo A1 y condiciones de frontera periódicas en los lados laterales y de Dirichlet y Neumann en los lados superior e inferior.	41

4.5 Crecimiento de la biopelícula con el modelo A1 y condiciones de frontera periódicas en los cuatro lados del cuadrado. 42

4.6 Crecimiento de la biopelícula con el modelo A2 y condiciones de frontera periódicas en los lados laterales y de Dirichlet y Neumann en los lados superior e inferior. 43

4.7 Crecimiento de la biopelícula con el modelo A2 y condiciones de frontera periódicas en los cuatro lados del cuadrado. 44

4.8 Modelo B1. La concentración inicial de nutrientes C_i varía entre $0 \leq C_i \leq 25$. 45

4.9 Modelo B1. La concentración inicial de nutrientes C_i varía entre $0 \leq C_i \leq 15$. 47

4.10 Crecimiento de la biopelícula de acuerdo con el modelo (B1) para dos intervalos de concentración inicial de nutrientes (a) $0 \leq C_{i,1} \leq 20$, (b) $0 \leq C_{i,2} \leq 10$, para diferentes valores del parámetro κ : (i) 0, (ii) 8×10^4 , (iii) 16×10^4 y (iv) 22×10^4 49

4.11 Crecimiento de la biopelícula de acuerdo con el modelo (B2) para dos intervalos de concentración inicial de nutrientes (a) $0 \leq C_{i,1} \leq 20$, (b) $0 \leq C_{i,2} \leq 10$, para diferentes valores del parámetro κ : (i) 0, (ii) 8×10^4 , (iii) 16×10^4 y (iv) 22×10^4 50

4.12 Dimensión fractal vs valor κ con barras de error. La línea verde representa los resultados del modelo (B1) con concentración inicial de nutrientes $0 \leq C_{i,1} \leq 20$ y la línea morada a los resultados del modelo (B1) con concentración inicial de nutrientes $0 \leq C_{i,2} \leq 10$. La línea azul corresponde a los resultados del modelo (B2) con concentración inicial de nutrientes $0 \leq C_{i,1} \leq 20$, la línea naranja los resultados del modelo (B2) con concentración inicial de nutrientes $0 \leq C_{i,2} \leq 10$ 53

4.13 Distribución de bacterias activas (verde) e inactivas (rojo) en la biopelícula de acuerdo con el modelo dependiente del tiempo, para dos concentraciones iniciales: (a) aleatoria, (b) gradiente que decrece linealmente en la dirección vertical. Los valores del tiempo umbral, $T_{a \rightarrow d}(t)$ son: (i) 100, (ii) 750, (iii) 1,500 y (iv) 2,500. 55

4.14 Distribución de bacterias activas (verde) e inactivas (rojo) en la biopelícula de acuerdo con el modelo híbrido, para dos concentraciones iniciales: (a) aleatoria, (b) gradiente que decrece linealmente en la dirección vertical. Los valores de p son: (i) 0, (ii) 0.001, (iii) 0.005 y (iv) 0.1. 57

Índice de tablas

1.1	Composición bioquímica de biopelícula [19]	6
3.1	Parámetros del modelo, extraídos de [13] y [27].	27
4.1	Concentraciones iniciales, $C_{i,1}$ y $C_{i,2}$ y valores de los parámetros empleados para las simulaciones del modelo con dinámica de percepción de cuórum. El parámetro t_{\max} es el tiempo máximo de crecimiento de la biopelícula. . . .	48
4.2	Valores de dimensión fractal promedio según el valor de tasa asesina κ empleando el modelo de crecimiento (B1).	51
4.3	Valores de dimensión fractal promedio según el valor de tasa asesina κ empleando el modelo de crecimiento (B2).	52

Resumen

A lo largo de los años ha habido una creciente preocupación en todo el mundo debido a la resistencia bacteriana a los antibióticos. Uno de los aspectos que han contribuido a esta resistencia es la formación de biopelículas bacterianas.

En esta tesis, se presenta un modelo cuantitativo de crecimiento de una biopelícula que integra algunos de los aspectos más significativos del proceso de crecimiento como son el transporte de nutrientes y oxígeno mediante procesos difusivos, y la autorregulación del crecimiento mediante el proceso de percepción de cuórum.

La resistencia a los antibióticos se analiza estudiando dos escenarios: (i) Cuando el estado de latencia se presenta de forma aleatoria. (ii) Debido a la senescencia de las bacterias.

Capítulo 1

Introducción

A principios del siglo XX, el zoólogo Charles Manning Child encontró que los gradientes de actividad metabólica y el consumo de oxígeno están correlacionados con los procesos de desarrollo en animales invertebrados. Propuso que los gradientes metabólicos tienen un papel importante en la formación de patrones durante el desarrollo de embriones. De todas las transiciones entre niveles de organización, el advenimiento de la multicelularidad es quizás el más interesante. La multicelularidad representa una transición del mundo microscópico al macroscópico. El tamaño de la población de las células/bacterias formando colonias y de los organismos multicelulares usualmente varían en el rango de 10 a 100 μm . El tamaño total de la población o del órgano está determinado por el número de células que se producen y/o acumulan. Por lo anterior, los organismos multicelulares responden de manera diferente a los microorganismos.

La multicelularidad, en la que las células se adhieren y se comunican entre sí, se observa a lo largo de la filogenia [17] y conduce a la formación de gradientes de cantidades físicas y químicas, debido a restricciones estructurales y a la actividad metabólica endógena. Estos gradientes determinan los microambientes internos e influyen en el desarrollo de las estructuras multicelulares. Un mapa de gradientes físicos y químicos internos es la clave para comprender la fisiología de las células en cualquier tipo de ensamblaje, lo que hace que la formación de gradientes sea un tema históricamente importante en campos que van desde la biología del desarrollo hasta la ecología microbiana [12].

Los seres humanos son colonizados por microorganismos comensales, que tienen fun-

ciones cruciales en la fisiología y la salud del huésped. De hecho, algunas microbiotas asociadas al huésped se ensamblan en biopelículas. Sin embargo, la colonización del huésped con microorganismos patógenos y la formación de biopelículas patógenas conducen a infecciones recurrentes y crónicas que son difíciles de erradicar.

La tolerancia a los fármacos antimicrobianos manifiesta la capacidad de una población bacteriana para sobrevivir transitoriamente a concentraciones letales de antibióticos, y esto se debe a que las bacterias ralentizan sus procesos biológicos esenciales [4]. Se ha encontrado que para promover la tolerancia a los antibióticos una gran parte de la población bacteriana en una biopelícula adopta un modo de supervivencia en el que una gran parte de la población tiene una lenta proliferación o definitivamente deja de proliferar [6].

En ambientes naturales o en tejidos de organismos vivientes, algunas especies bacterianas forman biopelículas para asegurar su supervivencia a largo plazo [11]. Las bacterias adheridas a superficies sólidas forman biopelículas maduras mediante la proliferación y producción de sustancia polimérica extracelular (SPE). La SPE está compuesta de moléculas de ADN, proteínas y polisacáridos. El grosor de la estructura de la biopelícula puede ser desde $\sim 5\mu\text{m}$ hasta los $1000\mu\text{m}$ [23]. Este grosor impide la difusión de nutrientes hacia la parte interior de la biopelícula lo que induce un estado de latencia en las bacterias localizadas en esta región. Debido a esto, no todas las bacterias metabolizan los antibióticos además que la movilidad de células inmunes se reduce. Por esto, se piensa que las biopelículas son responsables de las características crónicas e intratables de enfermedades infecciosas bacterianas, lo que aumenta la mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. Por ejemplo, se han reportado infecciones intratables de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística [20], así mismo, la bacteria *Staphylococcus aureus* (Figura 1.1) es responsable de muchas infecciones debido a que se organizan formando una biopelícula. A nivel mundial se han incrementado las infecciones por *Staphylococcus aureus* que es resistente a meticilina. El espectro clínico de la enfermedad que produce esta bacteria incluye desde colonización nasal hasta infecciones superficiales e invasoras [16].

La eficacia de muchos antibióticos está disminuyendo a un ritmo preocupante, ya que las bacterias se están volviendo cada vez más resistentes como resultado de la evolución

natural. Esto también es debido en gran parte al uso inadecuado de los antibióticos en las últimas décadas. Estudios recientes indican que entre el 45 % y el 66 % de los antibióticos prescritos en el nivel de atención primaria son innecesarios; tanto la dosis como la duración del tratamiento no son adecuados en aproximadamente el 50 % de las prescripciones. Contrarrestar la resistencia bacteriana a los antibióticos se ha vuelto un reto global en los últimos años. En la actualidad, en el mercado, no existe un espectro amplio de antibióticos novedosos y efectivos. Las consecuencias se ven en todo el mundo en la medida que aparecen nuevas infecciones bacterianas difíciles de tratar. Otra dinámica relevante es la correspondiente a las bacterias en estado latente o inactivo ya que no metabolizan los antibióticos [13]

Para estudiar los mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos, se puede analizar experimentalmente los cambios en su secuenciación genómica [18] y los mecanismos mediante los cuales las bacterias entran en estado latente. Esto último se estudiará en las secciones 1.3 y 4.5 de esta tesis.

En las siguientes dos subsecciones se plantean las hipótesis para el desarrollo del modelo de crecimiento de una biopelícula y las preguntas que se responderán en esta tesis.

1.0.1. Hipótesis

- El mapa de gradientes físicos y químicos internos es crucial para comprender la evolución de cualquier tipo de ensamblaje de células/bacterias. Por lo anterior, los

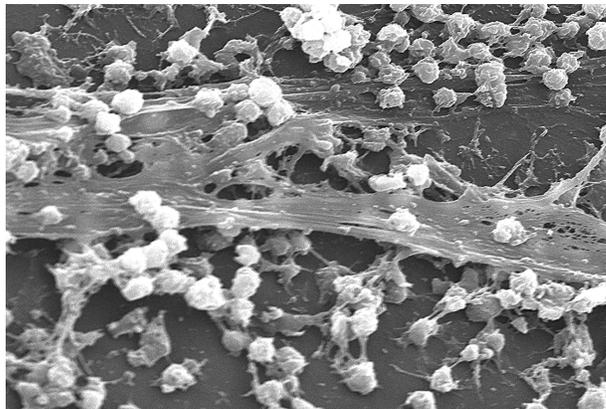


Figura 1.1: Biopelícula de *Staphylococcus aureus* en un catéter permanente. Imagen de dominio público, realizada por CFC y HHS de los Estados Unidos de América.

gradientes metabólicos desempeñan un papel importante en el crecimiento y estructura de las biopelículas.

- La comunicación bacteriana se basa en moléculas de señalización química llamadas autoinductores, que regulan la expresión génica bacteriana en un proceso conocido como percepción de cuórum. La percepción de cuórum permite que las bacterias individuales dentro de las colonias se coordinen y lleven a cabo funciones en toda la colonia, tales como: esporulación, bioluminiscencia, virulencia, conjugación, competencia y formación de biopelículas.

1.0.2. Preguntas por responder

- ¿Cómo depende la estructura de la biopelícula de las diferentes formas de los gradientes de concentración de nutrientes y oxígeno?
- ¿Cómo influye la acción de la percepción de cuórum en la comunidad bacteriana para adaptarse y coordinar un comportamiento como grupo que le permite controlar la densidad de población local para sobrevivir?
- ¿Cómo se puede implementar el mecanismo de ralentización de los procesos biológicos esenciales de una población bacteriana en una biopelícula para sobrevivir transitoriamente a concentraciones letales de antibióticos?

1.1. Biopelículas

Las bacterias exhiben dos formas de crecimiento, que pueden ser bacterias planctónicas y el agregado sésil conocido como biopelícula [19]. Una biopelícula es una asociación de microorganismos en la que las células se adhieren entre sí a una superficie encerrada dentro de la matriz de una SPE producida por las propias bacterias [19]. La SPE proporciona estabilidad a la reproducción y crecimiento de las células, aumenta la adhesión a la superficie y sirve como una base para que se unan las células, dando lugar a la biopelícula. Casi todos (99.9%) de los microorganismos tienen la capacidad de formar biopelículas en una amplia gama de superficies, tanto de carácter biológico como inerte.

Su formación incluye varias etapas [9]: las bacterias planctónicas se adhieren de forma reversible a una superficie, forman una microcolonia y producen una matriz de SPE. Una vez establecida, la biopelícula puede liberar células bacterianas individuales para colonizar otros nichos donde se pueden formar nuevas biopelículas. Dentro del cuerpo humano, esta estructura permite la propagación de bacterias en las superficies de varios órganos internos y externos del cuerpo (por ejemplo, corazón, pulmón, epitelio).

Se han encontrado biopelículas en el tejido pulmonar de pacientes con fibrosis quística, en el oído medio de pacientes con otitis, en casos de rinosinusitis crónica, en heridas crónicas, en dispositivos médicos como catéteres urinarios y prótesis valvulares cardíacas, entre otros. También es importante mencionar que se pueden formar biopelículas tanto en superficies vivas como inertes, mediante diversos mecanismos, y generalmente se producen en superficies rígidas sumergidas o como esteras flotantes expuestas a soluciones acuosas. Algunos ejemplos de lugares donde se desarrollan biopelículas en superficies inertes son industrias, hoteles, canales de aguas residuales, baños, laboratorios, entornos hospitalarios, etcétera.

La biopelícula es el modo típico de crecimiento bacteriano en la naturaleza que le confiere muchas ventajas, como su capacidad para resistir condiciones ambientales adversas así como resistencia a los antibióticos y biocidas. Esto último conduce a complicaciones en el tratamiento de infecciones humanas y, por lo tanto, limita las opciones terapéuticas. Además, las biopelículas protegen a la comunidad bacteriana del daño externo y representan un desafío para el sistema inmunológico del huésped al promover la persistencia de infecciones crónicas que se caracterizan por la inflamación persistente y el daño en tejidos.

1.1.1. Composición

La SPE está compuesta por agua, polisacáridos, ADN, ARN y proteínas, siendo el agua la mayor parte de ella y la responsable del flujo de nutrientes dentro de la matriz de la biopelícula. En el cuadro 1.1 se presenta brevemente la composición bioquímica representativa y el porcentaje que ocupa la matriz en una biopelícula. En muchos casos las biopelículas bacterianas están más allá del alcance de antibióticos y del sistema inmunológico humano, como se describe brevemente en la sección 1.2. Debido a la composición

y estructura de las biopelículas las bacterias que se establecen en ellas tienen un mayor potencial para soportar los agentes antimicrobianos y dar como resultado enfermedades crónicas que requieren de tratamientos prolongados.

Componente	Porcentaje de la matriz
Células microbianas	2-5 %
ADN y ARN	<1-2 %
Polisacáridos	1-2 %
Proteínas	<1-2 % (incluyendo enzimas)
Agua	Hasta 97 %

Tabla 1.1: Composición bioquímica de biopelícula [19]

1.1.2. Percepción de cuórum

Se sabe que las bacterias llevan una vida muy social, en simbiosis, con la capacidad de desarrollar mecanismos y formas de comunicación. Las bacterias mantienen una comunicación permanente entre ellas, dentro de los diferentes ambientes o microambientes donde conviven. Esta manera de adaptarse a una vida en comunidad y desarrollar la capacidad de sociabilidad, les permite detectar la densidad celular local y por consiguiente la oportunidad de desarrollar y coordinar los comportamientos de un grupo. Esta capacidad denominada percepción de cuórum o “quorum sensing”, la desarrollan a través de la secreción y detección de las moléculas autoinductoras que se acumulan en un espacio dependiente de la densidad poblacional y del espacio de convivencia. Cuando las concentraciones de la molécula autoinductora alcanzan una determinada concentración, se activa un mecanismo de percepción de cuórum al cual responden las bacterias, lo que les permite modular sus comportamientos, incrementar la eficacia y adecuación a su medio ambiente, logrando una serie de beneficios que dependen de la presencia o ausencia de otras bacterias o de ellas mismas [5].

Durante la formación de biopelículas, el mecanismo de percepción de cuórum controla la proliferación bacteriana generando una proteína que regula la tasa de muerte de las bacterias para controlar el crecimiento de la población. En la sección 2.4 se propone e incorpora un modelo cinético como mecanismo de percepción de cuórum para controlar el

crecimiento de la biopelícula.

1.2. Antibióticos

Las bacterias en una biopelículas son menos sensibles a los antibióticos en comparación con las células libres (planctónicas) [1]. Hasta el 80 % de las células que forman biopelículas están asociados con infecciones persistentes[1]. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, asociada con la fibrosis quística, y la *Staphylococcus aureus* (Figura 1.1), que son responsables de la mayoría de las infecciones de heridas, constituyen ejemplos típicos de patógenos persistentes que forman biopelículas [1].

Las biopelículas complejas (polimicrobianas) compuestas de múltiples especies de células son usualmente más resistentes a los antibióticos que las biopelículas compuestas de una sola especie [25]. La diversidad y el estado metabólico de las células en una biopelícula tienen un papel clave en la resistencia a los antibióticos. Las células persistentes son generalmente más resistentes a los antibióticos, y contribuyen al restablecimiento de la comunidad bacteriana. Las células en las secciones inactivas de una biopelícula generalmente no se ven afectadas por los antibióticos, como se registra con estudios sobre β -lactámicos, ciprofloxacina, tetraciclina y tobramicina ([20], [21]).

1.3. Bacterias en estado inactivo o latente

Durante la formación de la biopelícula, las células consumen nutrientes y oxígeno, y crean gradientes de concentración de estas sustancias dentro de la biopelícula en desarrollo [22]. En las biopelículas hay células persistentes que pueden tolerar dosis no letales de antibióticos. Estas células tienen variaciones fenotípicas no heredables, a diferencia de las células resistentes a los antibióticos que son el resultado de mutaciones genéticas. Se ha encontrado que las células localizadas en las capas inferiores de las biopelículas suprimen su metabolismo, la síntesis de proteínas y replicaciones de ADN debido a falta de nutrientes y oxígeno [15]. Es por ello que las bacterias en estado latente pueden sobrevivir a la exposición de antibióticos.

Se han propuesto algunos mecanismos que conducen a las bacterias en un estado activo (a) a un estado de latencia que representaremos con el subíndice d (por la palabra en inglés “dormant”) [13]. A este cambio de estado se le denominará inactivación bacteriana. Los mecanismos que se analizan son:

1. Senescencia de las bacterias.

Una bacteria pasa a un estado latente cuando el tiempo transcurrido desde su última división excede un tiempo umbral.

2. Limitación de nutrientes y oxígeno.

Las bacterias pueden pasar a un estado latente cuando la disponibilidad local de nutrientes y de oxígeno es ínfima.

3. Proceso estocástico.

Las bacterias pasan a un estado latente independientemente de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno y de su posición en el espacio.

En esta tesis se proponen dos mecanismos de inactivación bacteriana que se relacionan con la senescencia de las bacterias y un mecanismo híbrido que involucra la limitación de nutrientes y oxígeno junto con un proceso estocástico.

En la siguiente sección se describen brevemente las etapas del desarrollo del modelo de crecimiento de la biopelícula.

1.4. Fases de implementación del modelo

El modelo que se presenta en esta tesis, corresponde a una biopelícula que crece en la pared exterior de un cilindro y se elaboró en cinco fases:

1. Difusión

Los nutrientes y el oxígeno se transportan mediante difusión, por lo que es necesario resolver numéricamente la ecuación de difusión en dos dimensiones, con distintas condiciones de frontera.

2. Consumo

Se colocaron bacterias en regiones localizadas, acoplando la dinámica de consumo con los procesos de difusión, lo que dio como resultado dos ecuaciones de reacción-difusión.

3. Reproducción bacteriana

Se propusieron un conjunto de reglas, mediante la implementación de un autómata celular (ver sección 2), para simular la reproducción bacteriana, lo que dio lugar al crecimiento de la biopelícula.

