



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

El efecto de la estructura espacial en comunidades bacterianas con interacciones metabólicas ante el aumento de presiones de selección

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**BIÓLOGA**

P R E S E N T A

SOFIA ROQUE ROMERO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. AYARI FUENTES HERNÁNDEZ



Ciudad Universitaria, CDMX, Noviembre, 2022.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Sintética del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, Unidad Morelos, con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Programa Ciencia de Frontera, Proyecto número 39587.

## Agradecimientos

A los investigadores que me inspiran a seguir en este bello camino de la ciencia: mi tutora, Dra. Ayari Fuentes Hernández quién me ha brindado su apoyo y confianza en esta investigación; Dra. Daniela Reyes González que con paciencia me introdujo en la experimentación y al sistema de las auxotrofías, y Dr. Rafael Peña Miller por su apoyo y entrenamiento en la modelación computacional, gracias a él salió el modelo ABM.

A mis sinodales de la UNAM: Dr. Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina; Dra. Luisa I. Falcón Álvarez del Instituto de Ecología, Unidad Mérida; Dra. Gertrudis H. González Gómez de la Facultad de Ciencias y, Dra. Elisa Domínguez Hüttinger del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por tomarse su tiempo de leer mi tesis, por sus aportaciones para mejorar esta investigación y por enseñarme la pasión con la que se investiga en nuestra máxima casa de estudios.

A todos los profesores que pasaron por mi vida y me dejaron sus conocimientos, entusiasmo y dedicación, a ellos que forman parte de lo que soy ahora.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México que me formó como bióloga y me abrió la oportunidad de un futuro en la ciencia.

## Dedicatorias

“¿Qué es la vida? Un frenesí.  
¿Qué es la vida? Una ilusión,  
una sombra, una ficción,  
y el mayor bien es pequeño;  
que toda la vida es sueño,  
y los sueños, sueños son.”

**Pedro Calderón de la Barca**  
(*La vida es sueño* (1635)).

Principalmente a mis dos personas favoritas de todo el universo, mi todo, mis padres, por su amor incondicional y apoyo en todas las etapas de mi vida. Para ellos que siempre están para mí, les dedico este trabajo.

A mis colegas y amigos, porque gracias a todos ellos mi vida personal y profesional en la CDMX y en Cuernavaca se ha visto enormemente enriquecida.

## Contenido

Agradecimientos.....	2
Dedicatorias.....	3
Resumen.....	5
Introducción.....	7
1. Interacciones bióticas.....	7
2. Interacciones metabólicas.....	14
3. Ambientes espacialmente estructurados.....	18
4. Antibióticos.....	20
4.1. Cloranfenicol (CHL).....	22
Pregunta de investigación.....	23
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	23
Antecedentes.....	25
Métodos generales.....	30
Método computacional.....	32
Método experimental.....	39
Validación experimental.....	43
Resultados.....	53
Discusión.....	68
Conclusiones.....	71
Referencias.....	72

“Esta es verdaderamente la era de las bacterias:  
como era en el principio, lo es ahora y siempre lo será”.  
**Stephen Jay Gould** (1994).

## Resumen

Todos los seres vivos de una forma u otra están conectados a través de interacciones dinámicas. Dichas interconexiones son influenciadas por factores ambientales que en su conjunto forman una determinada estructura y funcionalidad. Específicamente en las comunidades microbianas, la mayoría de las interacciones bióticas son mediadas por el intercambio de metabolitos. El intercambio metabólico es un importante impulsor de sinergia entre socios cooperadores. Se ha observado que factores como la variación del ambiente y la estructura espacial, pueden favorecer comportamientos cooperativos, ya que en ambientes espacialmente estructurados se incrementa la reciprocidad del intercambio de los metabolitos entre los socios.

El presente trabajo tiene como objetivo principal modelar la dinámica de un consorcio con estructura espacial que contempla dos bacterias auxótrofas en medios controlados de distintos aminoácidos y con presiones de selección producidas por distintas concentraciones de antibiótico bacteriostático. Para ello, realizamos un modelo basado en agentes (ABM por sus siglas en inglés) que nos permitió explorar parámetros de crecimiento en la dinámica de nuestro consorcio. Posteriormente, nos dimos a la tarea de realizar un modelo experimental con un consorcio de dos cepas mutantes de *Escherichia coli* K12 auxótrofas una de ellas a tirosina y la otra a leucina. En ambos modelos nuestras poblaciones en medio mínimo con sólo una fuente de carbono presentan mutualismo obligado por lo que inicialmente tenemos un consorcio en cooperación. Al suplementar el medio vemos experimentalmente e *in silico* el desacople de la cooperación, y una respuesta específica al antibiótico.

Al comparar nuestros resultados computacionales con los experimentales, confirmamos que la suplementación del medio altera la dinámica de cooperación, lo que concuerda con lo reportado en la literatura. No obstante, nuestros modelos difieren entre sí en la respuesta al antibiótico. En modelo ABM, debido a lo básico de su programación, favorece la tolerancia en medios suplementados. Mientras que en las cajas Pretri observamos mayor tolerancia en condiciones sin suplementación.

## Introducción

### 1. Interacciones bióticas

Todos los seres vivos en este planeta están conectados a través de interacciones que permiten la vida. Desde la antigua Grecia ya se tenía documentado el fenómeno gracias a las minuciosas observaciones de los grandes sabios, posteriormente naturalistas del siglo XIX comenzaron a darse cuenta de su gran complejidad, pero no es hasta mediados del siglo XX que se observa que las interacciones cambian dependiendo del contexto. A partir de entonces se consideran las interacciones en términos de sus efectos a nivel individual, poblacional o incluso evolutivos, partiendo de premisas sobre costos y beneficios de interacciones en pares. Actualmente, no cabe duda de lo importante que son las interacciones, ya que constituyen un pilar en la composición y funcionamiento de todos los ecosistemas, por lo tanto, su estudio es el pináculo para entender procesos particulares de las comunidades.

En Grecia, siglo V a.C. Heródoto documentó por primera vez la existencia de interacciones bióticas interespecíficas, él observó la interacción mutualista entre una ave del orden de los *Charadriiformes* y un cocodrilo (Bronstein, 2001), por su parte, Aristóteles y Teofrasto describieron interacciones: mutualistas (de polinización y dispersión de semillas), parasitismos (infestaciones de semillas por insectos parásitos), herbivoría y mecanismos de defensa en las plantas (Thanos, 1994), ideas posteriormente retomadas por Al-Jāḥiẓ en su libro “*Kitāb al-Hayawān*” (“El libro de los animales”) donde también por primera vez se introduce el concepto *cadena*

*alimenticia*<sup>1</sup>, definida como una forma simple de representar el flujo de nutrientes (Ings & Hawes, 2018).

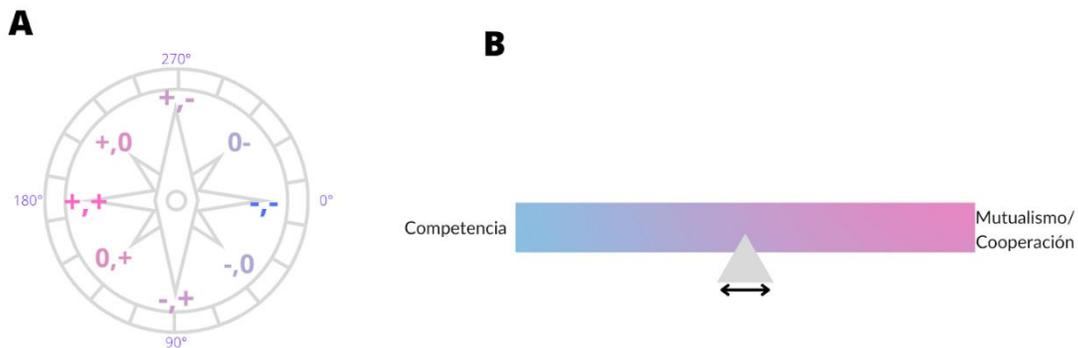
Más adelante, el naturalista Alexander von Humboldt propone el término “Naturgemälde”, donde resalta a la naturaleza como un todo viviente (Ings & Hawes, 2018), pone en perspectiva a la vida como un entramado interconectado entre los organismos y su medio ambiente. Las ideas de este último fueron inspiración para Charles Darwin en su teoría de la evolución por selección natural. Por su parte, Darwin se remitió a los ejemplos principalmente de interacciones de competencia y depredación que observó durante su viaje en el *Beagle* para explicar su teoría, como muestra de ello cito de su obra *El origen de las especies* lo siguiente: “Estoy tentado a darle un ejemplo más que muestre cómo las plantas y los animales, los más remotos en la escala de la naturaleza, están unidos juntos en una red de relaciones complejas” (Darwin, 1860). Además de los aportes en el campo de la evolución, Darwin anticipó mucho del trabajo entorno al mutualismo y la coevolución, asimismo imaginó patrones de diversificación de linajes impulsados por competencia (Hembry & Weber, 2020).