4. Dinámica de percepción de cuórum

Para modelar el proceso de auto regulación bacteriana, se implementó una dinámica de percepción de cuórum que limita el crecimiento de la densidad celular y como consecuencia el crecimiento de la biopelícula.

5. Inactivación bacteriana

Para simular la resistencia de las bacterias a los antibióticos se propusieron dos mecanismos que conducen a estados bacterianos de latencia.

Con esto, se espera contribuir al entendimiento básico del proceso de formación de biopelículas.

Capítulo 2

Modelo matemático

En las siguientes secciones se explica cómo se describe cuantitativamente el proceso de transporte de oxígeno y nutrientes en la biopelícula, así como su crecimiento mediante la implementación de un autómata celular ¹ y un conjunto de ecuaciones de transporte. La percepción de cuórum limita el proceso de proliferación de la células y, como consecuencia, el crecimiento indefinido de la biopelícula.

Para el desarrollo de la presente tesis, se consideró el modelo propuesto en [7], donde se construyeron 6 submodelos que involucran los procesos más significativos de la dinámica de crecimiento de la biopelícula. Estos son (i) crecimiento y decaimiento de la biomasa, (ii) división y esparcimiento de la biomasa, (iii) transporte de sustratos, (iv) separación de la biomasa, (v) flujo de líquido a través de la biomasa y (vi) fijación de la biomasa. La biomasa es la masa de organismos biológicos en un punto (x, y) a un tiempo t . En esta tesis, se modelan las etapas (i), (iii) y (v). En un trabajo de investigación futuro se implementarán las etapas (ii), (iv) y (vi) del modelo propuesto en [7].

El transporte de nutrientes y oxígeno ocurre mediante un proceso de difusión, por lo que en la siguiente sub-sección se estudian las propiedades de la ecuación de difusión y sus soluciones.

¹Un autómata celular es un modelo matemático y computacional que representa un sistema dinámico que evoluciona en pasos discretos. Es adecuado para modelar sistemas naturales que se pueden describir como una colección masiva de objetos simples que interactúan localmente unos con otros.

2.1. Ecuación de difusión

La versión más sencilla de la ecuación de difusión se obtiene a partir de las leyes de Fick. La primera ley de Fick está relacionada con cambios de la concentración en el tiempo y con los gradientes de flujo de materia. La ecuación que relaciona estos cambios se escribe como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\nabla J, \quad (2.1)$$

donde el flujo de materia, J , ocurre de las regiones de mayor concentración hacia las regiones de menor concentración, esto es

$$J = -D\nabla C, \quad (2.2)$$

en esta ecuación C representa la concentración como función de la posición y el tiempo, D es el coeficiente de difusión o difusividad. Sustituyendo la ecuación 2.2 en 2.1 se obtiene ecuación de difusión que se conoce como segunda ley de Fick:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C. \quad (2.3)$$

Esta es la ecuación que describe el cambio de la concentración en el tiempo debido a un proceso difusivo. Para resolver la ecuación de difusión en una, dos o tres dimensiones espaciales, usualmente se consideran cuatro condiciones de frontera típicas y/o combinaciones de éstas.

A continuación se explican las cuatro condiciones de frontera para un problema de difusión en una dimensión espacial definido en una región del espacio $0 \leq x \leq L$.

- Dirichlet

En este caso, la concentración en las fronteras es una función del tiempo:

$$C(0, t) = f_1(t),$$

$$C(L, t) = f_2(t).$$

- Neumann

El sistema está aislado, por lo cual no existe flujo en las fronteras (extremos):

$$\frac{\partial C(0, t)}{\partial x} = 0,$$

$$\frac{\partial C(L, t)}{\partial x} = 0,$$

- Robin

La condición de frontera de Robin es una combinación lineal de las condiciones de frontera de Dirichlet y Neumann. Se expresa de la siguiente manera:

$$a_1 C(0, t) - b_1 \frac{\partial C(0, t)}{\partial x} = h_1(0, t),$$

$$a_2 C(L, t) + b_2 \frac{\partial C(L, t)}{\partial x} = h_2(L, t),$$

donde a_i y b_i , $i = 1, 2$ con constantes, y h_1 , h_2 son funciones del tiempo.

- Periódicas en la dirección del eje x

El valor de la concentración es el mismo después de una traslación L :

$$C(x, t) = C(x + L, t).$$

Estas condiciones de frontera se pueden generalizar con relativa facilidad a procesos difusivos en dos y tres dimensiones.

2.2. Ecuación de difusión en dos dimensiones

Para estudiar el crecimiento de biopelículas, se empleó un modelo de reacción-difusión en dos dimensiones espaciales, x e y , y una dimensión temporal, t . Esta ecuación se emplea con el objetivo de modelar cuantitativamente el proceso de transporte de nutrientes y oxígeno en la biopelícula.

En esta sección se resuelve analíticamente la ecuación de difusión en dos dimensiones. La solución de esta ecuación se usa para verificar la precisión del algoritmo numérico que se usó para resolver las ecuaciones del modelo. Por simplicidad, las soluciones se calculan usando condiciones de frontera de Dirichlet.

La ecuación de difusión en dos dimensiones se deriva de la segunda Ley de Fick (ec. 2.3) y se escribe como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right), \quad (2.4)$$

en un dominio rectangular definido por

$$0 < x < a, \quad 0 < y < b, \quad \text{para un tiempo } t > 0,$$

con condiciones de frontera del tipo Dirichlet

$$C(0, y, t) = C(a, y, t) = 0, \quad 0 < y < b, \quad t > 0,$$

$$C(x, 0, t) = C(x, b, t) = 0, \quad 0 < x < a, \quad t > 0,$$

y condición inicial

$$C(x, y, 0) = f(x, y), \quad 0 < x < a, \quad 0 < y < b,$$

donde $f(x, y)$ es una función de las coordenadas (x, y) .

A continuación se describe la solución analítica a esta ecuación y, posteriormente, se detalla la solución numérica empleada para modelar computacionalmente este fenómeno.

2.2.1. Solución analítica

La solución analítica de la ecuación de difusión de partículas en dos dimensiones con condiciones de frontera de tipo Dirichlet [2] se usará como referencia para verificar que el algoritmo de diferencias finitas produce una solución numérica precisa.

La solución analítica de la ecuación 2.4 se escribe como la siguiente serie de Fourier

(ver referencia [2]):

$$C(x, y, t) = \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} A_{mn} \operatorname{sen} \left(\frac{m\pi}{a} x \right) \operatorname{sen} \left(\frac{n\pi}{b} y \right) e^{-\lambda_{mn}^2 t}, \quad (2.5)$$

donde

$$\lambda_{mn} = \pi \sqrt{D \left(\frac{m^2}{a^2} + \frac{n^2}{b^2} \right)},$$

y los coeficientes $A_{m,n}$ se expresan como:

$$A_{mn} = \frac{4}{ab} \int_0^b \int_0^a f(x, y) \operatorname{sen} \left(\frac{m\pi}{a} x \right) \operatorname{sen} \left(\frac{n\pi}{b} y \right) dx dy$$

donde los subíndices m y n toman los valores: $m, n = 1, 2, \dots$

En los siguientes párrafos se aplica la solución 2.5 al problema de difusión de partículas en una placa cuadrada con lado $a = 1$ y coeficiente de difusión $D = \frac{1}{\pi^2}$. Se considera la condición de frontera tal que en los bordes la concentración sea 0 y una condición inicial tal que la distribución de partículas sea uniforme en el interior de la placa, $f(x, y, 0) = 100$. Aplicando los resultados de los párrafos anteriores se puede verificar que la solución a este problema de difusión del partículas es la siguiente:

$$u(x, y, t) = \frac{1600}{\pi^2} \sum_{k=0}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \frac{\operatorname{sen}((2l+1)\pi x) \operatorname{sen}((2k+1)\pi y)}{(2l+1)(2k+1)} e^{-((2l+1)^2 + (2k+1)^2)t} \quad (2.6)$$

Los resultados para los tiempos $t = 0$, $t = 2$, $t = 4$ y $t = 6$ se muestran en la figura 2.1. Se observa que conforme transcurre el tiempo los gradientes de concentración disminuyen exponencialmente y eventualmente desaparecen para tiempos suficientemente largos, y la distribución de concentraciones de la placa es uniforme e igual a la concentración en los bordes.

En la siguiente sección se presentan los resultados de la solución numérica a este problema. Para analizar la precisión del algoritmo numérico, se calcula la diferencia porcentual entre las soluciones analítica y numérica.

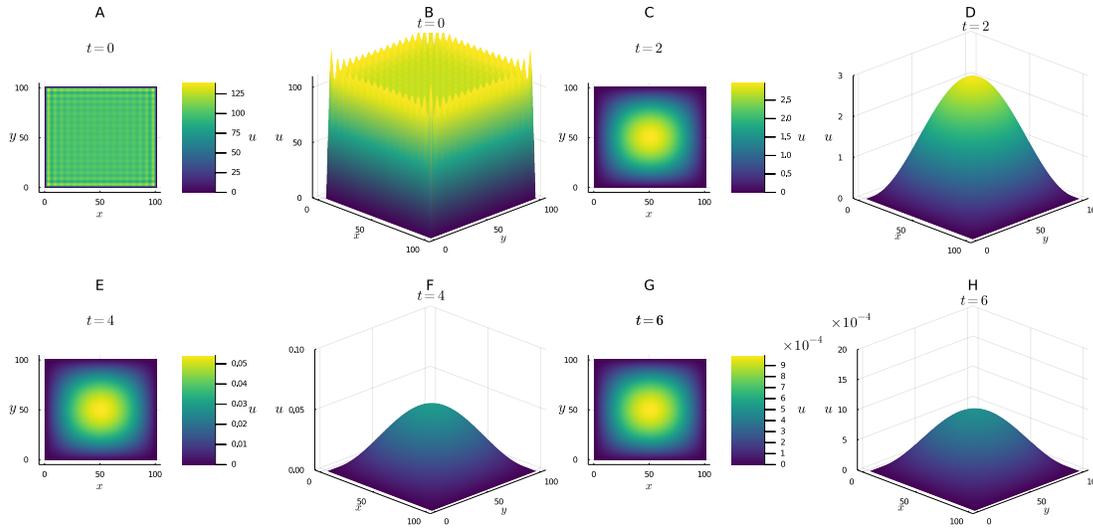


Figura 2.1: Solución analítica 2.6 en varios tiempos empleando valores de k y l desde 0 a 16.

2.2.2. Solución numérica

Para resolver numéricamente el problema de difusión de partículas en la placa usando las mismas condiciones de frontera del problema analítico, se aplicó el algoritmo de diferencias finitas descrito en la sección 3.1. Se obtuvieron las soluciones para los tiempos $t = 0$, $t = 2$, $t = 4$ y $t = 6$ que se presentan en la figura 2.2. En los siguientes párrafos se demostrará que estas soluciones son cuantitativamente consistentes, dentro de cierta precisión, con las correspondientes soluciones analíticas.

En la figura 2.3 se muestran las diferencias porcentuales entre ambas soluciones.

Se observa que en $t = 0$, hay una diferencia porcentual grande en las orillas de la placa, debido al fenómeno de Gibbs. El fenómeno de Gibbs se refiere a las oscilaciones que se presentan en la solución analítica cuando una función discontinua se aproxima mediante una serie de Fourier finita [10]. Es importante recordar que, en el planteamiento del problema, se tiene una placa con una concentración constante de 0 en las orillas, y 100 en el interior, por lo que se tiene una discontinuidad abrupta en la concentración como se muestra en la figura 2.1 A. El fenómeno de Gibbs no se presenta en las soluciones numéricas.

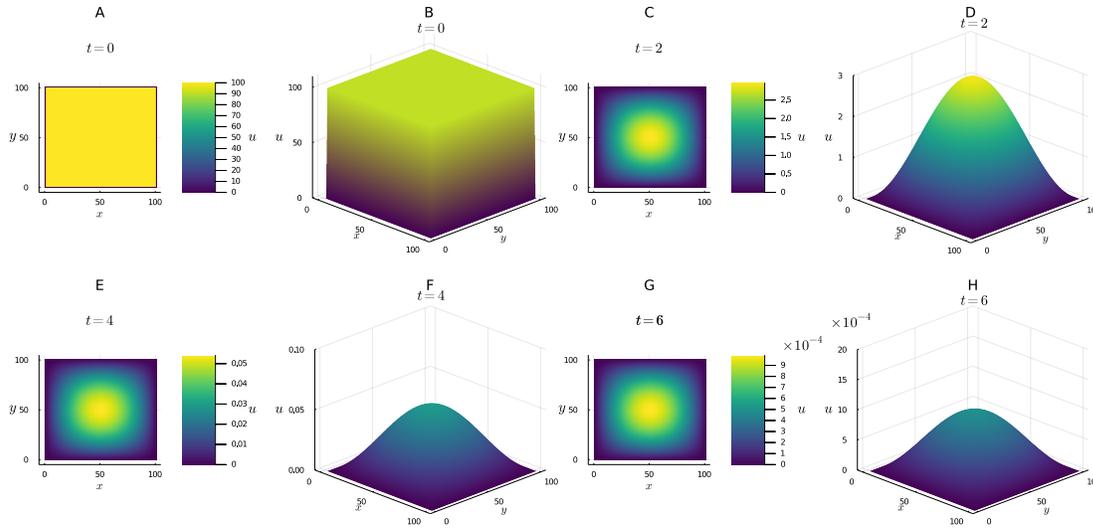


Figura 2.2: Solución numérica al problema de difusión de partículas en una placa cuadrada para los mismos tiempos de la figura 2.1.

Se observa que la diferencia porcentual entre las soluciones analítica y numérica a los tiempos $t = 2$, $t = 4$ y $t = 6$, en los puntos en el interior de la placa es menor al 0.2%. Esto es una indicación que el algoritmo numérico que se usó para obtener las soluciones de la ecuación de difusión en dos dimensiones es estable y tiene una precisión de 0.2%. La diferencia entre estas soluciones se debe a las limitaciones del algoritmo numérico y a las inherentes a la computación numérica. En lo que sigue se indican algunos puntos relacionados con esto último.

1. Estrictamente los números reales no se pueden simular o representar en la computadora debido al tamaño de la palabra, 64 bits en precisión sencilla y 128 bits en precisión doble.
2. Debido a lo anterior la computadora realiza redondeos al realizar las operaciones numéricas, por lo que cuando se hace un número importante de iteraciones el error de redondeo se propaga.
3. Para resolver el problema de difusión en dos dimensiones, se usó el algoritmo de diferencias centradas que tiene un error numérico asociado de orden 2.

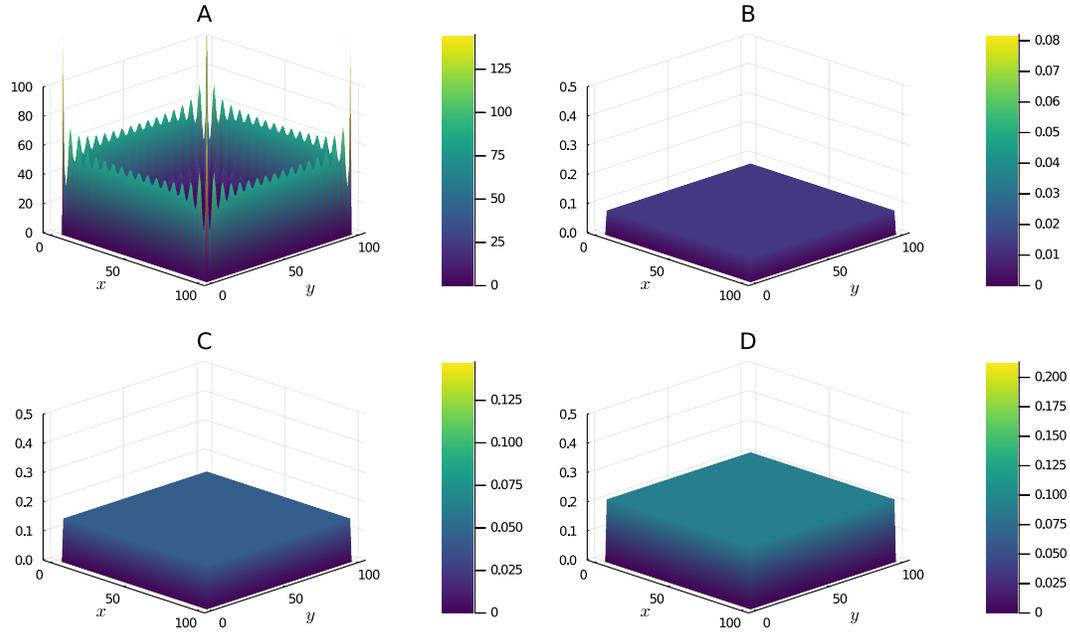


Figura 2.3: Diferencia porcentual entre las soluciones numérica y analítica.

Por otra parte, la solución analítica que es exacta está expresada como una serie infinita de Fourier. Al evaluar numéricamente esta solución sólo se calculan un número finito de términos de la serie, lo que genera una solución aproximada y cuya precisión depende del número de términos en la serie.

Posteriormente, se plantearán las ecuaciones de reacción-difusión empleadas para modelar la difusión de nutrientes y oxígeno en la biopelícula.

2.3. Dinámica de transporte y consumo de nutrientes

Con el fin de modelar el transporte de nutrientes y oxígeno, con concentraciones S_S y S_O , se emplearon las ecuaciones de reacción-difusión. Las ecuaciones de reacción-difusión describen el comportamiento de sistemas químicos donde la difusión de partículas compite con la producción y/o degradación de partículas de la misma u otras especies debido a reacciones químicas.

Las ecuaciones de reacción-difusión que describen el transporte de nutrientes y oxígeno

se escriben como [13]:

$$\frac{\partial S_S}{\partial t} = D_S \left(\frac{\partial^2 S_S}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 S_S}{\partial y^2} \right) + r_S, \quad (2.7)$$

y

$$\frac{\partial S_O}{\partial t} = D_O \left(\frac{\partial^2 S_O}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 S_O}{\partial y^2} \right) + r_O, \quad (2.8)$$

donde D_S y D_O representan los coeficientes de difusión de los nutrientes y del oxígeno, mientras que r_S y r_O representan las tasas de consumo de nutrientes y oxígeno, y se expresan como:

$$r_S = -q_A \cdot X_A - q_D \cdot X_D \quad (2.9)$$

y

$$r_O = -(1 - Y_A)q_A \cdot X_A - (1 - Y_D)q_D \cdot X_D, \quad (2.10)$$

donde q_A y q_D son las tasas de consumo para bacterias activas e inactivas, X_A y X_D son las densidades locales de biomasa de células activas e inactivas respectivamente. Las células inactivas son aquellas que cuentan con un metabolismo reducido, por lo que consumen menos sustratos.

Las tasas de consumo q_A y q_D para bacterias activas e inactivas respectivamente, se definen como:

$$q_A = q_A^{max} \cdot \left(\frac{S_S}{S_S + K_S} \right) \cdot \left(\frac{S_O}{S_O + K_O} \right), \quad (2.11)$$

y

$$q_D = q_D^{max} \cdot \left(\frac{S_S}{S_S + K_S} \right) \cdot \left(\frac{S_O}{S_O + K_O} \right), \quad (2.12)$$

con q_A^{max} y q_D^{max} las tasas de consumo máximas de las bacterias activas e inactivas, respectivamente. En estas ecuaciones K_S es la constante de saturación media de los nutrientes y K_O es la constante de saturación media del oxígeno.

2.4. Percepción de cuórum

La percepción de cuórum es un mecanismo de comunicación bacteriana, mediante el cual se regula la densidad poblacional en las zonas más pobladas. Para modelar este proceso de comunicación bacteriana, se tomaron como referencia [26],[27]. En esta tesis se considera el acoplamiento de la expresión del gen a la sobrevivencia y muerte celular usando señalización paracrina (célula a célula). De esta forma se controla la dinámica de crecimiento de la población a pesar de la variabilidad en el comportamiento de las células individuales. El crecimiento de la población está regulada mediante la molécula de señalización N-acil homoserina lactona (AHL), que se acumula en el medio conforme aumenta la concentración celular. Al alcanzar una concentración suficientemente alta, se induce la expresión del gen *lacZa-ccdB* que codifica una proteína de fusión de LacZa y CcdB, que se representa con E y cuya concentración se denota por C^E . La población celular muere en proporción directa a la concentración C^E , con una constante de proporcionalidad κ , que es la constante cinética de la proteína reguladora de la proliferación bacteriana. Debido a que las bacterias producen las proteínas LacZa y CcdB, se puede considerar que la distribución espacial de la proteína en el entorno de una bacteria es aproximadamente constante, de tal forma que el flujo $J = \nabla C^E \approx 0$.

Considerando lo anterior, las ecuaciones cinéticas que describen los procesos de producción y degradación de la proteína AHL y E son:

$$\frac{dC^A}{dt} = \nu_A N - d_A C^A, \quad (2.13)$$

y

$$\frac{dC^E}{dt} = k_E C^A - d_E C^E, \quad (2.14)$$

donde $C^A(x, y, t)$ es la concentración de AHL, ν_A es la tasa específica de producción de AHL, $\nu_A N$ es la tasa de producción de AHL, proporcional a la densidad celular $N(x, y, t)$, y d_A es la tasa de degradación de AHL. En la ecuación 2.14, se considera que la tasa de producción de la proteína reguladora es proporcional a la concentración de AHL, con una tasa constante k_E , mientras que la proteína reguladora se degrada a una tasa d_E . La tasa

de mortalidad de las bacterias se describe por la siguiente ecuación:

$$\frac{dN}{dt} = N - \kappa C^E N, \quad (2.15)$$

donde κ es la tasa de muerte celular que regula la proliferación bacteriana. Esta ecuación se implementa en cada celda de la malla de simulación como se describe en la sección 3.3 y conduce a la ecuación en diferencias finitas 3.13 .

Capítulo 3

Implementación numérica

En el presente capítulo, se describen los diferentes algoritmos numéricos que se emplearon para resolver las ecuaciones diferenciales planteadas en el capítulo anterior. Estas describen: procesos de difusión, mecanismo de percepción de cuórum y crecimiento de la biopelícula.

3.1. Ecuación de difusión en diferencias finitas

Para resolver las ecuaciones de transporte de nutrientes y oxígeno (ecuaciones 2.7 y 2.8), se usó el método de diferencias finitas adelantadas en la primera derivada con respecto al tiempo y de diferencias finitas centradas en la segundas derivadas con respecto a las coordenadas. En los siguientes párrafos se explica el método de diferencias finitas aplicado a la solución numérica de la ecuación de difusión en una dimensión con condiciones de frontera del tipo Dirichlet. Se analizó la precisión y estabilidad de las soluciones numéricas comparándolas con las correspondientes soluciones analíticas.

Por simplicidad el análisis se realizará en la ecuación de difusión en una dimensión y con condiciones de frontera del tipo Dirichlet. Esta última se escribe como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right), \quad (3.1)$$

donde $C(x, t)$ es la concentración, D es el coeficiente de difusión, y la solución se calcula

en el dominio normalizado a una longitud o distancia característica L . Por lo anterior, se introduce la distancia normalizada o reducida $0 \leq \tilde{x} = x/L \leq 1$, y el tiempo reducido $t = \sqrt{L/D}$, $t \geq 0$, condiciones de frontera tipo Dirichlet,

$$C(\tilde{x} = 0, t) = 0, \text{ y } C(\tilde{x} = 1, t) = 0, \quad (3.2)$$

y condición inicial

$$C(\tilde{x}, t = 0) = f(\tilde{x}).$$

donde $f(\tilde{x})$ es una función de la coordenada reducida. De ahora en adelante se omitirá la tilde en la posición y se entenderá que se trata de la coordenada reducida.

Para calcular la solución numérica se define una malla o retícula en el plano (x, t) donde el eje horizontal representa la coordenada x y el eje vertical t representa el tiempo. Las coordenadas de los puntos en la retícula están definidas como:

$$x_i = i \cdot h, \text{ donde } i = 0, 1, 2, \dots \quad (3.3)$$

$$t_j = j \cdot k, \text{ donde } j = 0, 1, 2, \dots, \quad (3.4)$$

en estas expresiones (h, k) se definen como: $h = \Delta x$ y $k = \Delta t$, y representan los tamaños de las particiones en las coordenadas (x, t) .

Se denota por $C_{i,j}$ la concentración de los nutrientes en el punto de coordenadas (x_i, t_j) . El cambio en el tiempo, $\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = C_t$, de esta cantidad se calcula usando diferencias finitas adelantadas:

$$C_t \approx \frac{C_{i,j+1} - C_{i,j}}{k}, \quad (3.5)$$

La segunda derivada de la concentración con respecto a la posición, $\frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} = C_{xx}$, se aproxima usando la aproximación de diferencias finitas centradas:

$$C_{xx} \approx \frac{C_{i+1,j} - 2C_{i,j} + C_{i-1,j}}{h^2}, \quad (3.6)$$

De acuerdo con lo anterior, la ecuación de difusión discretizada, Ec. 3.1, usando diferencias finitas se escribe como:

$$\frac{C_{i,j+1} - C_{i,j}}{Dk} = \frac{C_{i+1,j} - 2C_{i,j} + C_{i-1,j}}{h^2}. \quad (3.7)$$

que se reescribe en la forma conveniente para realizar el proceso iterativo en el tiempo:

$$C_{i,j+1} = rC_{i-1,j} + (1 - 2r)C_{i,j} + rC_{i+1,j}. \quad (3.8)$$

donde r es el parámetro de estabilidad [8] que se define por:

$$r = \frac{Dk}{h^2} = \frac{D\Delta t}{(\Delta x)^2}. \quad (3.9)$$

La solución numérica de la ecuación de difusión que describe la evolución de la concentración como función de la posición y del tiempo se obtienen iterando la ecuación (3.8).

Las soluciones numéricas de la ecuación de difusión en dos y tres dimensiones espaciales con condiciones de frontera requeridas se obtienen haciendo las correspondientes adecuaciones y generalizaciones de las ecuaciones (3.7, 3.8).

Las soluciones numéricas de las ecuaciones de transporte (2.7) y (2.8), descritas en la sección 2.3 se obtienen realizando un procedimiento análogo, incluyendo los correspondientes términos cinéticos de producción y consumo.

3.2. Estabilidad de las soluciones numéricas

En esta sección se analiza la estabilidad de las soluciones numéricas en términos del parámetro de estabilidad, r , definido en la ecuación 3.9. Para ello se considera la ecuación de difusión en una dimensión (3.1) con condiciones de frontera (3.2) y condición inicial:

$$C(x, t = 0) = f(x) = \text{sen}(2\pi x) - \text{sen}(5\pi x).$$

La solución analítica que cumple con la condición inicial y la condición de frontera se

escribe como:

$$C(x, t) = e^{-4\pi^2 t} \text{sen}(2\pi x) - e^{-25\pi^2 t} \text{sen}(5\pi x).$$

La ecuación de difusión con la condición inicial y la condición de frontera se resolvió numéricamente usando la ecuación (3.8) para dos valores distintos del parámetro de estabilidad r . Se demostrará que cuando $r < 0.5$ las soluciones numéricas son estables mientras que cuando $r > 0.5$ son inestables [8]. Los resultados de la comparación de las soluciones numéricas, –puntos–, y analítica, –líneas–, cuando $r < 0.5$ se muestran en la figura 3.1.

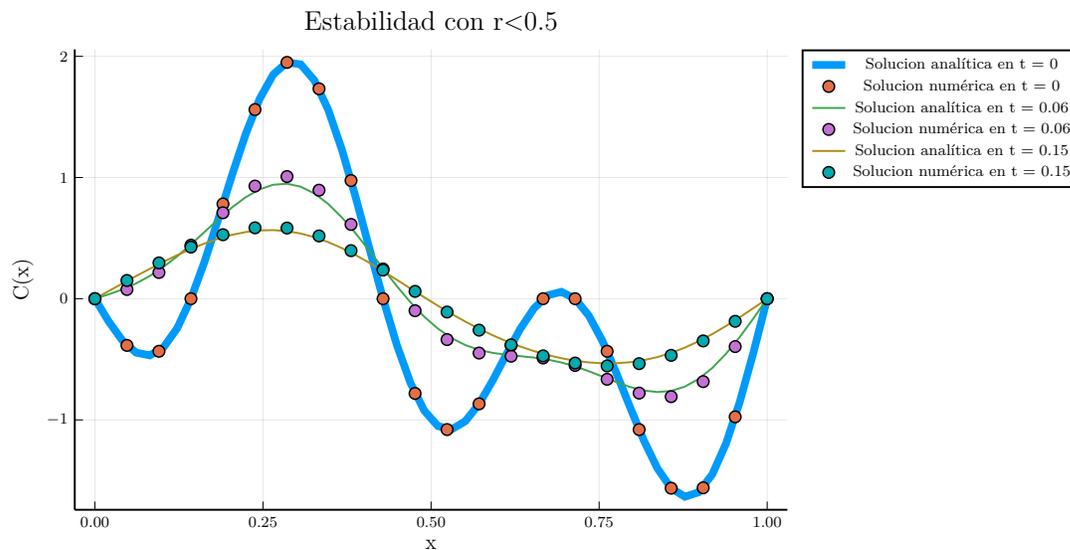


Figura 3.1: Solución de ecuación de difusión con el parámetro de estabilidad $r < 0.5$.

Se observa que en este caso las soluciones numéricas aproximan muy bien las soluciones analíticas para los tres tiempos diferentes en los que se calculó la solución.

Sin embargo, se observa en la Fig. 3.2, que cuando $r > 0.5$, las soluciones numéricas se separan de las soluciones analíticas. Esto se debe a que en la ecuación 3.8 el factor de relación del paso siguiente de tiempo con el actual, es de $1 - 2r$, por lo que, cuando $r > 0.5$, se obtiene $1 - 2r < 0$.

La estabilidad numérica se refiere a cómo los errores introducidos durante la ejecución de un algoritmo afectan al resultado. Es una propiedad del algoritmo más que del problema que se está resolviendo. Se supondrá que los errores bajo consideración son errores de

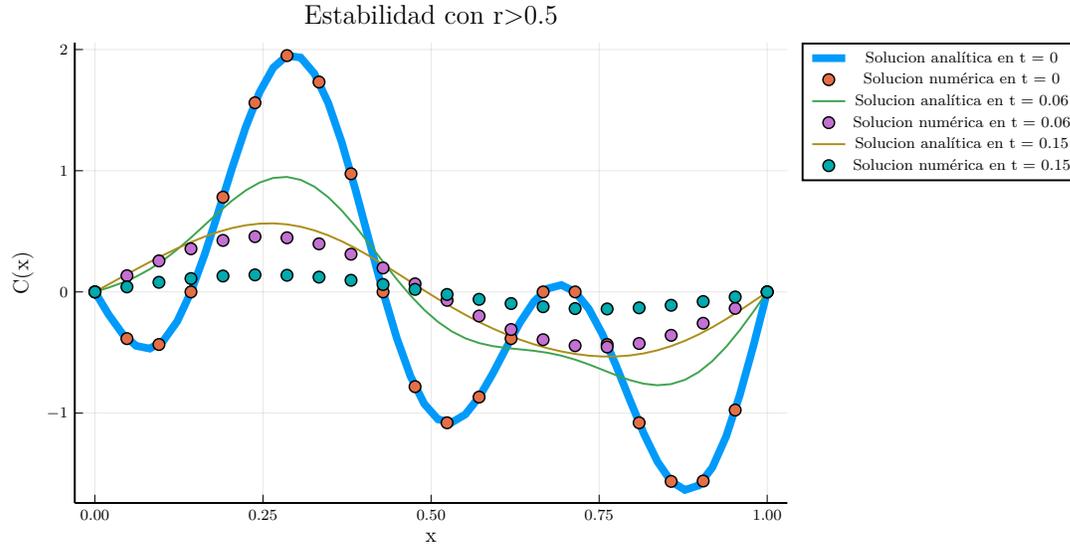


Figura 3.2: Solución de ecuación de difusión con el parámetro de estabilidad $r > 0.5$.

redondeo, pero en principio los errores pueden ser de cualquier fuente.

Del análisis anterior se concluye que por el método de diferencias finitas se obtiene una solución numérica estable cuando $r \leq 0.5$. Usando la condición de estabilidad 3.9 se obtiene la siguiente expresión para un incremento máximo en el tiempo $(\Delta t)_{\max}$ para que la solución numérica sea estable.

$$(\Delta t)_{\max} = \frac{(\Delta x)^2}{2D}. \quad (3.10)$$

Es decir, las soluciones numéricas serán estables siempre que se elija un incremento en el tiempo que sea menor al indicado en la ecuación 3.10. Es importante observar que de acuerdo con la ecuación 3.10 el incremento en el tiempo está directamente relacionado con el cuadrado del incremento en la coordenada espacial.

3.3. Algoritmo para la percepción de cuórum

Como se explicó en la sección 1.1.2 el mecanismo de percepción de cuórum regula la expresión génica en respuesta a las fluctuaciones en la densidad de población celular. Es decir, es un proceso de señalización celular que regula la tasa de muerte celular, y por tanto, controla el crecimiento de las biopelículas de acuerdo con la disponibilidad o escasez de

nutrientes y a las condiciones de estrés ambiental. Por ejemplo, las condiciones ambientales cambian si están presentes desinfectantes, antibióticos o un proceso de colonización por otras bacterias.

La cinética del proceso de regulación de percepción de cuórum se describe localmente por las ecuaciones 2.13 y 2.14. Es importante notar que en el modelo se tienen tres escalas de tiempo diferentes, la de reproducción de las bacterias que es del orden de minutos, la de la cinética de la percepción de cuórum que es del orden de horas y la del proceso difusivo de nutrientes y oxígeno que es del orden de días. De acuerdo con lo anterior, la concentración de proteínas asociadas con la percepción de cuórum tiene variaciones más rápidas comparadas con los cambios en el tiempo de las concentraciones de nutrientes. Por lo tanto, las concentraciones de nutrientes y oxígeno no aparecen explícitamente en las ecuaciones 3.11 y 3.12 porque permanecen constantes en las celdas de la malla.

Para obtener la solución numérica a estas ecuaciones se usa el método de diferencias finitas centradas y para ello se genera una malla cuadrada de tamaño $n \times n$. Cada nodo de la malla tiene asignado un valor de las concentraciones C^A y C^E de las proteínas AHL y de las proteínas fusionadas LacZa y CcdB, respectivamente. Esta última proteína se denota por E , e induce la expresión del gene *LacZa* y *CcdB* que controla la la tasa de muerte celular en cada nodo de la malla al tiempo t . Estas concentraciones se calculan mediante las siguientes ecuaciones en diferencias finitas:

$$C_{i,j,t+1}^E = C_{i,j,t}^E + k_E C_{i,j,t}^A - d_E C_{i,j,t}^E, \quad (3.11)$$

y

$$C_{i,j,t+1}^A = C_{i,j,t}^A + \nu_A N_{i,j,t} - d_A C_{i,j,t}^A. \quad (3.12)$$

Recordando que k_E es la tasa de producción de la proteína reguladora, ν_A es la tasa de producción específica de AHL, d_E es la tasa de degradación de la proteína reguladora y d_A es la tasa de degradación de AHL.

Para una densidad local de bacterias, $N(x_i, y_j, t)$ en el nodo (x_i, y_j) al tiempo t se aplica el mecanismo de regulación descrito por las ecuaciones 2.13 y 2.14, obteniendo la siguiente

ecuación en diferencias finitas:

$$N_{i,j,t+1} = N_{i,j,t} - \kappa C^E N_{i,j,t}, \quad (3.13)$$

donde κ representa la tasa de muerte celular. En las zonas de la biopelícula con mayor densidad de bacterias, aumenta la expresión de AHL dando lugar al proceso de regulación que incrementa la concentración de la proteína E dando lugar a un aumento en la tasa de muerte celular, controlando de esta forma el crecimiento de la biopelícula.

3.4. Parámetros de las simulaciones

Los valores de los parámetros que aparecen en las ecuaciones de transporte de nutrientes necesarios para describir la evolución de la biopelícula fueron extraídos de [13] y los correspondientes a la dinámica de percepción de cuórum de [27]. Estos se presentan en la tabla 3.1.

Parámetro	Valor	Unidades
n	200	-
t	50	-
D_S	0.0000045	$\text{m}^2/\text{día}$
D_O	0.0002	$\text{m}^2/\text{día}$
Y_A	0.5	gCOD/gCOD
Y_D	0	gCOD/gCOD
q_A^{max}	75	$(\text{gCOD}/\text{gCOD})/\text{día}$
q_D^{max}	15	$(\text{gCOD}/\text{gCOD})/\text{día}$
K_O	0.35	g/m^3
K_S	20	gCOD/m^3
d_A	0.639	h^{-1}
d_E	2	h^{-1}
k_E	5	h^{-1}
ν_A	4.8×10^{-7}	nM ml h^{-1}

Tabla 3.1: Parámetros del modelo, extraídos de [13] y [27].

Las unidades gCOD miden la cantidad de oxígeno empleado o consumido expresada en gramos, y las letras COD se refieren a la demanda química de oxígeno, por sus siglas en inglés “chemical oxygen demand”.

3.5. Características generales de la simulación

Para crecer la biopelícula se considera una malla bidimensional donde se define una matriz cuadrada de tamaño $n \times n$ con entradas 0 o 1 que indican la ausencia o presencia de bacterias en cada una de las celdas. Se establece un punto de crecimiento inicial con coordenadas (i, j) y se le asigna la entrada 1, indicando la presencia de una bacteria. En este modelo bidimensional, la bacteria tiene 8 celdas vecinas cercanas, –cuatro en la dirección de las diagonales, dos a los lados, una arriba y la otra abajo– hacia las cuales se puede reproducir y depositar una nueva bacteria. Para modelar el crecimiento de la biopelícula se introducen condiciones de frontera periódicas en la dirección horizontal. Estas condiciones de frontera corresponden al crecimiento de una biopelícula dentro o alrededor de un tubo cilíndrico, como el que se muestra en la figura 3.3.

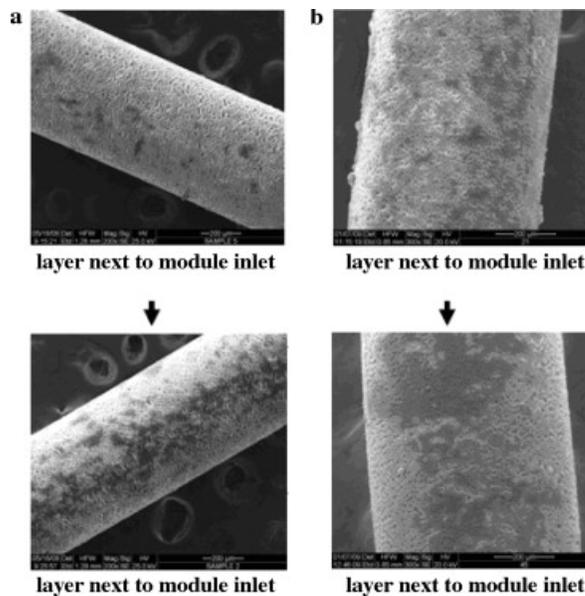


Figura 3.3: Crecimiento bacteriano alrededor de un tubo. La imagen se obtuvo de la referencia [14].