A finales del siglo XIX, los primeros ecólogos se centraron en el estudio de las redes tróficas. No obstante, el pensamiento de los ecólogos de esos tiempos proponía considerar la interacción como un fenómeno simple y fijo, el cuál solía etiquetarse según los efectos sobre los organismos, posteriormente Haskell (1949) desde la teoría social brindó una perspectiva holística sobre cómo ver a las interacciones con dos especies, en un esquema que denominó “coacciones en brújula” (Haskell, 1949; Lidicker, 1979; Bronstein, 2001; Holland & DeAngelis, 2009; Pringle, 2016), donde el

---

<sup>1</sup> Este acontecimiento es importante ya que, a partir de este concepto, los estudios acerca de interacciones bióticas se basaron en interacciones tróficas (sobre todo de depredador-presa).

centro de la brújula representaba neutralidad (0,0), cuyo alejamiento genera un aumento en la magnitud y las agujas poseían dirección particular, lo que describe una interacción (**Figura 1A**). Actualmente comprendemos que las interacciones varían en espacio y tiempo, en un fenómeno que podemos ilustrar como continuo (Holland & DeAngelis, 2009; Pringle, 2016; Hoek *et al.*, 2016), en un espectro que tiene un extremo negativo (competencia) y otro positivo (mutualismo/cooperación) pasando por todas las combinaciones posibles de resultados en un contexto dado (**Figura 1B**).



**Figura 1.** Esquemización de las interacciones bióticas. **A)** Coacciones en brújula, variación de las interacciones por pares en grados: 180° cooperación y 0° competencia (modificado de Lidicker, 1979). **B)** Continuo de interacciones, donde podemos observar que puede variar hacia el extremo derecho a modo de mutualismo y cooperación o hacia el extremo izquierdo en interacciones antagonistas y competencia (modificado de Little *et al.*, 2008 & Friedman & Gore, 2017).

Después de que se discutiera el estudio ecológico de las interacciones, hacía falta entender qué realmente era una interacción y cómo clasificarla conceptualmente. En primera instancia, las interacciones bióticas se definen como aquellas relaciones entre dos o más organismos dentro de una comunidad que incluyen efectos positivos (mutualismo), neutros (para ambas partes: neutralismo; para al menos una de las partes: comensalismo y amensalismo) o negativos (competencia y antagonismo) para uno, ambos o un tercer interactuante (Del Val y Boege, 2012; Hembry & Weber,

2020). Los efectos pueden manifestarse a nivel de individuo (en su comportamiento, fisiología y/o la adecuación) asimismo, se observan a nivel poblacional (como en el aumento/disminución de la tasa de crecimiento poblacional) e incluso de forma evolutiva (por ejemplo, por selección natural) (Del Val y Boege, 2012). Entre otros aspectos, también podemos clasificar las conexiones entre los organismos según su relación, las cuáles pueden ser intraespecíficas (organismos de la misma especie) o interespecíficas (organismos de distintas especies).

Por mucho tiempo se ha discutido el cómo cuantificar las interacciones. Generalmente cuantificamos las interacciones en términos de aquellas que promueven o que impiden el crecimiento. Sin embargo, en el universo del mutualismo muchos estudios suelen hablar de costos y beneficios, los cuales son pensados principalmente en el metabolismo de los socios que repercute directamente en la tasa de crecimiento y/o el éxito reproductivo, éstos varían en el espacio-tiempo debido a: los propios organismos, la dinámica de la interacción y dependen del contexto ecológico en que se desarrollan. El identificar costos y beneficios en una interacción cual sea que fuese no disminuye la dificultad de estudiarlas. Es común reducir la complejidad a partir los efectos de las interacciones por pares ya que es la forma más sencilla de estudiarlas y en cierto sentido nos permite predecir comportamientos de mayor orden (**Figura 1**).

El mutualismo es una interacción donde hay un mutuo beneficio (+), es decir, se trata de mutualismo sólo cuando el beneficio de la interacción excede el costo para ambos socios (Bronstein, 2001). En el sentido mutualista se entiende como beneficios a los bienes y servicios obtenidos en una interacción que aumentan el crecimiento mientras que el costo es similar a una inversión energética con la intención de obtener dicho beneficio (Holland, DeAngelis & Bronstein, 2002). Podemos encontrar

en la naturaleza una variedad de mutualismos, en el suelo por ejemplo la red de interacciones de mutualistas microbianos que invierten en proveer fuentes asimilables de nitrógeno (bacterias fijadoras de nitrógeno) y fósforo (micorrizas) mientras que las plantas les permiten residir dentro o sobre sus raíces y muchas veces les proveen de fuentes de carbono (Van Der Heijden, Bardgett & Van Straalen, 2008). Por otro lado, en poblaciones clonales comúnmente nos referimos a las interacciones donde ambos interactuantes son igualmente beneficiados con el término de cooperación (Friedman & Gore, 2017).

En cambio, respecto a los efectos negativos (-), en el caso de competencia, donde al igual que la definición de mutualismo, podemos pensar que se trata de una interacción más costosa y sin beneficio para los interactuantes. Desde la teoría de evolución por selección natural, se le ha dado un especial énfasis a la competencia ya que concuerda con la idea de la lucha por la sobrevivencia, es por ello, por lo que suponemos que los organismos en competencia tienen limitación de algún recurso que les impide crecer o reproducirse (Gaxiola & Armesto, 2012), por lo tanto, el uso de recursos indispensables para sobrevivir está compartido entre los organismos, es decir, tienen un nicho superpuesto. Entendemos por recurso a cualquier cosa obtenida del ambiente, usado por los organismos para mantenerse y crecer (Ricklefs, 2008; Miller & Spoolman, 2009), es finito y varía en el espacio y tiempo. La teoría predice que dos organismos al competir por un mismo recurso en un ambiente bien mezclado, el competidor dominante provocará la extinción del otro (exclusión competitiva), o bien, en un ambiente estructurado, si la fuerza de competencia es más débil que la competencia intraespecífica entonces ambas poblaciones coexisten (Friedman & Gore, 2017). La competencia la podemos observar en la naturaleza, por ejemplo, en las hierbas de los bosques, que, por el dosel de los grandes árboles, la luz se vuelve ese recurso limitante (Boege & Del Val, 2011). Por otro lado, la

competencia entre procariontes, la podemos encontrar más despiadada, ya que la evolución ha generado el desarrollo de un arsenal de trucos antimicrobianos como: metabolitos secundarios, enzimas extracelulares y antibióticos (Feichtmayer, Deng & Griebler, 2017), usualmente denominamos a este tipo de competencia por interferencia (Little *et al.*, 2008).

El antagonismo es otra de las interacciones donde de un lado hay efectos negativos, uno de los interactuantes se beneficia por tener un costo bajo mientras el otro tiene un costo más grande y un beneficio nulo o casi nulo; la depredación (consumo de un organismo), herbivoría (interacción planta-animal, donde la planta es consumida parcialmente) y el parasitismo (organismo que reside en otro organismo y se beneficia de sus recursos) son tipos específicos de esta interacción.

Se habla de neutralismo cuando ninguno de los interactuantes tiene efectos ni positivos ni negativos; por otro lado, en una interacción donde uno de los interactuantes parece ser neutral puede que el otro posea un costo más grande que un beneficio (amensalismo) o bien un beneficio y costo menor (comensalismo).

Actualmente, sabemos con gran certeza que ningún ser vivo en la Tierra está aislado, las interacciones son la base de lo que conocemos como biodiversidad, desde la arquitectura primaria de los ecosistemas dentro de la dinámica de sus comunidades hasta su evolución (Jordano, 2016; Andersen *et al.*, 2018). Por lo tanto, las interacciones bióticas son de suma importancia para los ecosistemas, cimiento de todas las relaciones tróficas y por ende impulsoras de los flujos de materia y energía en los ecosistemas (Andersen *et al.*, 2018), asimismo, participan directa e indirectamente en los ciclos de los nutrientes, biogeoquímicos y la formación del suelo (Van Der Heijden, Bardgett & Van Straalen, 2008). Los estudios encaminados a entender en su totalidad las interacciones bióticas proveen luz para abordar la

conservación, restauración y utilidad del funcionamiento de las comunidades; desde este enfoque se pueden obtener avances significativos en las dinámicas de las comunidades que afectan procesos de orden particular en el sentido de la salud pública, del funcionamiento de los sistemas agrícolas y la susceptibilidades de los diferentes ecosistemas cuando se ven debilitadas las interacciones bióticas.