En cada iteración, el algoritmo analiza primero las celdas vacías alrededor de cada bacteria y genera un arreglo con el número de espacios disponibles.

Por otra parte, el proceso de proliferación en las fronteras ocurre de acuerdo con las siguientes reglas:

- Fronteras laterales

Cuando la biopelícula llega a un extremo lateral del plano, debido a las condiciones de frontera periódicas, comienza su crecimiento en el extremo opuesto.

- Fronteras superior e inferior

El oxígeno y los nutrientes se obtienen a través de un canal de irrigación localizado en la frontera superior y se distribuyen a través de todo el espacio que ocupa la biopelícula mediante un proceso difusivo.

El algoritmo propuesto es muy eficiente, ya que la proliferación sólo opera en las bacterias que tienen lugares vecinos vacíos.

Para mantener un registro de cada bacteria en las simulaciones, se definió un nuevo tipo de variable dinámica denominado Bacteria y los valores asignados cambian en cada iteración. La información que contiene este tipo de variable dinámica es la siguiente:

- Número que identifica a la bacteria.
- Edad (medida en unidades del tiempo de simulación)
- Posición definida por las coordenada (i, j)
- Concentración de nutrientes consumidos
- Concentración de oxígeno consumido
- Masa

Con esto en mente, a cada bacteria se le asocia una masa, coordenadas y edad, valores a los que se puede acceder y actualizar en cualquier momento de la simulación. Para ello, se genera un arreglo donde cada entrada está asociada con una y sólo una de las bacterias.

La información de las concentraciones de nutrientes y oxígeno consumidos se obtiene como una función de la posición (i, j) y del tiempo t a partir de las soluciones de las ecuaciones 2.9 y 2.10, respectivamente. La masa de cada bacteria es la suma de las masas inicial y la de los nutrientes consumidos.

3.6. Modelos de reproducción bacteriana

Para modelar el crecimiento de la biopelícula se consideran dos modelos básicos de reproducción bacteriana. En el primer modelo básico (A), las bacterias se reproducen en todo momento independientemente de su masa, mientras que en el segundo modelo básico (B) las bacterias se reproducen al alcanzar una masa crítica. En el primer modelo se consideran dos casos: (A1) la bacteria hija ocupa el vecino más cercano eligiéndolo de forma aleatoria; (A2) la bacteria hija ocupa el vecino más cercano con mayor concentración de nutrientes. En el segundo modelo básico (B) también se consideran dos casos: (B1) la bacteria hija ocupa el vecino más cercano eligiéndolo aleatoriamente; (B2) la bacteria hija ocupa el vecino más cercano con mayor concentración de nutrientes.

Primero se estudió el crecimiento de la biopelícula usando los modelos de reproducción bacteriana A1, A2 y B1 sin considerar la percepción de cuórum. Posteriormente, se estudió el crecimiento de la biopelícula usando los modelos de reproducción bacteriana B1 y B2 e incorporando un mecanismo cinético de percepción de cuórum. En la figura 3.4 se muestra un diagrama que resume los mecanismos de crecimiento de la biopelícula.

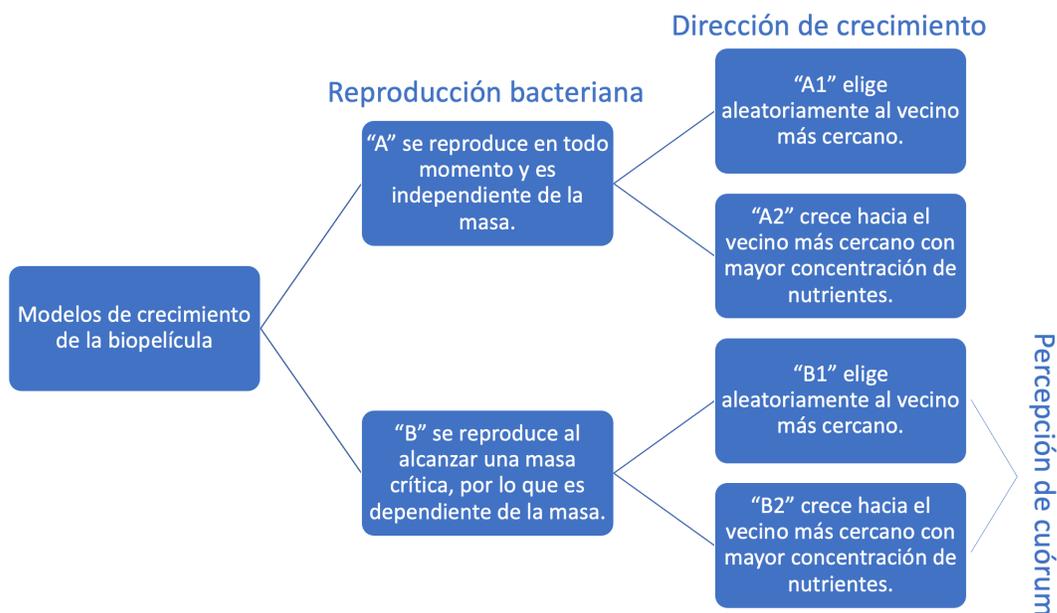


Figura 3.4: Modelos de crecimiento de la biopelícula.

Adicionalmente, en la sección 4.5 se analizaron dos mecanismos de latencia o inacti-

vación bacteriana en los modelos B1 y B2 sin considerar el mecanismo de percepción de cuórum.

3.6.1. Modelo A1

Las bacterias con vecinos disponibles eligen aleatoriamente una celda vacía para producir una bacteria adicional, lo que produce un crecimiento de la biopelícula. La biopelícula deja de crecer cuando ya no existen espacios disponibles para que las bacterias se reproduzcan. Se encontró que para crecer el interior de la biopelícula se requieren más de 100 iteraciones. De esta forma se tiene un crecimiento “aleatorio”, lo que evita una dirección privilegiada de crecimiento.

3.6.2. Modelo A2

En este modelo la bacteria hija se coloca en la celda vecina vacía que tiene una mayor concentración local de nutrientes. La bacteria no se reproduce si no tiene vecinos cercanos disponibles.

3.6.3. Modelo B1

En este modelo las bacterias que se pueden reproducir son aquellas que alcanzan una masa crítica M_C . Cada bacteria tiene una masa inicial M_0 , que crece al consumir nutrientes y oxígeno de acuerdo con la siguiente ecuación

$$M(x, y) = \int_{M_0}^M Y_A \cdot r_s(x, y, t) dt \quad (3.14)$$

donde Y_A es la tasa de aprovechamiento de nutrientes y r_s es la tasa de consumo local de nutrientes de cada bacteria. Al alcanzar la masa M_C , la bacteria se reproduce y el producto se coloca aleatoriamente en una de las celdas vecinas cercanas que está vacía. La bacteria no se reproduce si no tiene vecinos cercanos disponibles.

3.6.4. Modelo B2

En este modelo las bacterias que se pueden reproducir son aquellas que alcanzan una masa crítica M_C , como en el modelo B1. Al alcanzar la masa crítica, la bacteria se reproduce y el producto se coloca en una de las celdas vecinas cercanas vacía que tiene una mayor concentración de nutrientes y oxígeno. La bacteria no se reproduce si no tiene vecinos cercanos disponibles.

Capítulo 4

Resultados

Como se mencionó al inicio del capítulo 2, en esta tesis se incorporaron las etapas (i), (iii) y (v) consideradas como las más importantes en el modelo de crecimiento de la biopelícula. A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos al aplicar los algoritmos numéricos descritos en la sección anterior.

4.1. Difusión de nutrientes y oxígeno

Con el fin de resolver numéricamente las ecuaciones de reacción-difusión, se implementó un algoritmo numérico basado en el método de diferencias finitas 3.1. Se definen condiciones iniciales y se aplican las condiciones de frontera para calcular la solución numérica como una función de la posición y del tiempo. Este algoritmo también funciona para problemas generales de reacción-difusión en dos dimensiones de la forma:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \right) + R(C), \quad (4.1)$$

con condiciones de frontera del tipo Neumann, Dirichlet, Robin y periódicas. $R(C)$ es la función que representa el término de reacción. Este término puede modelar las reacciones químicas o los procesos biológicos en un sistema definido.

Para probar el algoritmo numérico, primero se resolvieron independientemente las ecuaciones de difusión para los nutrientes y el oxígeno en una malla cuadrada de 500×500

celdas unitarias. Por lo anterior, $R(C) = 0$, obteniendo las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\partial S_S}{\partial t} = D_S \left(\frac{\partial^2 S_S}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 S_S}{\partial y^2} \right) \quad (4.2)$$

y

$$\frac{\partial S_O}{\partial t} = D_O \left(\frac{\partial^2 S_O}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 S_O}{\partial y^2} \right). \quad (4.3)$$

Como condición inicial se definió una distribución inicial aleatoria de nutrientes y oxígeno, donde sus concentraciones varían en los intervalos $0 \leq S_S \leq 100$ y $0 \leq S_O \leq 4$, respectivamente. Los intervalos en que varían las coordenadas x e y son $0 \leq x \leq L$, $0 \leq y \leq L$, y se considera la evolución del sistema para $t \geq 0$. Además, se aplicaron condiciones de frontera de Dirichlet en el lado superior ($S_S(x, L, t) = 100$ y $S_O(x, L, t) = 2$), de Neumann en el lado inferior ($\frac{\partial S_S(x, 0, t)}{\partial y} = 0$ y $\frac{\partial S_O(x, 0, t)}{\partial y} = 0$) y condiciones de frontera periódicas en los lados laterales. Las condiciones de frontera en el lado superior emulan un canal de irrigación para los nutrientes y para el oxígeno, manteniendo concentraciones constantes de nutrientes y de oxígeno. La condición de frontera de Neumann significa que no hay flujo a través del lado inferior. Las fronteras laterales periódicas simulan un sistema con geometría cilíndrica, por ejemplo un tubo. Los coeficientes de difusión se definieron en la tabla 3.1. El coeficiente de difusión del oxígeno es dos órdenes de magnitud mayor que el coeficiente de difusión de los nutrientes, por lo que se espera que el oxígeno se difunda con mayor rapidez. Los resultados de estos procesos de difusión se muestran en las figuras 4.1 y 4.2 para los tiempos $t = 5$, $t = 10$, $t = 100$ y $t = 1,000$. Es importante recordar que el tiempo se mide en unidades reducidas $t = \sqrt{L/D}$, por lo tanto es adimensional.

En la figura 4.1 se muestra el proceso de difusión de nutrientes, donde en los primeros dos cuadros, $t = 5$ y $t = 10$, se observa una difusión lenta de los nutrientes debido a que el coeficiente de difusión es muy pequeño. No obstante, en $t = 100$ se empieza a observar con más claridad una redistribución, mientras que al tiempo $t = 1,000$ la redistribución a través del espacio definido por el cuadrado es aún más clara. En esta última figura, es visible una franja angosta de color claro en el lado superior que representa a los nutrientes entrando al sistema por medio de un canal de irrigación. Para tiempos aún más largos que los anteriores, los nutrientes tienden a distribuirse más hasta eventualmente alcanzar un

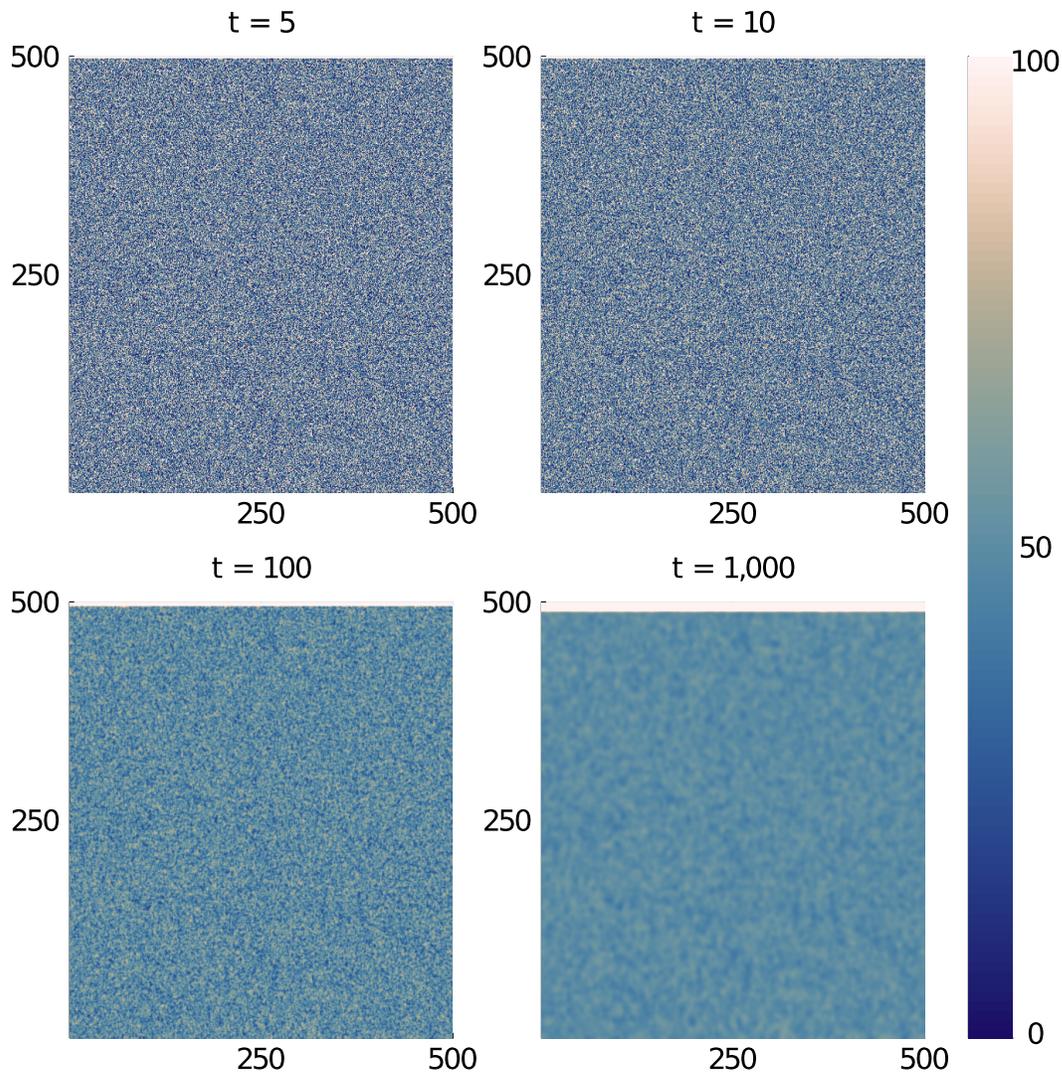


Figura 4.1: Difusión de nutrientes en un medio de dos dimensiones. El tiempo al que corresponde cada imagen se indica en la parte superior de cada cuadro.

estado estacionario.

Al simular el proceso difusivo del oxígeno, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 4.2 a los tiempos $t = 5$, $t = 10$, $t = 100$ y $t = 1,000$. Se observa una redistribución espacial del oxígeno más rápida que la de los nutrientes, debido a la diferencia en sus coeficientes de difusión. En los primeros dos cuadros, $t = 5$ y $t = 10$, la distribución del oxígeno es comparable con la distribución de los nutrientes a los tiempos $t = 100$ y $t = 1,000$. En $t = 100$, la redistribución a través del espacio definido por el cuadrado es clara y la franja cercana al canal de irrigación comienza a ser más notoria. En $t = 1,000$,

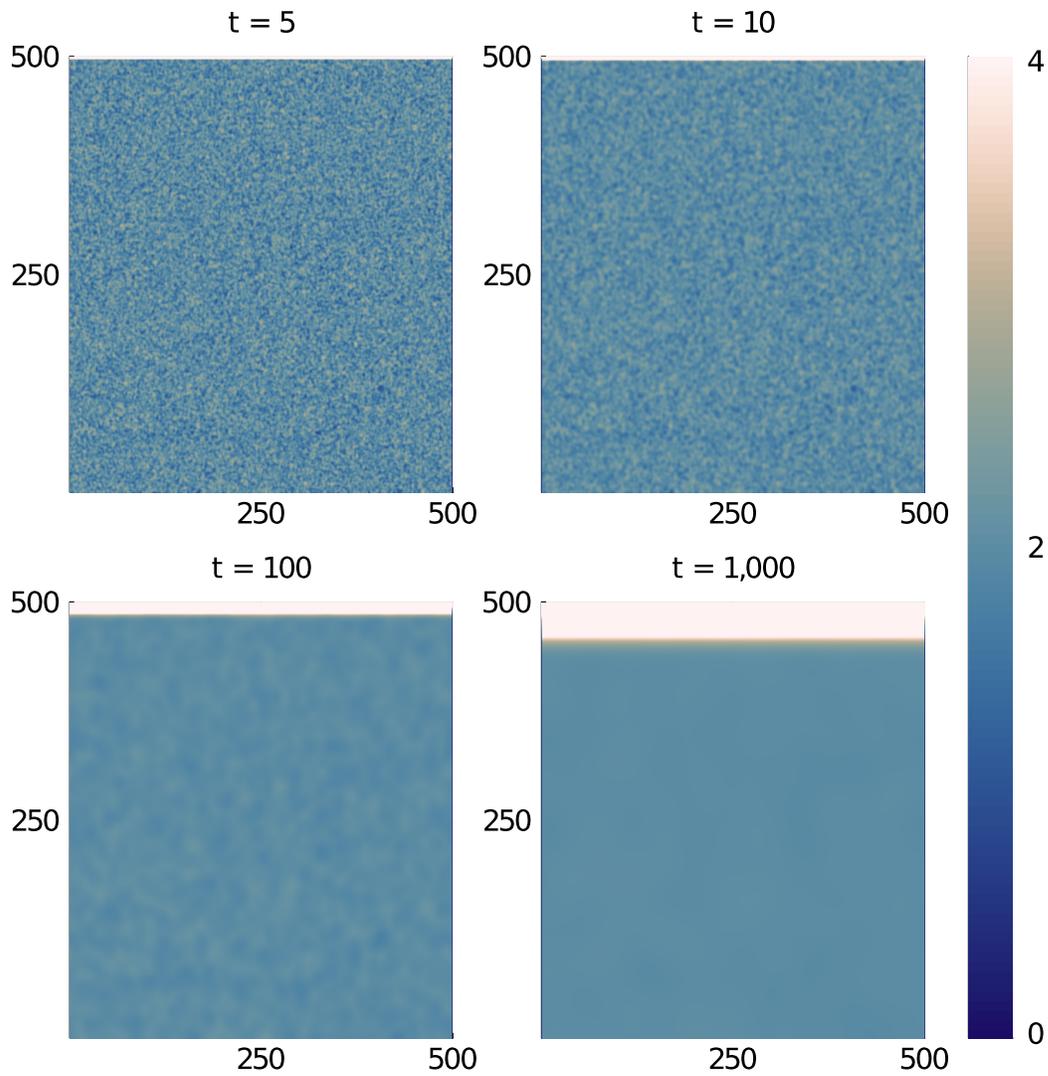


Figura 4.2: Difusión de oxígeno en un medio de dos dimensiones. El tiempo al que corresponde cada imagen se indica en la parte superior de cada cuadro.

el oxígeno se ha distribuido uniformemente en el espacio, excepto por una franja cercana al canal de irrigación donde la concentración es de aproximadamente 4 gCOD/m.