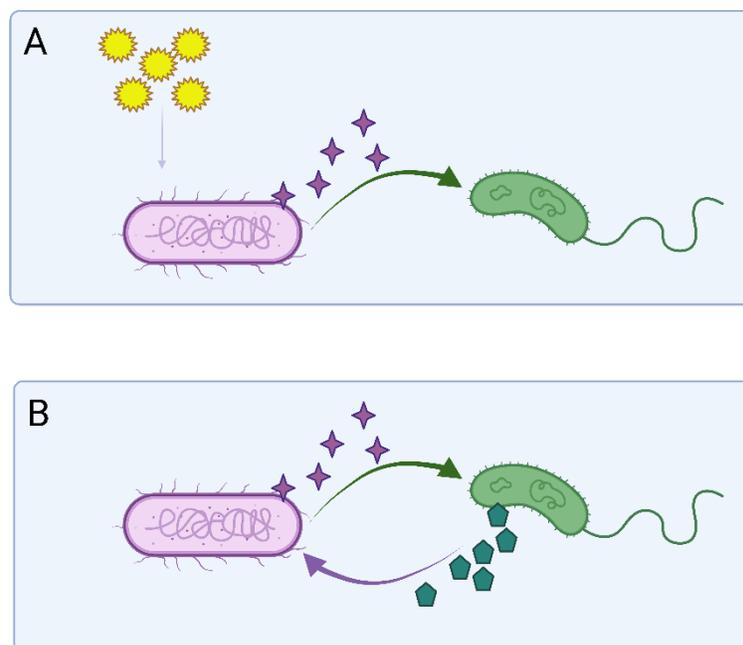
Aquí hablamos de comunidades microbianas en términos del arreglo de varias poblaciones que ocupan un espacio simultáneamente (Little *et al.*, 2008). El estudio de comunidades ofrece una oportunidad para describir con cierta facilidad cómo la complejidad del grupo se ve afectada por cambios en los factores biológicos, químicos y físicos. Para estudiar las comunidades microbianas es indispensable entender sus propiedades, estructura (qué miembros hay y sus abundancias) y función (la dinámica de las poblaciones y su respuesta ante la variación ambiental) (Little *et al.*, 2008). En ambientes naturales tan complejos como en el microbioma, donde se alberga comunidades ampliamente diversas de microorganismos, podemos observar que el papel de las interacciones provee efectos a una escala mayor, por ejemplo: sobre la salud del hospedero (Baumgartner *et al.*, 2020). Asimismo, como en cualquier ecosistema, en el microbioma intestinal las interacciones bióticas son la fuerza motora del funcionamiento del sistema digestivo. El intercambio metabólico es esencial para el microbioma, ya que se sabe que los miembros de la comunidad son en su mayoría auxótrofos, organismos que no pueden sobrevivir por sí solos en medios mínimos ya que requieren del suministro externo de nutrientes esenciales. Se sabe que las bacterias del intestino humano pueden obtener aminoácidos de la dieta del hospedero o bien de su síntesis por parte de otros miembros de la comunidad (Zengler & Zaramela, 2018). En el siguiente apartado profundizaré específicamente en este tipo de interacciones.

## 2. Interacciones metabólicas

El intercambio metabólico es común en las comunidades microbianas naturales, ya que sólo a través del intercambio de metabolitos pueden las especies completar juntas patrones metabólicos indispensables para su supervivencia. En la naturaleza los organismos frecuentemente son expuestos a recursos que no pueden metabolizar por falta de capacidad enzimática por lo que requieren que otro organismo les provea del producto que sí puedan asimilar, dada esta necesidad surge la alimentación cruzada (*cross-feeding* en inglés) o sintrofía. La alimentación cruzada es una interacción en la cual un organismo utiliza los bioproductos metabólicos de otro como recurso para crecer (Daniels *et. al* 2022). Las bacterias tienen la capacidad metabólica de sintetizar docenas de bioproductos con los que entablan relaciones con otros miembros de la comunidad. A pesar de que los metabolitos intercambiados representan grandes beneficios para sus socios, los productores de dichos metabolitos están sujetos a la inestabilidad entre costo-beneficio energético de la síntesis de estos bioproductos. Entre los bioproductos que las bacterias pueden sintetizar, destacan los aminoácidos. Experimentos realizados con cepas auxótrofas a aminoácidos nos proveen de evidencia sobre cómo el consorcio o las comunidades mantienen estabilidad de su cooperación en cocultivo (Mee *et al.*, 2014; Reyes-González *et al.*, 2022).