4.2. Consumo de nutrientes

En esta sección, se estudia la dinámica de consumo de nutrientes por un conjunto pequeño de bacterias, sin considerar el crecimiento de la biopelícula. La dinámica está descrita por las soluciones de las ecuaciones de reacción-difusión 2.7 y 2.8, junto con las

ecuaciones de consumo de nutrientes y oxígeno 2.9, 2.10, 2.11 y 2.12.

$$\frac{\partial S_S}{\partial t} = D_S \left(\frac{\partial^2 S_S}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 S_S}{\partial y^2} \right) + r_S,$$

donde el término de reacción $R(C) = r_S$, que es el consumo local de nutrientes, y

$$\frac{\partial S_O}{\partial t} = D_O \left(\frac{\partial^2 S_O}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 S_O}{\partial y^2} \right) + r_O,$$

con $R(C) = r_O$, que es el consumo local de oxígeno.

El algoritmo numérico de diferencias finitas para resolver estas ecuaciones se implementó en un código en Julia.

Como ejemplo se considera una malla de tamaño 500×500 con una concentración inicial de nutrientes distribuidos de forma aleatoria con valores entre 0 y 1, como se muestra en el panel superior izquierdo de la figura 4.3. Se aplican condiciones de frontera de Dirichlet en la parte superior ($S_S(x, L, t) = 2$), de Neumann en la parte inferior ($\frac{\partial S_S(x, L, t)}{\partial y} = 0$) y periódicas en los laterales. Con la finalidad de probar que el algoritmo de consumo de nutrientes es correcto, inicialmente se colocaron bacterias en las dos regiones cuadradas delimitadas por una línea de color verde y localizadas en las esquinas inferior izquierda y superior derecha del panel superior izquierdo de la figura 4.3. En los otros tres paneles de la figura 4.3 se muestra el consumo de nutrientes a tres tiempos posteriores. Los resultados de la dinámica de consumo al tiempo $t = 100$ muestran que en las dos regiones cuadradas donde hay bacterias, la concentración de nutrientes es menor que en el resto del plano. Conforme transcurre el tiempo, en $t = 150$ y $t = 200$, el consumo de nutrientes es más notorio en las dos regiones cuadradas con presencia de bacterias porque se observa un color más oscuro dentro del perímetro de la biopelícula indicando que la concentración de nutrientes está disminuyendo.

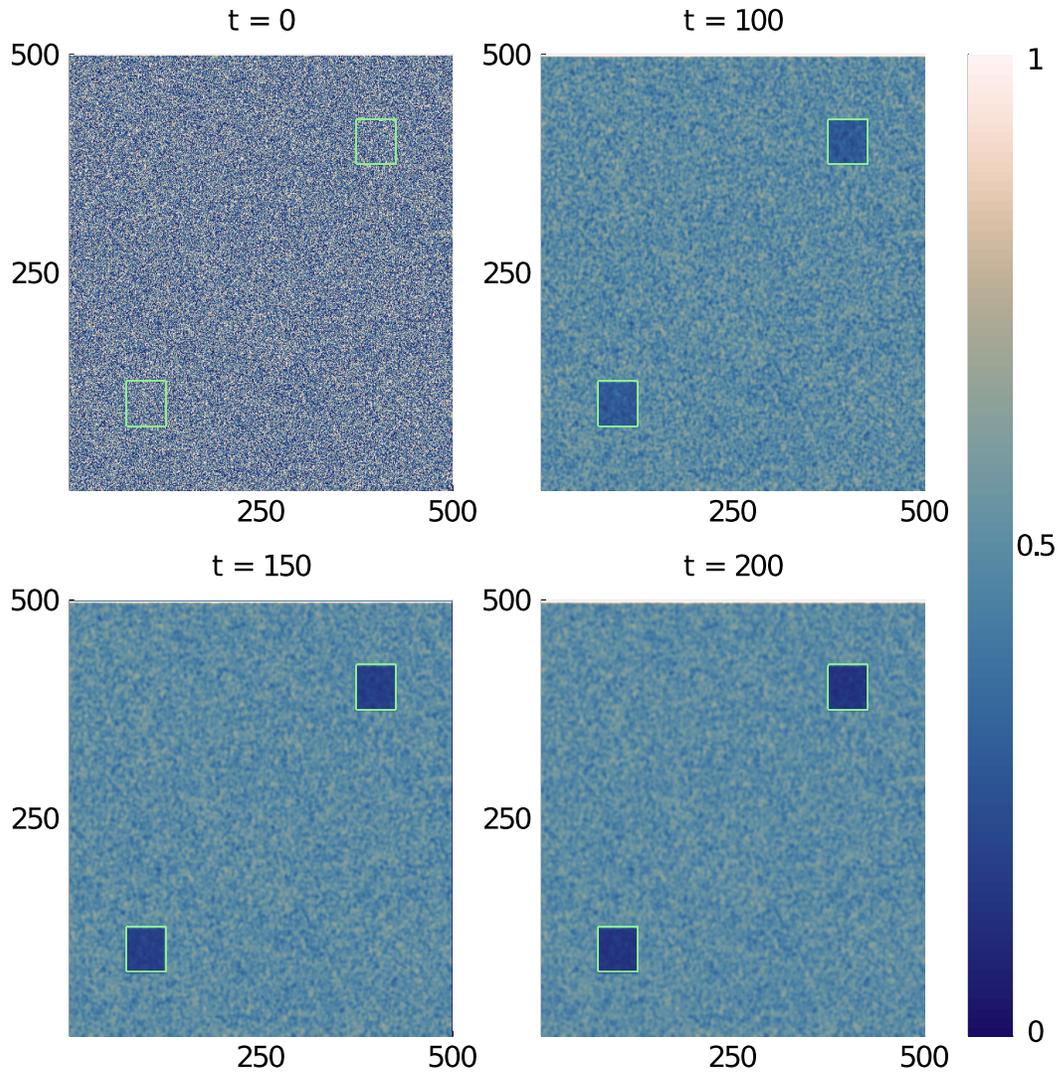


Figura 4.3: En la parte superior de cada figura se indica el tiempo al que corresponde la distribución de nutrientes. Los cuadros verdes muestran el perímetro de la región que contiene bacterias.

4.3. Modelos de consumo de nutrientes y oxígeno con crecimiento de la biopelícula

Tomando como base los procesos de difusión y consumo de nutrientes y oxígeno descritos en las secciones anteriores, en esta sección se plantean dos modelos diferentes que incluyen el crecimiento de la biopelícula basados en los modelos de reproducción bacteriana A1 y A2 en los que se aplicaron las siguientes condiciones de frontera:

- Condiciones periódicas y limitantes

El canal de irrigación se localiza en el lado superior y se simula con la condición de frontera de Dirichlet $C(x, L, t) = 2$. En el lado inferior no hay flujo, por lo que se definen condiciones de Neumann $\frac{\partial C(x, 0, t)}{\partial y} = 0$. En los lados laterales, se aplican condiciones de frontera periódicas.

- Condiciones de frontera periódicas en los cuatro lados

Se definen condiciones de frontera periódicas en los cuatro lados del cuadrado.

Para cada condición de frontera, se considerarán las siguientes cuatro distribuciones iniciales de bacterias:

- Una bacteria

Al inicio de la simulación, se coloca una bacteria en el centro del cuadrado de coordenadas (250, 250).

- Dos bacterias

Se colocan dos bacterias, una en la parte inferior izquierda y otra en la parte superior derecha con coordenadas (50, 50) y (350, 400).

- Tres bacterias

Se colocan tres bacterias, una en la esquina inferior izquierda, otra en la esquina inferior derecha y una última en la esquina superior derecha con coordenadas (50, 50), (450, 100) y (350, 450).

- Cuatro bacterias

Se colocan cuatro bacterias, cada una en una esquina del cuadrado con coordenadas (50, 50), (450, 400), (100, 400) y (400, 100).

Para mostrar el proceso de crecimiento de la biopelícula, se considera un plano de tamaño 500×500 con una concentración inicial aleatoria de nutrientes, que varía entre 0 y 1. Conforme pasa el tiempo, cada bacteria consume los nutrientes disponibles y se reproduce siguiendo el proceso que se describió en la sección 3.6.

Cabe recordar que la escala de tiempo de reproducción de las bacterias es mucho menor que la correspondiente al proceso de difusión de nutrientes y de oxígeno, por lo que la concentración de ambos se considera constante. Los resultados obtenidos de las simulaciones de cada uno de los modelos se presentan a continuación.

4.3.1. Modelo A1

En la figura 4.4a, se observa que el crecimiento de la biopelícula se da de forma semi-circular, ya que elige a uno de sus ocho vecinos pseudo-aleatoriamente. En las siguientes subsecciones, se describe cómo varía el crecimiento de la biopelícula dependiendo de las condiciones de frontera.

Condiciones periódicas y limitantes

Con condiciones de frontera periódicas en los laterales y limitantes en los extremos superior e inferior, se observa cómo, al llegar a un extremo lateral, la biopelícula sigue creciendo por el lado contrario. Esto no pasa con la frontera superior ni inferior, ya que en estas regiones no puede haber crecimiento. Al colocar más bacterias, como en las figuras 4.4b, 4.4c y 4.4d, el espacio se llena más rápido, por lo que se muestran resultados a tiempos más cortos.

Condiciones periódicas en los cuatro lados

A diferencia del caso anterior, en esta sección se consideran condiciones de frontera periódicas en los cuatro lados para el crecimiento de bacterias y para la difusión de nutrientes y de oxígeno. Debido a lo anterior, cuando la bacteria, nutriente u oxígeno llega a alguno de los lados del cuadrado, continúa creciendo o difundiéndose en el lado opuesto.

4.3.2. Modelo A2

En el segundo modelo, el crecimiento de la biopelícula ocurre generando un perímetro irregular ya que la biopelícula crece en la dirección donde hay una mayor concentración de nutrientes.

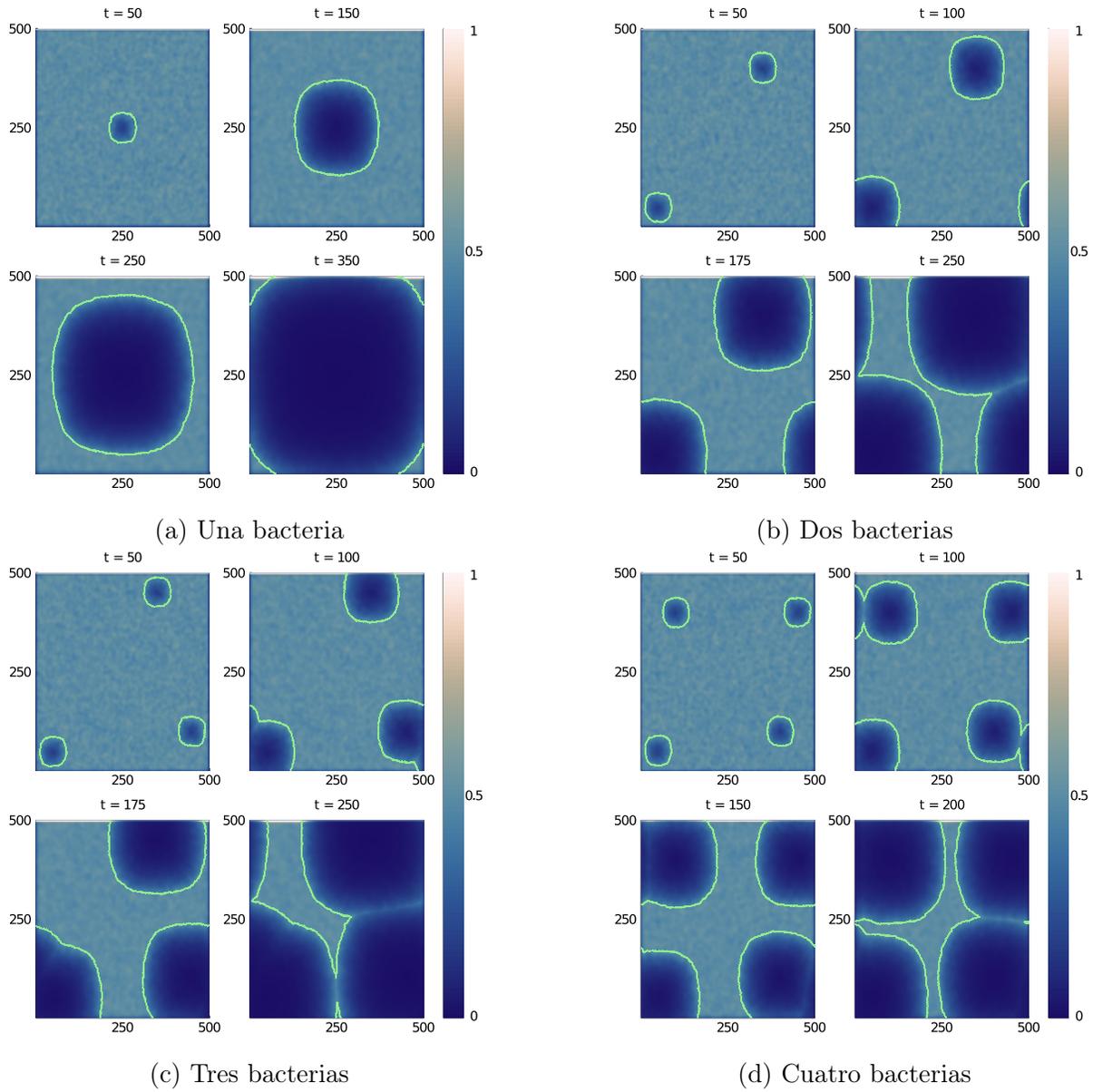


Figura 4.4: Crecimiento de la biopelícula con el modelo A1 y condiciones de frontera periódicas en los lados laterales y de Dirichlet y Neumann en los lados superior e inferior.

Condiciones periódicas y limitantes

En este caso, al llegar a uno de los lados laterales del cuadrado, la biopelícula sigue creciendo por el lado opuesto. Esto no pasa en los lados superior ni inferior, debido a las condiciones de frontera de Dirichlet y de Neumann.

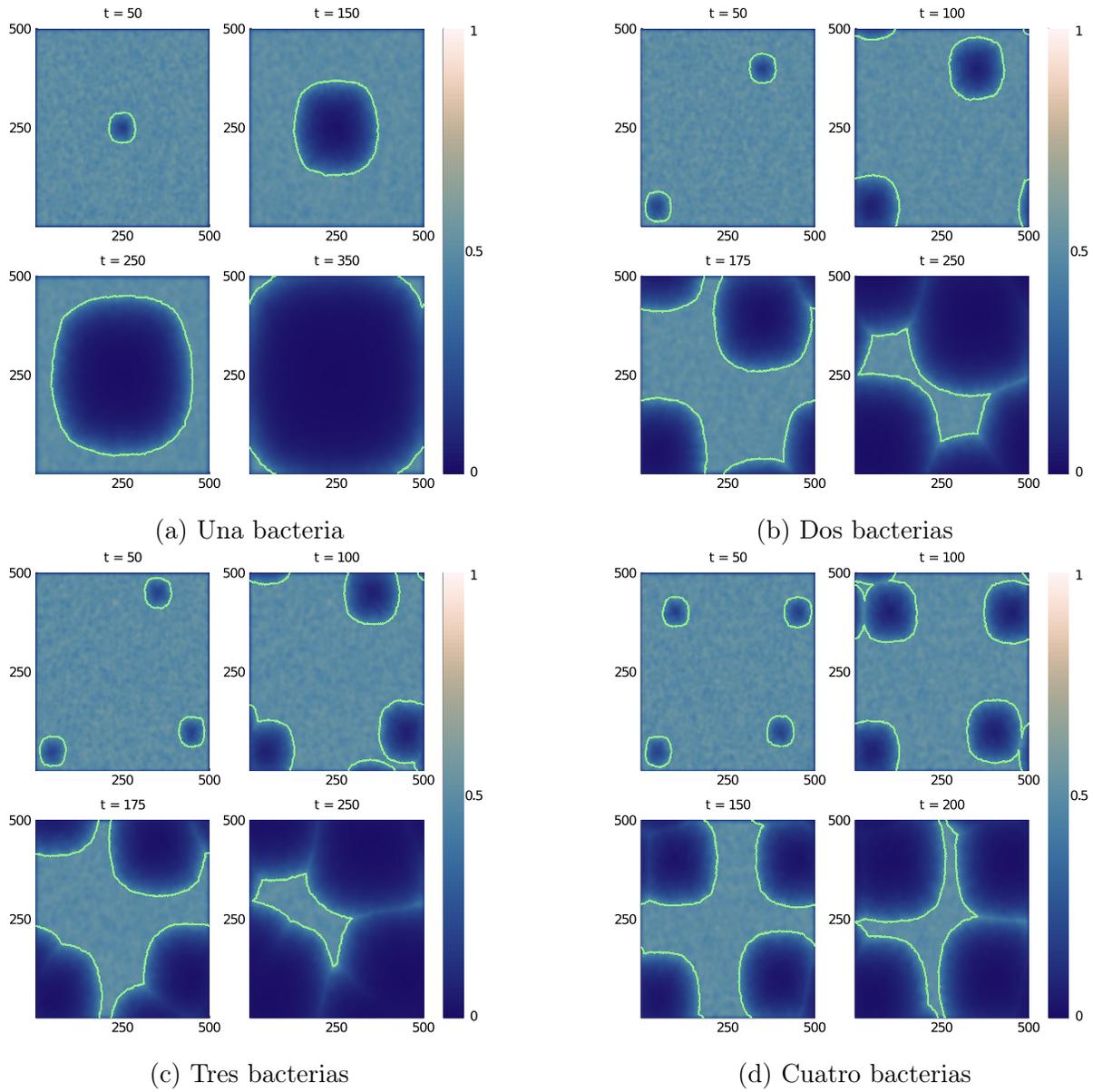


Figura 4.5: Crecimiento de la biopelícula con el modelo A1 y condiciones de frontera periódicas en los cuatro lados del cuadrado.

Condiciones periódicas en las cuatro fronteras

En este último caso, las condiciones de frontera para el crecimiento de bacterias y para la difusión de nutrientes y de oxígeno son periódicas en los cuatro lados, por lo que, al llegar a cualquier lado, continúan creciendo o difundiéndose en el lado opuesto.