En la alimentación cruzada también se puede hablar de una cierta direccionalidad de la interacción metabólica (Smith, 2019) (**Figura 2**). La direccionalidad se refiere a que el intercambio de los bioproductos puede ser unidireccional o bidireccional. Unidireccional o facilitación se da cuando un organismo recibe el beneficio accidentalmente, por ejemplo, cuando una bacteria se alimenta de un sustrato como propionato convirtiéndolo en acetato expulsando hidrógeno como metabolito secundario, el cuál es convenientemente usado por otro miembro del consorcio

(Morris *et al.*, 2013; Seth & Taga, 2014) (**Figura 2A**). La bidireccionalidad se desarrolla cuando existe una fuerte sintrofia, caracterizada por un mutualismo obligado, o una alimentación cruzada mutua (Smith, 2019) entre dos o más socios. La direccionalidad implica que los socios comparten costos y beneficios del intercambio metabólico (bidireccional) (Sanch, 2004) o bien que uno de ellos cargue con los costos sin beneficio alguno como un comportamiento meramente altruista (Pande *et al.*, 2016) (**Figura 2B**).



**Figura 2.** Alimentación cruzada en un consorcio de dos cepas bacterianas. **A)** Alimentación cruzada unidireccional o facilitación, donde la bacteria morada metaboliza el sustrato amarillo y como desecho secreta el metabolito morado que es aprovechado por la bacteria verde. **B)** Alimentación cruzada mutua o sintrofia, donde ambas bacterias comparten metabolitos indispensables para su supervivencia.

El *cross-feeding* bidireccional estrictamente hablando es un comportamiento cooperativo. Desde el surgimiento de la definición, actualmente se entiende como cooperación a la interacción entre miembros de la misma especie que obtienen mediante su interacción sintrófica retroalimentación positiva en su *fitness* (Friedman & Gore, 2017; Tarnita, 2017). Por otro lado, cooperación entre diferentes especies

puede caer en la “*Tragedia de los comunes*”<sup>2</sup> cuando una de las especies actúa como una tramposa (West *et al.*, 2006), no obstante, existe verdadera cooperación sólo si los beneficios son mutuos entre los cooperantes. En una relación cooperativa los productos metabólicos intercambiados pasan a ser en la mayoría de los casos bienes públicos, esto quiere decir que están libremente disponibles en el medio sintetizado por un cooperado favoreciendo a todas las células vecinas. La gran mayoría de los productos metabólicos, como los aminoácidos, son energéticamente costosos, sin embargo, la interacción de cooperación es capaz de sobrellevar el costo individual de la producción de los bienes públicos debido a los beneficios sociales derivados de la interacción con el socio cooperador (Tarnita, 2017).

Desde el surgimiento del término sintrofía, en la década de 50’s, grupos de científicos comenzaron a plantear preguntas alrededor de este tipo de interacción. Actualmente se sigue una creciente producción científica del tema, estudios de la última década en consorcios sintéticos han permitido indagar más acerca del establecimiento de *cross-feeding*, así como los costos-beneficios de la producción de aminoácidos como bienes públicos (Mee *et al.*, 2014; Hoek *et al.*, 2016; Reyes-González *et al.*, 2022) otros estudios enfocados en comunidades sintéticas han estudiado componentes ecológicos que permiten el establecimiento y mantenimiento de interacciones de *cross-feeding* (Pande *et al.*, 2016; Germerodt *et al.*, 2016; Adamowicz *et al.*, 2018; Dal Co *et al.*, 2020).

---

<sup>2</sup> La “tragedia de los comunes” es una parábola descrita por el matemático William Foster (1833). Acerca de este asunto Garrett Hardin (1968) escribió un ensayo científico titulado *The Tragedy of the Commons* para argumentar en distintos niveles de organización los efectos de la optimización de los recursos disponibles (Zamora-Muñoz, 2019). Hardin plantea un discurso donde una tragedia de los comunes se genera cuando una población por ejemplo de ganado consume un recurso común sin sobrepasar la capacidad de carga, pero de forma egoísta uno o varios de los ganaderos que pastorean el mismo lugar incrementan sus ganados produciendo un sobrepastoreo de la zona y por consiguiente el agotamiento del recurso generando una tragedia (Hardin, 1668).

Los recursos disponibles en el medio ambiente, como lo son los bienes públicos, son a su vez mediadores de las interacciones, es por ello por lo que el *cross-feeding* tiene la capacidad de cambiar la estructura de una comunidad repercutiendo en su estabilidad y función (Herren, 2020). Análisis comparativos de genomas microbianos de muestras ambientales han demostrado que más del 98% de los organismos secuenciados hasta ahora carecen de genes biosintéticos de aminoácidos (Mee *et al.*, 2014; Zengler & Zaramela, 2018), es decir que son más comunes los genotipos auxótrofos que los protótrofos en la naturaleza por lo que el establecimiento de interacciones de *cross-feeding* es más frecuente de lo que antes se pensaba. Lo anterior concuerda con la “Hipótesis de la reina negra”<sup>3</sup>, la cual dicta que en ambientes ventajosos una población tiende evolutivamente a perder o reducir genes, apoyando así la idea de que la selección natural favorece la disminución de funciones biológicas en ambientes donde se puede suplir esta carencia (Smith *et al.*, 2019). En este sentido, la evolución permite generar comunidades con interacciones metabólicas cada vez más complejas, con más conexiones, por ello es importante tener en cuenta parámetros como: las relaciones costo-beneficio, la disponibilidad ambiental de los recursos y el grado de estructura ambiental (Germerodt *et al.*, 2016).

---

<sup>3</sup>La “Hipótesis de la reina negra” fue planteada por Morris y colaboradores (2012), pensándola como el juego de cartas inglesas donde hacen referencia a la *Reina de Espadas* análoga a ciertas funciones biológicas. Estos autores sugieren que existe una ventaja selectiva que dirige a algunos miembros de la comunidad a perder genes que proveen de ciertas funciones biológicas mientras otros organismos mantienen dichos genes (a estos miembros de la comunidad se les denomina *helpers*). Los miembros que pierden genes tienen asociado una ventaja en su *fitness* derivado de perder una función costosa y al beneficiarse de los bienes públicos de los *helpers*. El *fitness* es dependiente de la frecuencia, lo que implica que cuando hay menos *helpers* en la comunidad entonces en el futuro no existirá pérdida de dichos genes previniendo así la extinción de la función. Además de la pérdida de genes, la hipótesis predice que existe un subconjunto de la comunidad, los *helpers*, que pueden mantener la función (Morris *et al.*, 2012).

### 3. Ambientes espacialmente estructurados

Cuando la cooperación se establece viene consigo un conjunto de factores que poseen un rol determinante en el mantenimiento de la interacción, un factor como estos es la estructura del medio. Se entiende como estructura espacial al conjunto de propiedades físicas del medio ambiente que permite a las células agruparse y difundir bioproductos, o bien también se entiende como resultado del aumento del crecimiento de diferentes genotipos dentro de un parche ambiental (Yanni *et al.*, 2019). Se habla de ambientes no estructurados a aquellos medios acuosos con constante agitación, por ejemplo: comunidades planctónicas y medios de cultivo líquido, que no permiten la agrupación de las células y generan una difusión alta de los metabolitos, es decir que existe una homogeneidad en la distribución de los recursos, mientras que, en un medio estructurado, por ejemplo en el intestino de los mamíferos y medios de cultivo sólido, permiten la agrupación celular y presentan una difusión baja y localizada de los metabolitos (Smith *et al.*, 2019) por consiguiente, hay heterogeneidad en la distribución de los recursos. Por otro lado, una característica crucial de cualquier sistema ecológico estructurado espacialmente es el rango de interacción (Estrela & Brown, 2013; Dal Co *et al.*, 2020).

Se sabe que las poblaciones en el medio natural raramente están bien mezcladas, cada población dentro de una comunidad tiende a estructurarse en el espacio (Yanni *et al.*, 2019). Existen comportamientos microbianos que generan directamente una estructura espacial: como la migración activa por una señal común y secreción de matriz extracelular (biofilms). Asimismo, en interacciones de cooperación se ha observado que la estructura espacial puede permitir que las bacterias reduzcan los gradientes de antibióticos locales lo suficiente como para permitir el crecimiento de los socios sensibles (Adamowicz *et al.*, 2018).