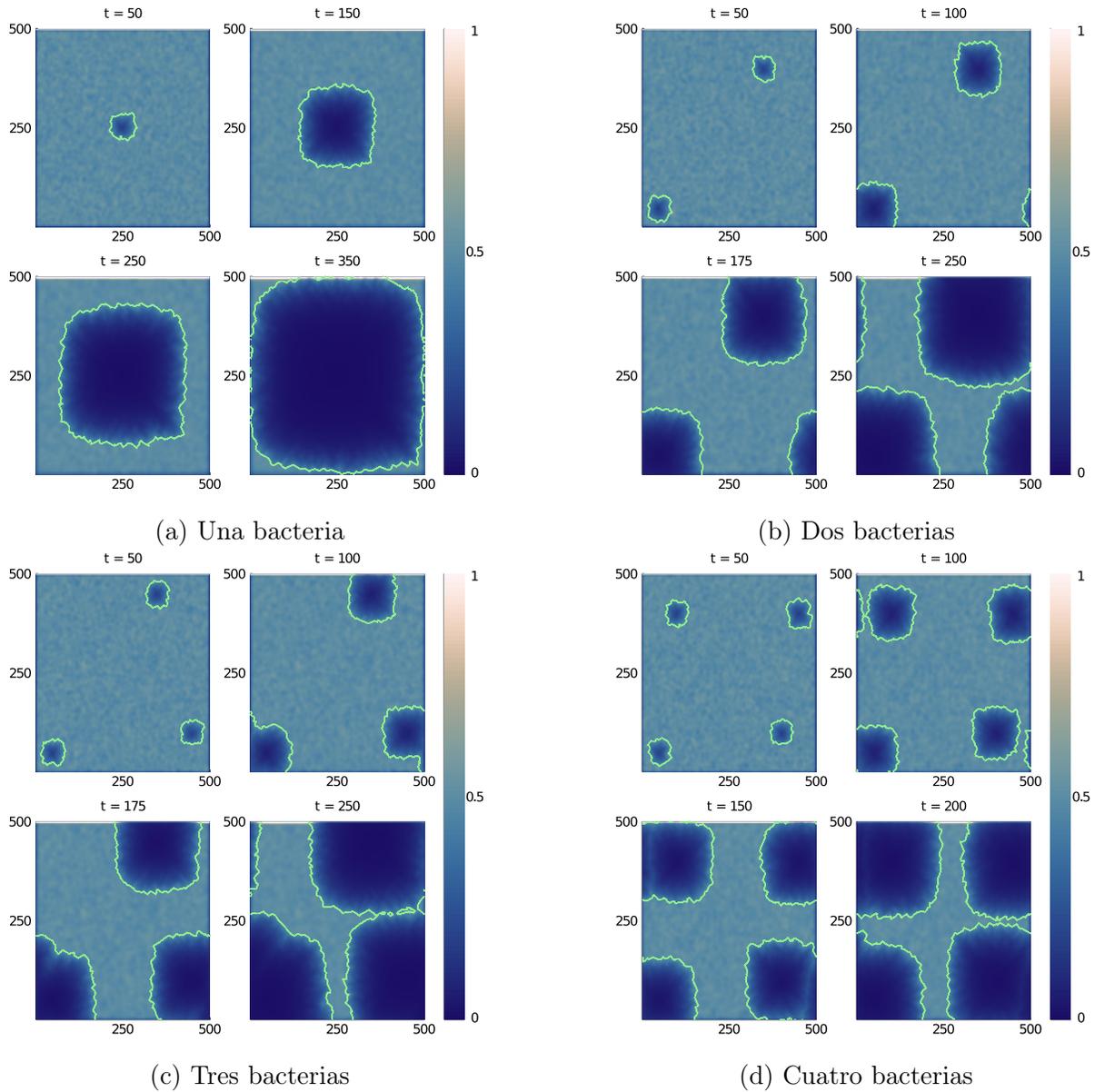


Figura 4.6: Crecimiento de la biopelícula con el modelo A2 y condiciones de frontera periódicas en los lados laterales y de Dirichlet y Neumann en los lados superior e inferior.

4.3.3. Modelo B1

Se propuso un modelo más elaborado, en el que cada bacteria se reproduce al alcanzar una masa crítica. Cada bacteria comienza con una masa inicial M_0 , que aumenta conforme consume nutrientes hasta alcanzar una masa crítica M_C , en la que se reproduce generando una bacteria “hija” que se coloca pseudo-aleatoriamente en uno de los espacios vecinos cercanos disponibles. Después de esta división la bacteria hija, así como la madre, tiene

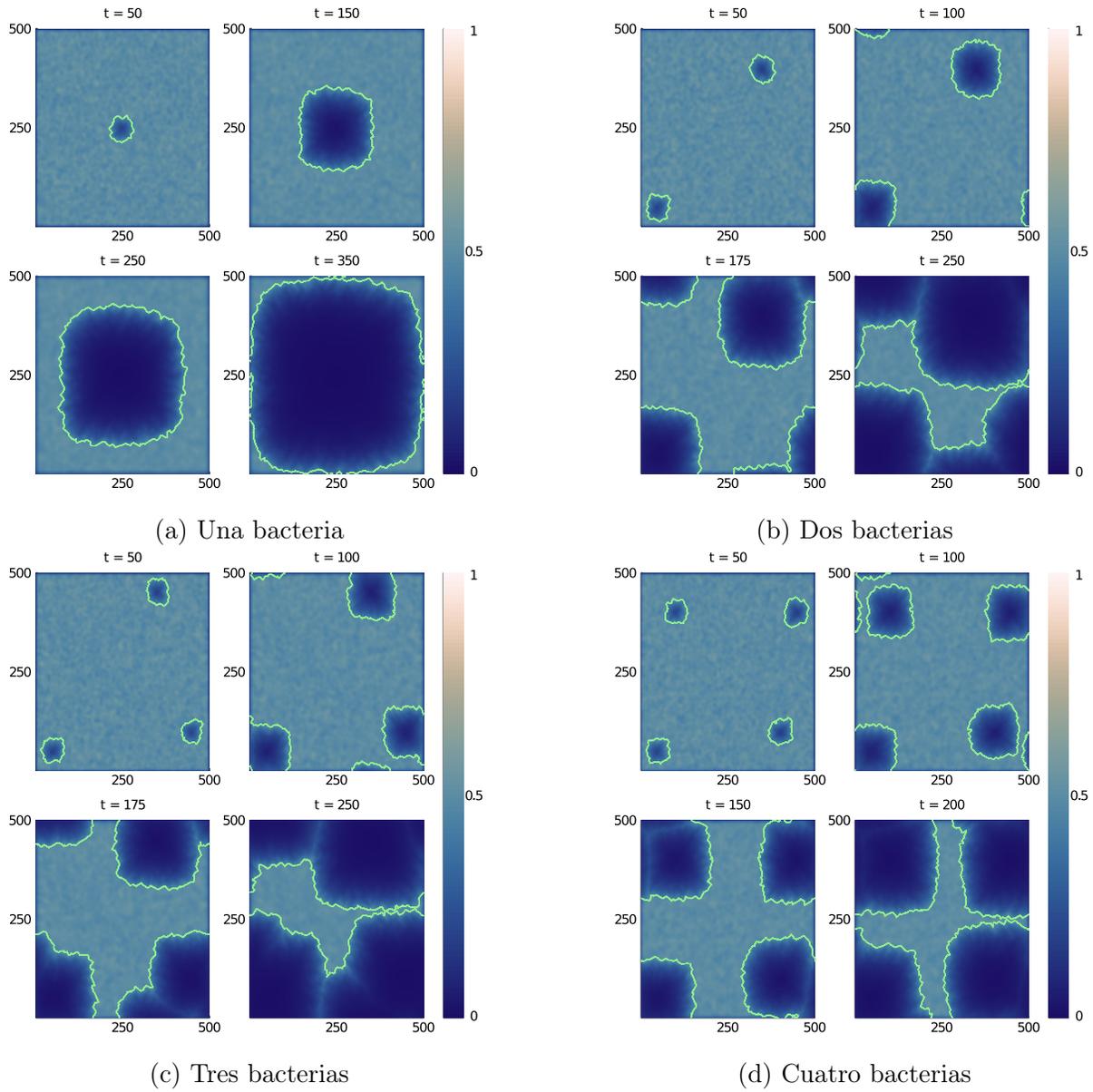


Figura 4.7: Crecimiento de la biopelícula con el modelo A2 y condiciones de frontera periódicas en los cuatro lados del cuadrado.

una masa M_0 .

Se realizaron varias simulaciones de donde se eligieron dos representativas en las que la concentración inicial de nutrientes C_i en el sistema está distribuida aleatoriamente en el espacio en los siguientes intervalos $0 \leq C_i \leq 25$ y $0 \leq C_i \leq 15$. Se colocó una bacteria inicial en las coordenadas $(250, 250)$ que corresponden al centro del plano. Los resultados se muestran y se describen a continuación:

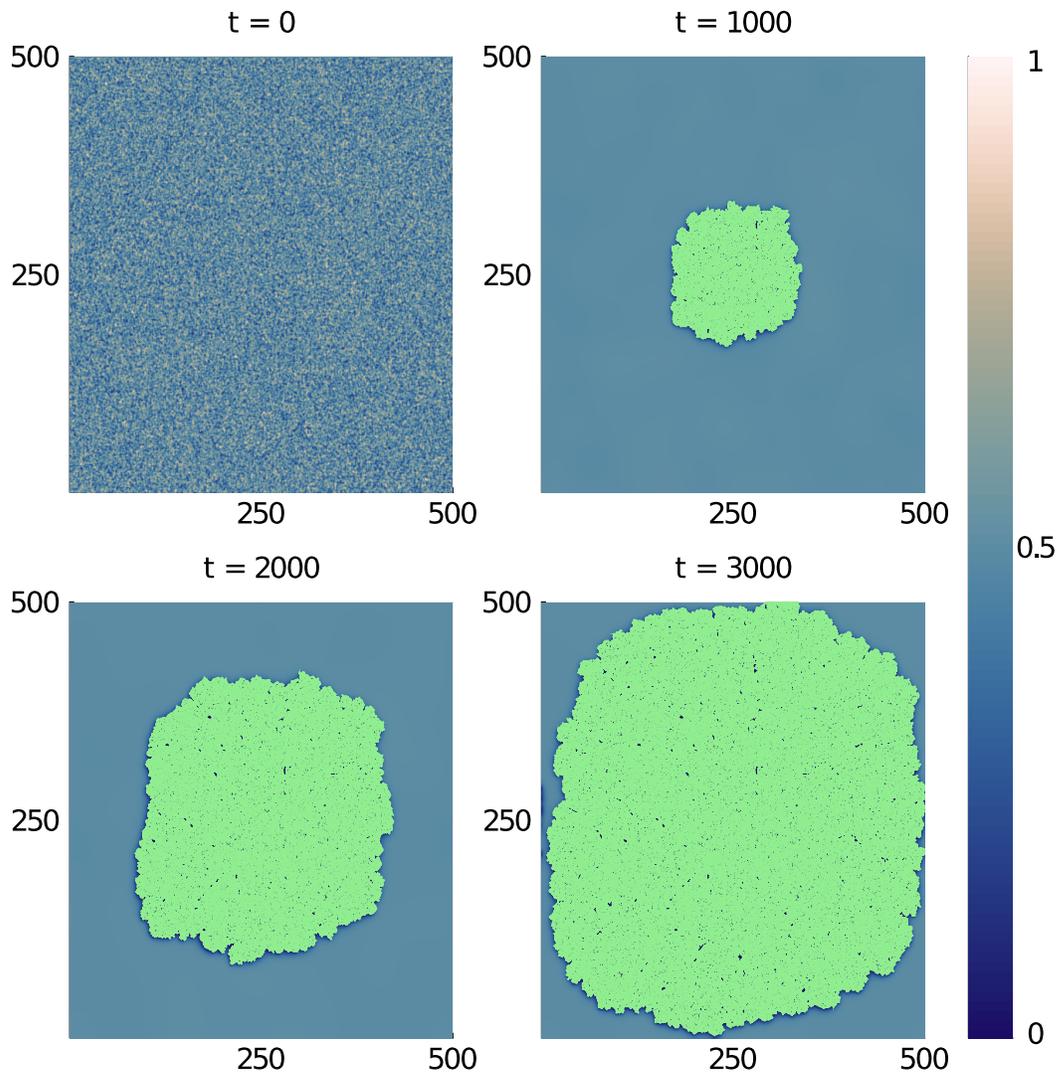


Figura 4.8: Modelo B1. La concentración inicial de nutrientes C_i varía entre $0 \leq C_i \leq 25$.

Los resultados de la simulación correspondiente a la distribución de concentraciones $0 \leq C_i \leq 25$ se muestran en la figura 4.8, a los siguientes cuatro tiempos $t = 0$, $t = 1,000$, $t = 2,000$ y $t = 3,000$. La distribución inicial de nutrientes en $t = 0$, así como la bacteria inicial marcada como un punto de color verde, se muestran en el cuadro superior izquierdo, donde se observa que los nutrientes están distribuidos aleatoriamente en todo el cuadro. En el cuadro correspondiente a $t = 1,000$, se observa que las bacterias han consumido nutrientes y en consecuencia la biopelícula ha crecido. Debido a lo anterior, en las regiones con presencia de bacterias, la concentración de nutrientes es baja. En el cuadro que corresponde al tiempo $t = 2,000$, se observa que la biopelícula continúa creciendo y es

notable la formación de pequeños huecos en su interior, que se identifican como manchas muy pequeñas de color oscuro. Finalmente, en el cuadro correspondiente a $t = 3,000$, la biopelícula ha llenado casi totalmente el espacio disponible, no obstante, el número de pequeños huecos en su interior ha aumentado. Estos resultados sugieren que la biopelícula crece formando una estructura fractal.

Los resultados correspondientes a la distribución de concentraciones $0 \leq C_i \leq 15$ se muestran en la figura 4.9 a los tiempos $t = 0$, $t = 3,000$, $t = 6,000$ y $t = 10,000$. Debido a que la distribución de concentraciones es menor que en el cuadro correspondiente a $t = 0$ en la figura 4.8, la distribución de colores es más oscura. Es importante mencionar que al disminuir la concentración inicial de nutrientes, las bacterias requieren de tiempos más largos para dividirse. Por esta razón, los tiempos considerados fueron $t = 3,000$, $t = 6,000$ y $t = 10,000$.

En $t = 3,000$, los nutrientes se han difundido y se muestra cómo se ha expandido la biopelícula. En comparación con los resultados anteriores, la biopelícula crece de forma más ramificada, donde, a partir de una bacteria inicial en el centro, se desarrollan ramas distanciadas en diferentes direcciones. En el tiempo $t = 6,000$, la biopelícula continuó creciendo y se presentaron más ramificaciones en cada rama. Por último, en $t = 10,000$, la biopelícula casi ha llenado el espacio, en particular, en la parte superior hay una mayor proliferación bacteriana debido a que ahí se localiza el canal de irrigación que genera una mayor disponibilidad de nutrientes. Mientras que en los otros tres lados, la estructura de la biopelícula es ramificada.

Es importante observar que cuando la división bacteriana depende de la masa, la biopelícula muestra un ritmo de crecimiento menor y una estructura fractal ramificada, a diferencia de las estructuras con aspecto más compacto que se obtuvieron en las secciones 4.3.1 y 4.3.2.

4.4. Modelo con cinética de percepción de cuórum

Para incorporar la cinética de percepción de cuórum descrita en la sección 2.4, se consideran dos modelos de crecimiento de la biopelícula. (B1) La bacteria “hija” elige

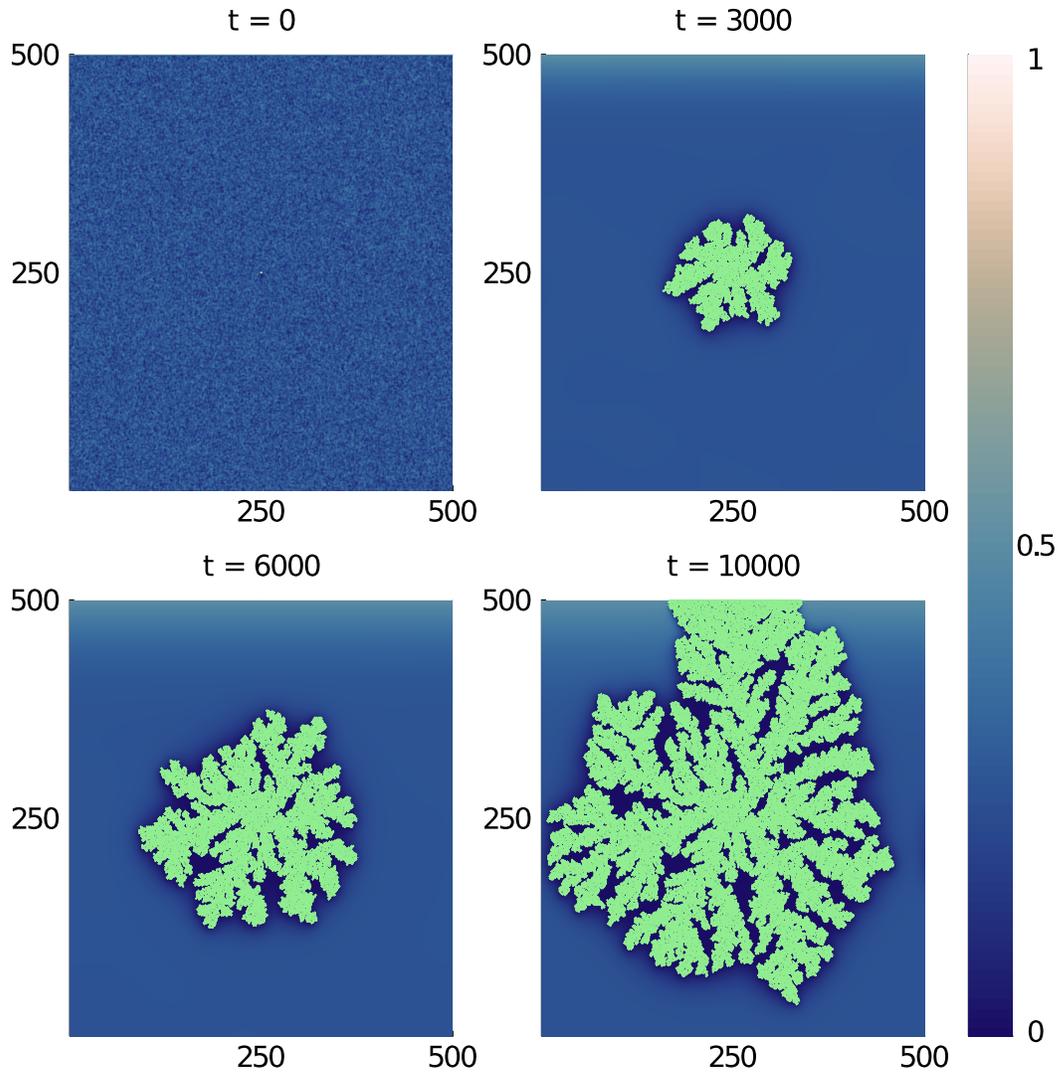


Figura 4.9: Modelo B1. La concentración inicial de nutrientes C_i varía entre $0 \leq C_i \leq 15$.

colocarse aleatoriamente en la celda vecina más cercana disponible. (B2) La bacteria “hija” elige colocarse en la celda vecina más cercana con mayor concentración de nutrientes. Para cada modelo, se realizaron simulaciones con diferentes distribuciones iniciales de nutrientes y valores distintos en el número máximo de iteraciones (t_{\max}), como se muestra en la tabla 4.1.

Las distribuciones iniciales de nutrientes correspondientes para cada modelo se definieron como:

$$C_{i,1}(y, t = 0) = \frac{20(500 - y)}{500}$$

Parámetros de las simulaciones				
	$C_{i,1}(y = 0, t = 0)$	t_{\max}	$C_{i,2}(y = 0, t = 0)$	t_{\max}
Modelo (B1)	20	3,000	10	10,000
Modelo (B2)	20	1,500	10	3,000

Tabla 4.1: Concentraciones iniciales, $C_{i,1}$ y $C_{i,2}$ y valores de los parámetros empleados para las simulaciones del modelo con dinámica de percepción de cuórum. El parámetro t_{\max} es el tiempo máximo de crecimiento de la biopelícula.

y

$$C_{i,2}(y, t = 0) = \frac{10(500 - y)}{500}$$

lo que significa que la concentración inicial de nutrientes no depende de la coordenada x y decrece linealmente como función de la coordenada y en los intervalos $0 \leq C_{i,1} \leq 20$ y $0 \leq C_{i,2} \leq 10$, respectivamente.

Para realizar las simulaciones con percepción de cuórum, se generó una malla de tamaño 500×500 con una bacteria inicial localizada en las coordenadas $(250, 250)$. La tasa de muerte celular local κ (en una celda unitaria), que aparece en la ecuación 3.13, se varió en el intervalo: $0 \leq \kappa \leq 22 \times 10^4$. Se encontró que la densidad bacteriana disminuye linealmente conforme aumenta el valor de κ . Esto significa que para valores suficientemente grandes de $\kappa \sim 22 \times 10^4$ la biopelícula tiende a desaparecer, como se muestra en las figuras 4.10 y 4.11. Se estudió la estructura de la biopelícula para 21 valores diferentes de κ , incluyendo $\kappa = 0$. Para cada valor de κ , se realizaron 10 simulaciones estadísticamente independientes de la biopelícula y se calculó la dimensión fractal promedio y la desviación estándar. Los resultados se muestran en las tablas 4.2 y 4.3. El comportamiento de la dimensión fractal como una función de κ se muestra en la figura 4.12. Se observa que para ambos modelos, la dimensión fractal disminuye monótonicamente para valores suficientemente grandes de κ .

En las dos figuras 4.10a y 4.10b se muestran los resultados al implementar el mecanismo de percepción de cuórum en una biopelícula que crece de acuerdo con el modelo (B1) para dos distribuciones iniciales de nutrientes 4.10a $0 \leq C_{i,1} \leq 20$ y 4.10b $0 \leq C_{i,2} \leq 10$. En cada figura se graficó la distribución bacteriana para diferentes valores de κ . En las figuras

4.10a-(i),(ii) y 4.10b-(i),(ii) se aprecia una mayor proliferación bacteriana cuando hay más disponibilidad inicial de nutrientes y la biopelícula desarrolla estructuras ramificadas para valores de $\kappa = 0$, y 8×10^4 . En la figura 4.10a se observa que una alta disponibilidad de nutrientes conduce a una proliferación de bacterias que casi llena la mitad inferior del cuadro cuando $\kappa = 0$, conforme aumenta el valor de κ , la extensión de la biopelícula disminuye. Por otra parte, como se ve en la figura 4.10b que corresponde a una disponibilidad menor de nutrientes, el espacio entre las ramificaciones es mayor. Al aumentar el parámetro de regulación de crecimiento, κ genera un menor número de ramificaciones y se obtiene un crecimiento menor de la biopelícula. Esta estructura contrasta con la estructura que se obtuvo en el modelo (B2) que se describe a continuación.

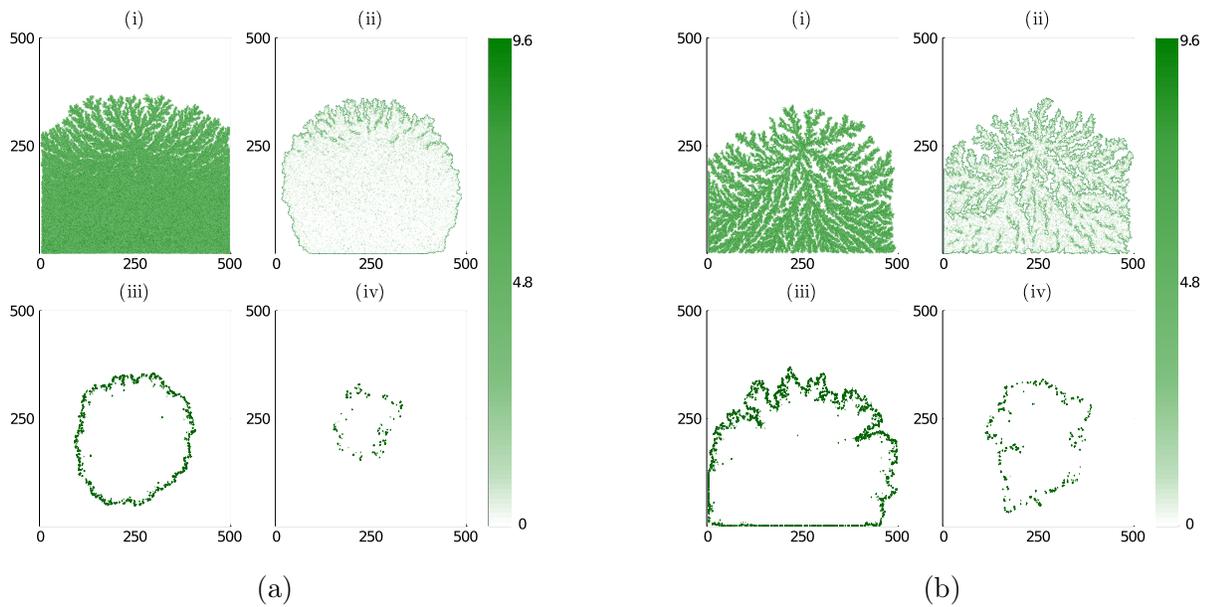


Figura 4.10: Crecimiento de la biopelícula de acuerdo con el modelo (B1) para dos intervalos de concentración inicial de nutrientes (a) $0 \leq C_{i,1} \leq 20$, (b) $0 \leq C_{i,2} \leq 10$, para diferentes valores del parámetro κ : (i) 0, (ii) 8×10^4 , (iii) 16×10^4 y (iv) 22×10^4 .

En las dos figuras 4.11b y 4.11a se muestran los resultados al implementar el mecanismo de percepción de cuórum en una biopelícula que crece de acuerdo con el modelo (B2) para dos distribuciones iniciales de nutrientes 4.11a $0 \leq C_{i,1} \leq 20$ y 4.11b $0 \leq C_{i,2} \leq 10$. Como en la descripción del modelo (B1), en cada figura se graficó la distribución bacteriana para diferentes valores del parámetro de regulación de crecimiento, κ . En las figuras 4.11a-(i),(ii) se ve una mayor proliferación bacteriana cuando hay

una mayor disponibilidad inicial de nutrientes y para valores de $\kappa = 0$, y 8×10^4 . No obstante, en la figura 4.11b se observa que al disminuir la concentración inicial de nutrientes y para los mismos valores de κ , la densidad de la biopelícula disminuye generando una estructura que se parece a la correspondiente a un cristal en los copos de nieve (<https://www.acna.cat/es/geometria-de-los-copos-de-nieve/>). Conforme aumenta el valor de κ , el crecimiento de la biopelícula en su parte inferior disminuye notablemente, debido al fenómeno de percepción de cuórum que elimina una mayor cantidad de bacterias en las regiones donde la densidad bacteriana es alta – ver ecuación 3.13 – hasta que se forman huecos dentro de la biopelícula, como se observa en las figura 4.11a-(iii),(iv) y 4.11b-(iii),(iv).

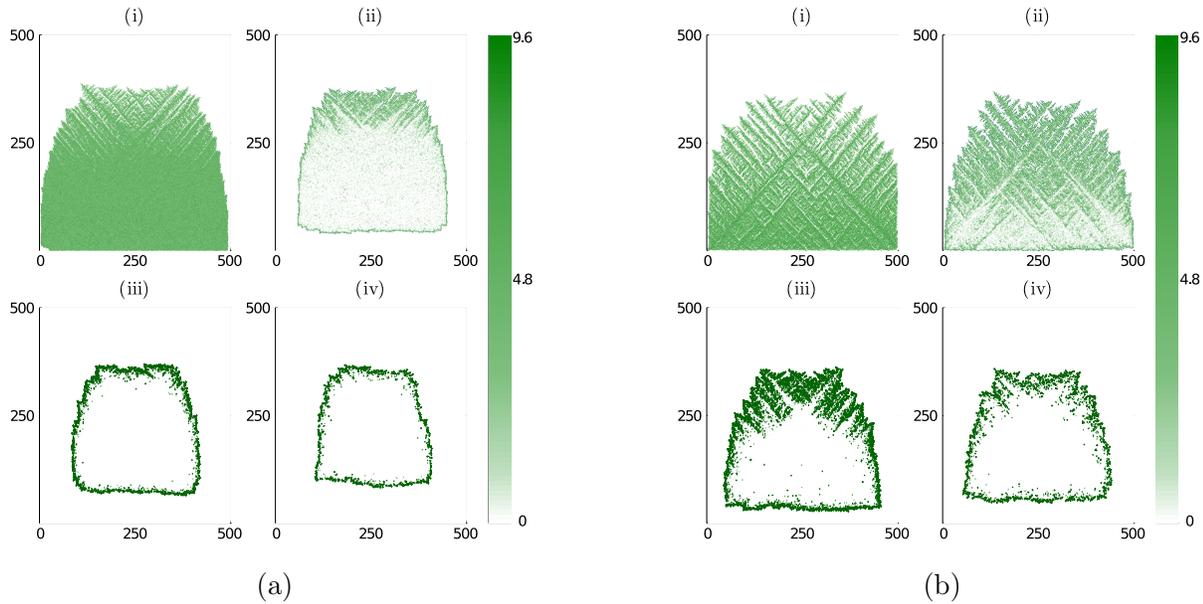


Figura 4.11: Crecimiento de la biopelícula de acuerdo con el modelo (B2) para dos intervalos de concentración inicial de nutrientes (a) $0 \leq C_{i,1} \leq 20$, (b) $0 \leq C_{i,2} \leq 10$, para diferentes valores del parámetro κ : (i) 0, (ii) 8×10^4 , (iii) 16×10^4 y (iv) 22×10^4 .

Con el fin de comparar cuantitativamente la estructura de las biopelículas, en términos de la percepción de cuórum de las bacterias, se calculó la dimensión fractal de las biopelículas para diferentes valores de la tasa de muerte celular. La dimensión fractal es una cantidad estadística que describe cómo un fractal parece llenar el espacio. Un fractal es un objeto que muestra una propiedad conocida como autosimilitud, es decir, es una forma geométrica que se puede reducir a partes más pequeñas, siendo cada una de ellas una copia

reducida del conjunto más grande.

Con esta cantidad, podemos calcular cuantitativamente la dimensión del espacio que llenan los agregados bacterianos. La dimensión fractal se calculó empleando una rutina de “conteo de cajas” (box counting) implementada en Mathematica. Para cada valor de κ , se realizaron 10 simulaciones estadísticamente independientes de la biopelícula. Posteriormente, se calculó su promedio y desviación estándar. Esta información se presenta en las tablas 4.2 y 4.3.

Resultados de dimensión fractal para el modelo (B1)				
	$0 \leq C_{i,1} \leq 20$		$0 \leq C_{i,2} \leq 10$	
Valor de κ	Dimensión fractal promedio	Desviación estándar	Dimensión fractal promedio	Desviación estándar
0	1.9	0.0	1.85	0.0
500	1.9	0.0	1.85	0.0
750	1.9	0.0	1.85	0.0
0.5×10^4	1.9	0.0	1.85	0.0
1×10^4	1.9	0.0	1.85	0.0
2×10^4	1.89	0.0	1.85	0.0
3.5×10^4	1.86	0.0	1.84	0.0
5×10^4	1.79	0.0	1.83	0.0
6×10^4	1.76	0.0	1.82	0.01
7×10^4	1.72	0.01	1.8	0.0
7.5×10^4	1.69	0.01	1.79	0.0
8×10^4	1.61	0.01	1.76	0.0
9×10^4	1.37	0.02	1.66	0.01
10×10^4	1.38	0.01	1.59	0.01
11×10^4	1.35	0.01	1.55	0.01
12×10^4	1.34	0.0	1.51	0.01
14×10^4	1.35	0.01	1.47	0.01
16×10^4	1.32	0.02	1.43	0.01
18×10^4	1.29	0.01	1.39	0.02
20×10^4	1.26	0.01	1.33	0.01
22×10^4	1.26	0.03	1.26	0.02

Tabla 4.2: Valores de dimensión fractal promedio según el valor de tasa asesina κ empleando el modelo de crecimiento (B1).

En la figura 4.12 se muestra el comportamiento de la dimensión fractal como función de la tasa de muerte celular κ , para cada uno de las cuatro conjuntos de biopelículas descritos en las secciones anteriores. La línea sólida une los puntos obtenidos y no es resultado de

Resultados de dimensión fractal para el modelo (B2)				
	$0 \leq C_{i,1} \leq 20$		$0 \leq C_{i,2} \leq 10$	
Valor de κ	Dimensión fractal promedio	Desviación estándar	Dimensión fractal promedio	Desviación estándar
0	1.92	0.0	1.9	0.0
500	1.92	0.01	1.9	0.01
750	1.92	0.0	1.9	0.0
0.5×10^4	1.92	0.01	1.9	0.0
1×10^4	1.92	0.0	1.9	0.0
2×10^4	1.91	0.0	1.9	0.0
3.5×10^4	1.89	0.0	1.89	0.0
5×10^4	1.85	0.01	1.87	0.0
6×10^4	1.82	0.0	1.85	0.0
7×10^4	1.78	0.01	1.83	0.01
7.5×10^4	1.75	0.0	1.81	0.01
8×10^4	1.7	0.01	1.8	0.01
9×10^4	1.49	0.01	1.76	0.01
10×10^4	1.51	0.01	1.73	0.01
11×10^4	1.48	0.01	1.7	0.01
12×10^4	1.46	0.01	1.68	0.0
14×10^4	1.42	0.01	1.62	0.01
16×10^4	1.4	0.01	1.56	0.01
18×10^4	1.38	0.01	1.53	0.01
20×10^4	1.36	0.01	1.48	0.01
22×10^4	1.34	0.01	1.46	0.01

Tabla 4.3: Valores de dimensión fractal promedio según el valor de tasa asesina κ empleando el modelo de crecimiento (B2).

una interpolación. Estos resultados demuestran el comportamiento esperado, es decir, al aumentar el parámetro κ , se generan huecos al interior de la biopelícula y su dimensión fractal disminuye en las dos simulaciones representativas de cada modelo.

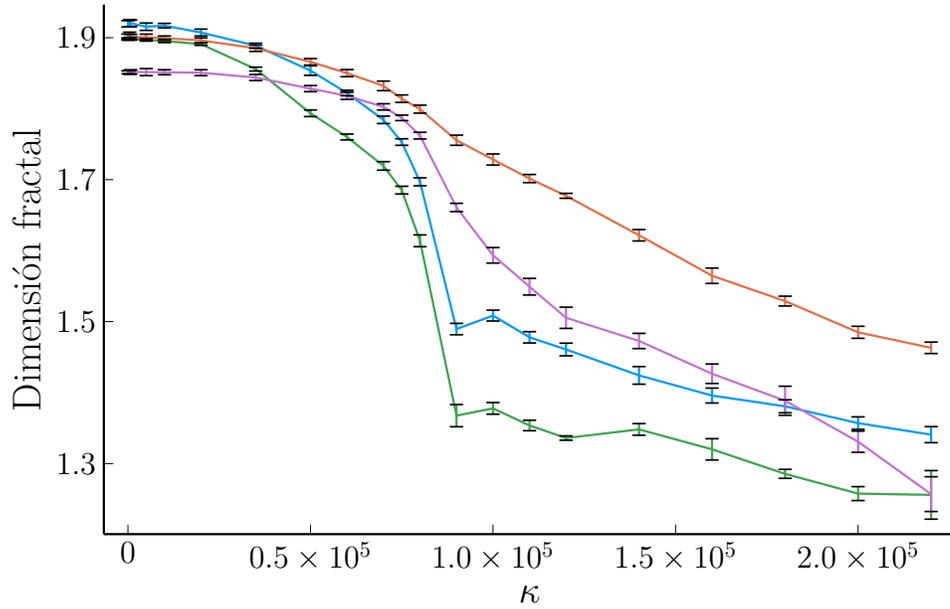


Figura 4.12: Dimensión fractal vs valor κ con barras de error. La línea verde representa los resultados del modelo (B1) con concentración inicial de nutrientes $0 \leq C_{i,1} \leq 20$ y la línea morada a los resultados del modelo (B1) con concentración inicial de nutrientes $0 \leq C_{i,2} \leq 10$. La línea azul corresponde a los resultados del modelo (B2) con concentración inicial de nutrientes $0 \leq C_{i,1} \leq 20$, la línea naranja los resultados del modelo (B2) con concentración inicial de nutrientes $0 \leq C_{i,2} \leq 10$.

4.5. Mecanismos de latencia de las bacterias

Considerando que uno de los posibles mecanismos de resistencia de las biopelículas a los antibióticos es la existencia de bacterias en estado latente, en esta sección se analizan dos posibles escenarios de cambio de un estado activo (a) a un estado de latencia (d) mencionados en la sección 1.3: (A) senescencia de las bacterias y (B) proceso híbrido. Tomando como base en el modelo de crecimiento (B1), presentado en la sección 4.3.3, se implementaron dos escenarios de formación de bacterias en estado latente [13].

Para ambos escenarios, se consideró un cuadrado de tamaño 500×500 con dos distribuciones iniciales de las concentraciones de nutrientes y de oxígeno:

- Concentraciones iniciales de nutrientes y oxígeno distribuidas aleatoriamente en el intervalo $0 \leq C_{i,1} \leq 20$.
- Gradiente de concentraciones iniciales de nutrientes y oxígeno, que disminuye lineal-

mente al aumentar el valor de la coordenada y y se mantiene constante a lo largo del eje horizontal, definido en la siguiente ecuación:

$$C_{i,2}(y, t = 0) = \frac{20(500 - y)}{500}.$$

4.5.1. Modelo de senescencia

La primera dinámica implementada fue la correspondiente a la dependencia del tiempo, en la que las bacterias activas (a) se vuelven inactivas (d) cuando la duración desde la última división celular excede un umbral de tiempo $T_{a \rightarrow d}(t)$. Se realizaron simulaciones para las dos diferentes distribuciones iniciales de concentración de nutrientes y cuatro valores representativos de $T_{a \rightarrow d}(t)$. Para todas las simulaciones, se empleó un número máximo de 3,000 iteraciones, y se eligieron cuatro valores de $T_{a \rightarrow d}(t)$ que dieron como resultado distribuciones representativas de bacterias activas e inactivas en la biopelícula. Al inicio de las simulaciones, se colocó inicialmente una bacteria en el centro del cuadrado. Los resultados se muestran en las figuras 4.13a y 4.13b considerando las concentraciones iniciales indicadas en la sección 4.5.

En los resultados de la figura 4.13a se obtuvieron considerando una concentración inicial de nutrientes y oxígeno distribuida aleatoriamente en el intervalo $0 \leq C_{i,1} \leq 20$, para cuatro valores del tiempo umbral $T_{a \rightarrow d}(t)$: (i) 100, (ii) 750, (iii) 1,500 y (iv) 2,500. Se observa que el crecimiento de la biopelícula ocurre desde el centro del cuadrado hacia los cuatro lados de forma uniforme como consecuencia de la distribución inicial de nutrientes y oxígeno. Al aumentar el valor del tiempo umbral $T_{a \rightarrow d}(t)$, la cantidad de bacterias en estado latente disminuye y su distribución es circular y uniforme. Se encontró que el porcentaje de bacterias inactivas en la biopelícula fue de, (i) 91.6% para el tiempo de umbral más pequeño, de (ii) 54.47% para el tiempo de umbral siguiente, de (iii) 22.7% para el tercer tiempo de umbral y de (iv) 2.36% para el tiempo de umbral más largo.

A diferencia del caso anterior, en la figura 4.13b el crecimiento de la biopelícula no es uniforme como resultado del gradiente de concentración inicial de nutrientes y oxígeno, que decrece linealmente en la dirección vertical. Hay una concentración mayor de nutrien-

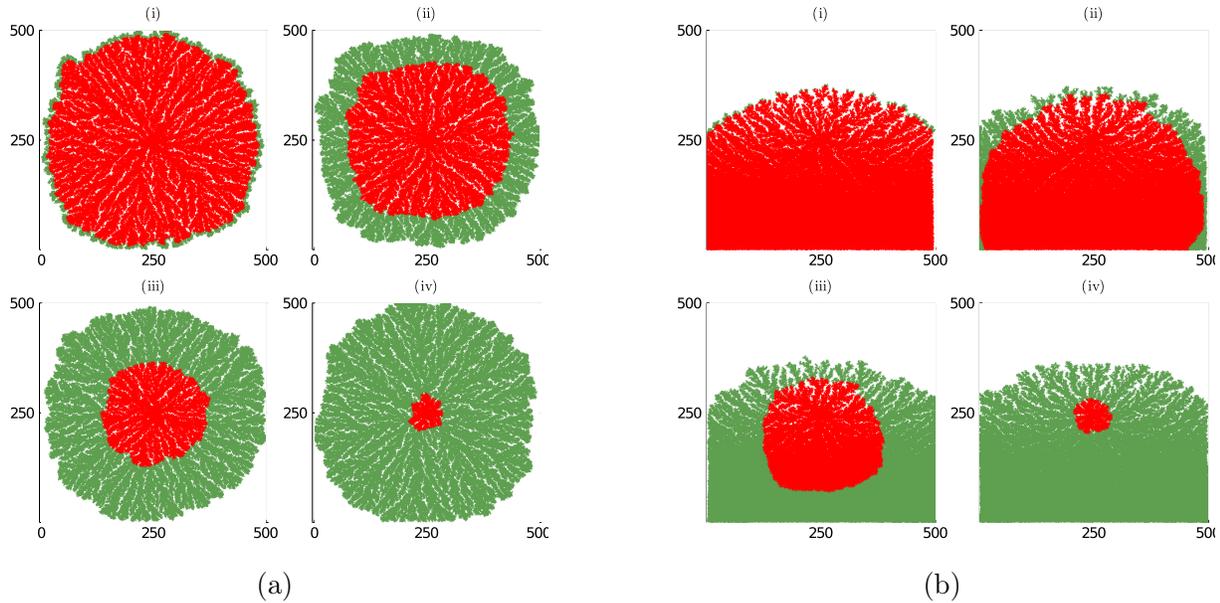


Figura 4.13: Distribución de bacterias activas (verde) e inactivas (rojo) en la biopelícula de acuerdo con el modelo dependiente del tiempo, para dos concentraciones iniciales: (a) aleatoria, (b) gradiente que decrece linealmente en la dirección vertical. Los valores del tiempo umbral, $T_{a \rightarrow d}(t)$ son: (i) 100, (ii) 750, (iii) 1,500 y (iv) 2,500.

tes en la sección inferior del cuadrado, por lo que el crecimiento es prolífico en esta zona, en contraste con la mitad superior del cuadrado. En consecuencia, las bacterias inactivas se distribuyen siguiendo un patrón similar al de la biopelícula. Para tiempos de umbral $750 < T_{a \rightarrow d}(t) \leq 1,500$ las bacterias inactivas tienden a formar un aglomerado circular. Finalmente, para tiempos de umbral suficientemente grandes 2,500 (iv), la cantidad de bacterias inactivas disminuye distribuyéndose en un círculo pequeño en el centro del cuadrado. Como en el caso anterior, al aumentar el tiempo de umbral el porcentaje de bacterias inactivas en la biopelícula disminuye, como se muestra en los siguientes resultados: (i) 98.81 % para el tiempo de umbral más pequeño, de (ii) 87.25 % para el tiempo de umbral siguiente, de (iii) 33.46 % para el tercer tiempo de umbral y de (iv) 3.00 % para el tiempo de umbral más largo.

Estos resultados sugieren que entre más grande es el tiempo umbral de reproducción, el porcentaje de bacterias inactivas en la biopelícula disminuye significativamente. No obstante, su distribución en la biopelícula depende de cómo sea el gradiente de concentración inicial de nutrientes y oxígeno.

4.5.2. Modelo híbrido

Este modelo de inactivación considera un proceso de inactivación bacteriana que depende directamente de la suma de concentraciones locales de nutrientes y oxígeno multiplicada por un número aleatorio distribuido uniformemente en el intervalo $(0, 1)$. En este caso, las bacterias activas (a) adquieren un estado inactivo (d) cuando se cumple la siguiente condición:

$$r \cdot C_L < p$$

donde r es un número aleatorio distribuido uniformemente en el intervalo, $0 \leq r \leq 1$, y C_L es la concentración local de nutrientes normalizada, por lo que $0 \leq C_L \leq 1$, y p representa la probabilidad del cambio de estado ($a \rightarrow d$). La condición definida implica que el cambio de estado es más probable en regiones donde es pequeña la concentración local de nutrientes.

Se realizaron simulaciones para las dos diferentes concentraciones iniciales de concentración de nutrientes y cuatro valores representativos de p . Para las simulaciones con una concentración aleatoria inicial de nutrientes y oxígeno, $C_{i,1}$, se empleó un número máximo de 3,000 iteraciones, en las que se colocó inicialmente una bacteria en el centro del cuadrado. En cambio, cuando la concentración inicial de nutrientes y oxígeno se distribuye de acuerdo con el gradiente lineal vertical, $C_{i,2}$, las simulaciones se iniciaron con dos bacterias colocadas en los puntos de coordenadas $(250, 10)$ y $(250, 350)$. Esto fue con la finalidad de mostrar cómo es el cambio de estado $a \rightarrow d$ en regiones con diferentes gradientes de concentración de nutrientes y oxígeno. Debido a que se inicia con dos bacterias y no con una, la simulación requirió de un número máximo de iteraciones de 1,500. Los resultados se muestran en las figuras 4.14a y 4.14b.

Los resultados que se muestran en la figura 4.14a se obtuvieron considerando una concentración inicial de nutrientes y oxígeno que se distribuye aleatoriamente de manera uniforme en el intervalo $0 \leq C_{i,1} \leq 20$, para cuatro valores de p : (i) 0, (ii) 0.001, (iii) 0.005 y (iv) 0.1. Se observa que el crecimiento de la biopelícula ocurre desde el centro del cuadrado hacia los cuatro lados de forma casi uniforme como consecuencia de la distribución inicial

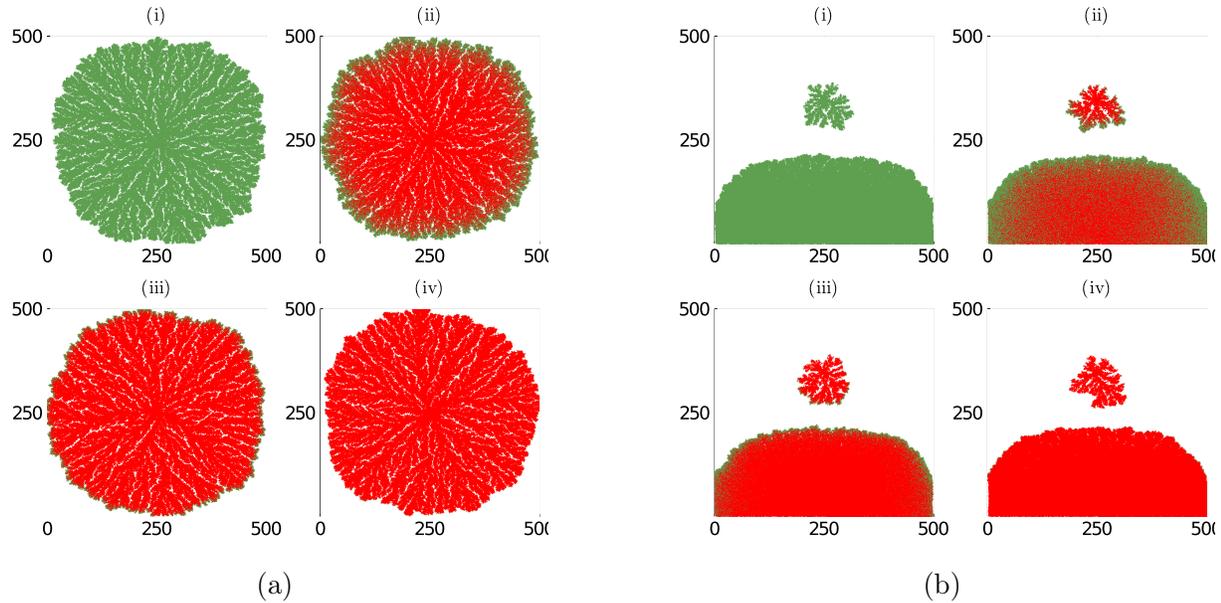


Figura 4.14: Distribución de bacterias activas (verde) e inactivas (rojo) en la biopelícula de acuerdo con el modelo híbrido, para dos concentraciones iniciales: (a) aleatoria, (b) gradiente que decrece linealmente en la dirección vertical. Los valores de p son: (i) 0, (ii) 0.001, (iii) 0.005 y (iv) 0.1.

de nutrientes y oxígeno. Al aumentar el valor p , la cantidad de bacterias en estado inactivo aumenta y su distribución no es uniforme, teniendo una mayor concentración de ellas en el centro. Se encontró que el porcentaje de bacterias inactivas en la biopelícula fue de (i) 0.00 % para el valor de p más pequeño, de (ii) 77.36 % para el valor de p siguiente, de (iii) 95.04 % para el tercer valor de p y de (iv) 99.68 % para el valor de p más grande.

En contraste, en la figura 4.14b el crecimiento de la biopelícula y la distribución de bacterias inactivas es diferente en las regiones superior e inferior como resultado del gradiente de concentración inicial de nutrientes y oxígeno, que decrece linealmente en la dirección vertical. Debido a que la concentración de nutrientes en la sección inferior del cuadrado es mayor, la proliferación bacteriana es abundante en esta zona, a diferencia de la mitad superior del cuadrado, donde la concentración de nutrientes disminuye linealmente. En este caso, los porcentajes de bacterias inactivas en las secciones inferior y superior de la biopelícula, son (i) 0.00 %, (ii) 54.19 %, (iii) 89.70 % y (iv) 99.53 %, para la sección inferior y (i) 0.00 %, (ii) 68.73 %, (iii) 91.84 % y (iv) 99.25 % para la sección superior.

Estos resultados sugieren que cuando la concentración de nutrientes y oxígeno dismi-

nuye, el porcentaje de bacterias inactivas en la biopelícula aumenta, mientras que en las regiones donde la concentración de nutrientes y oxígeno es grande, el porcentaje de bacterias inactivas disminuye significativamente. Esto es consistente con el hecho de que las bacterias sometidas a estrés debido a baja disponibilidad de nutrientes y oxígeno tienen una probabilidad mayor de pasar a un estado inactivo, a diferencia de aquellas que tienen mayor disponibilidad de nutrientes y oxígeno que se mantienen en un estado activo.

Capítulo 5

Conclusiones

En esta tesis se modeló *in silico* la evolución y crecimiento de una biopelícula mediante la implementación de un autómata celular junto con un conjunto de ecuaciones de reacción-difusión que describen el transporte de nutrientes y oxígeno. Además, se modeló la regulación del crecimiento de la biopelícula introduciendo un modelo cinético para describir el fenómeno de percepción de cuórum. También se modeló la inactivación o latencia de las bacterias considerando dos mecanismos: (i) senescencia y (ii) un modelo híbrido. En el primer mecanismo las bacterias activas se vuelven inactivas – en estado de latencia – cuando el tiempo transcurrido desde la última división celular excede un tiempo umbral. En el segundo mecanismo el proceso de inactivación bacteriana depende directamente de la suma de concentraciones locales de nutrientes y oxígeno multiplicada por un número aleatorio distribuido uniformemente en el intervalo $(0, 1)$.

Se propusieron y analizaron dos modelos de crecimiento, donde al ocurrir el proceso de división bacteriana la célula hija ocupa la celda vecina más cercana disponible de forma aleatoria o bien la celda vecina más cercana con mayor concentración de nutrientes. Para ello se consideraron dos distribuciones iniciales de nutrientes y oxígeno. En la primera, los nutrientes están distribuidos de manera aleatoria pero uniforme a través del espacio mientras que en la segunda los nutrientes y oxígeno se distribuyen en el espacio de acuerdo con un gradiente de concentraciones.

Se demostró que la biopelícula desarrolla estructuras fractales. Cuando hay mayor disponibilidad de nutrientes la biopelícula desarrolla la forma de un fractal con estructura

simétrica, mientras que cuando hay poca disponibilidad de nutrientes la estructura es más ramificada. En ausencia de un proceso de regulación la biopelícula crece ilimitadamente conforme transcurre el tiempo. Cuando se incorpora el proceso de regulación mediante la percepción de cuórum la estructura de la biopelícula desarrolla huecos en su interior. No obstante, su perímetro mantiene una estructura fractal. Se analizó el comportamiento de la dimensión fractal de la biopelícula y se encontró que disminuye desde un valor de 1.9 hasta un valor entre 1.2 y 1.3 conforme aumenta el proceso de regulación.

Con respecto a los mecanismos de inactivación bacteriana se encontró que en el modelo de senescencia las bacterias en estado activo se localizan formando una franja que limita a la biopelícula. Mientras que en el modelo híbrido las bacterias activas se localizan principalmente en el perímetro de la biopelícula.

En resumen, los mecanismos de inactivación sugieren que cuando las bacterias se someten a estrés ambiental o a la senescencia, cambian de un estado activo a uno latente. En el primer caso, las bacterias en estado latente se encuentran a través de toda la biopelícula, pero principalmente formando cúmulos grandes en su interior. En el segundo mecanismo, se localizan en un perímetro definido.

No obstante la simplificación del modelo se obtuvieron resultados que contribuyen a entender la dinámica del crecimiento de una biopelícula, así como a entender los mecanismos de inactivación de las bacterias que se piensa las vuelve resistentes a los antibióticos.

En la etapa final de revisión y escritura de esta tesis se publicó una serie de artículos de revisión en el tema de biopelículas bacterianas en el número 10, volumen **20**, octubre de 2022 en la revista “Nature Reviews Microbiology” [6] [3] [12] [24].

Apéndice

Julia

Julia es un lenguaje de programación diseñado y desarrollado desde 2008 por Jeff Bezanson, Alan Edelman, Stefan Karpinski y Viral B. Shah. Es multiparadigma, combinando características de programación imperativa, funcional y orientada a objetos. Julia tiene como objetivo crear una combinación sin precedentes de facilidad de uso, potencia y eficiencia en un sólo lenguaje. Además de lo anterior, algunas ventajas de Julia sobre sistemas comparables incluyen:

- Gratis y de código abierto (licencia de MIT)
- Los tipos de variable definidos por el usuario son tan rápidos y compactos como los integrados
- No es necesario vectorizar el código por rendimiento; el código desvectorizado es eficiente.
- Diseñado para paralelismo y computación distribuida
- Procesamiento ligero (corrutinas)
- Sistema de tipos de variables discreto pero potente
- Conversiones y ascensos elegantes y extensibles para números y otros tipos de variables.
- Soporte eficiente para Unicode, que incluye pero no se limita a UTF-8.

- Llamado a funciones de C directamente (no se necesitan contenedores ni APIs especiales)
- Potentes capacidades tipo shell para gestionar otros procesos.
- Macros tipo Lisp y otras instalaciones de creación de programas con manejo de otros programas como datos (metaprogramación).

Las simulaciones de la presente tesis se desarrollarán en el software Julia versión 1.0.5 (2019-09-09). El código fue compilado y ejecutado en sistemas mac OS versión 11.6, con procesador Intel Core i7 de 6 núcleos (i7-9750H). Está disponible para su descarga en <https://julialang.org/downloads/> (consultado el 14 de octubre de 2021).

Material suplementario

Más simulaciones, videos y contenido se pueden encontrar en el siguiente repositorio de GitHub: <https://github.com/erickher98/TesisBiopelículas.git>. En el mismo, está disponible el código en lenguaje Julia con todas las rutinas implementadas en la presente tesis. La única librería externa empleada es Plots.jl, que es una librería para visualización. Su documentación se encuentra en <https://github.com/JuliaPlots/Plots.jl>

Bibliografía

- [1] Ammar Algburi y col. «Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond». En: *Applied and Environmental Microbiology* 83.3 (2017), págs. 1-15.
- [2] Nakhlé H. Asmar. *Partial Differential Equations with Fourier Series and Boundary Value Problems*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2004.
- [3] S. Azimi, G.R. Lewin y M. Whiteley. «The biogeography of infection revisited». En: *Nature Reviews Microbiology* 20.10 (2022), págs. 579-592.
- [4] A. Brauner y col. «Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment». En: *Nature Reviews Microbiology* 14 (2016), págs. 320-330.
- [5] A.J. Díaz Caballero y col. «Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión». En: *Avances en periodoncia* 23.3 (2010), págs. 195-201.
- [6] O. Ciofu y col. «Tolerance and resistance of microbial biofilms». En: *Nature Reviews Microbiology* 20.10 (2022), págs. 621-635.
- [7] Jan-Ulrich Kreft y Mark C. M. van Loosdrecht Cristian Picioreanu. «Particle-Based Multidimensional Multispecies Biofilm Model». En: *Applied and Environmental Microbiology* 70.5 (2004), págs. 3024-3040.
- [8] Gordon C. Everstine. *Numerical Solution of Partial Differential Equations*. Ene. de 2010.
- [9] Enrique Hernández-Jiménez y col. «Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: Which do human macrophages prefer?» En: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 441.4 (2013), págs. 947-952.

- [10] P. Houston, S. Roggendorf y K. G. van der Zee. «Eliminating Gibbs phenomena: A non-linear Petrov–Galerkin method for the convection–diffusion–reaction equation». En: *Computers and Mathematics with Applications* 80.5 (2020), págs. 851-873. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.camwa.2020.03.025>.
- [11] Costerton J., Stewart P. y Greenberg E. «Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections». En: *Science* 284.5418 (1999), págs. 1318-1322.
- [12] J. Jo, A. Price-Whelan y L.E.P. Dietrich. «Gradients and consequences of heterogeneity in biofilms». En: *Nature Reviews Microbiology* 20.10 (2022), págs. 593-607.
- [13] Yuki Kagawa y Satoshi Tsuneda Kotaro Chihara Shinya Matsumoto. «Mathematical modeling of dormant cell formation in growing biofilm». En: *Frontiers in Microbiology* 6.534 (2015), págs. 1-8.
- [14] M. Krivorot y col. «Factors affecting biofilm formation and biofouling in membrane distillation of seawater». En: *Journal of Membrane Science* 376.1 (2011), págs. 15-24. ISSN: 0376-7388.
- [15] Kim Lewis. «Persister Cells». En: *Annual Review of Microbiology* 64.1 (2010), págs. 357-372.
- [16] K. Luciani y col. «Enfermedad por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en Panamá». En: *Anales de pediatría* 75.2 (2011), págs. 103-109.
- [17] N.A. Lyons y R. Kolter. «On the evolution of bacterial multicellularity». En: *Current opinion in microbiology* 24 (2015), págs. 21-28.
- [18] T. Maeda y col. «High-throughput laboratory evolution reveals evolutionary constraints in *Escherichia coli*». En: *Nature Communications* 11.5970 (2020), págs. 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19713-w>.
- [19] Tahir Hussain y Saadia Andleeb Muhsin Jamal Ufaq Tasneem. «Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections». En: *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology* 4.3 (2015), págs. 1-14.
- [20] T. Bjarnsholt N. Høiby O. Ciofu. «*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis». En: *Future microbiology* 5.11 (2010), págs. 1663-1674.

- [21] S. J. Pamp y col. «Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes». En: *Molecular microbiology* 68.1 (2008), págs. 223-240.
- [22] Michael J. Franklin Philip S. Stewart. «Physiological heterogeneity in biofilms». En: *Nature Reviews Microbiology* 6.1 (2008), págs. 199-210.
- [23] Philip S. Stewart y Don Daly Ricardo Murga. «Quantitative Analysis of Biofilm Thickness Variability». En: *Biotechnology and Bioengineering* 45.6 (1995), págs. 503-510.
- [24] K. Sauer, P. Stoodley y D.M. Goeres. «The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation». En: *Nature Reviews Microbiology* 20.10 (2022), págs. 608-620.
- [25] Tjakko Abee Stijn van der Veen. «Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid». En: *International Journal of Food Microbiology* 144.3 (2011), págs. 421-431.
- [26] S. Wu y col. «Quorum sensing for population-level control of bacteria and potential therapeutic applications». En: *Cellular and Molecular Life Sciences* 77.1 (2020), págs. 1319-1343. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03326-8>.
- [27] L. You y col. «Programmed population control by cell–cell communication and regulated killing». En: *Nature* 428.1 (2004), págs. 868-871.