La estructura espacial es crucial en la evolución de la cooperación por bienes públicos en el medio natural pues la interacción en el vecindario de células permite mayor contacto entre ellas que en ambientes bien mezclados (Harcombe, 2010; Nadell, Drescher & Foster, 2016; Smith *et al.*, 2019). En experimentos de laboratorio, donde es fácil manipular el espacio donde crecen las bacterias, se ha observado en ambientes bien mezclados, medios líquidos con agitación, en consorcios formados por cepas cooperadoras y no cooperadoras, el *cross-feeding* colapsa posiblemente por la alta difusión de los metabolitos, extendiéndose estos bienes públicos homogéneamente, permitiendo ser en gran parte aprovechados por las poblaciones no cooperadoras (Pande, 2016). Por otro lado, en espacios estructurados, se ha demostrado que el *cross-feeding* interespecífico e intraespecífico es muy fuerte debido principalmente a la baja difusión del bien público, permitiendo que la cooperación se restrinja a los fenotipos cooperadores fortaleciendo la interacción (Germerodt *et al.*, 2016). La organización espacial en este sentido permite que los consorcios donde conviven cooperadores y no cooperadores se organicen de tal forma que los cooperadores desplazan a los no cooperadores hacia la periferia (Pande, 2016; Germerodt *et al.*, 2016). Por lo tanto, con lo anterior resaltamos la importancia que juega la segregación poblacional y las tasas de difusión establecidas en el intercambio metabólico, así como consecuencia la función emergente y la estructura espacial de las comunidades (Estrela & Brown, 2013).

## 4. Antibióticos

Se define como antibiótico a cualquier molécula producida por varios microorganismos que actúa como toxina en contra de otros microorganismos (Nadell, Drescher & Foster, 2016), algunos de estos antibióticos han sido producidos industrialmente como fármacos para el tratamiento de infecciones microbianas. La acción de los antibióticos se basa en inhibir a los organismos más susceptibles y seleccionar a los resistentes, después éstos se propagan. Por consiguiente, los antibióticos resultan importantes presiones de selección (Lipsitch & Samore, 2002).

Cuando se habla de antibióticos es común utilizar los términos como resistencia, susceptibilidad y tolerancia. Se denomina resistencia a la habilidad inherente, en la mayoría de los casos, de los microorganismos de crecer en altas concentraciones de antibiótico (Brauner *et al.*, 2016). También se sabe que las bacterias adquieren resistencia a ciertos antibióticos intrínsecamente, pero además pueden adquirir resistencia a través de mutaciones en genes cromosómicos (Toprak *et al.*, 2011; Blair *et al.*, 2015), asimismo, tiene la ventaja de ser una estrategia móvil, por lo que genes de resistencia se pueden transferir horizontal y verticalmente por medio de elementos genéticos móviles (bacteriófagos, plásmidos, DNA desnudo o transposones). Por otro lado, la tolerancia se refiere a la habilidad temporal de sobrevivir al antibiótico suministrado (Brauner *et al.*, 2016). Mientras que la susceptibilidad es la incapacidad de los microorganismos de crecer en presencia de un antimicrobiano.

Los antibióticos tienen un sistema de acción particular dependiendo del efecto que produzcan en las células: bacteriostático o bactericida. Se consideran antibióticos

bacteriostáticos a todos aquellos que inhiben la síntesis de proteínas, mientras que los bactericidas matan a las células directamente. Asimismo, se tiene evidencia de que un bacteriostático puede pasar a ser un bactericida, sólo si el antibiótico inhibe suficientes ribosomas impidiendo sintetizar las proteínas esenciales para la supervivencia provocando muerte celular (Baquero & Levin, 2021).

El uso de los antibióticos es la aplicación científica más transformativa en la vida del ser humano, ya que debido a los antibióticos se han controlado infecciones bacterianas que antes de la era previa a su descubrimiento provocaban la muerte (Cook & Wright, 2022). El lado negativo de la historia es el aumento de la resistencia a los antibióticos, pues a nivel mundial cada vez se utilizan mayores cantidades de antimicrobianos en el tratamiento de infecciones bacterianas en el ser humano, en animales y en la agricultura. La resistencia bacteriana a los antibióticos constituye un grave problema de salud pública, ya que se ha observado que varios patógenos ahora son multidroga-resistentes (Adamowicz *et al.*, 2018). El problema continúa no solo por la acción directa seleccionando a las comunidades resistentes en un entorno dado, sino también, gran parte de los antibióticos que son desechados al medio natural ejercen la misma presión de selección debido a que persisten en gran parte intactos, se han reportado con mayor frecuencia antimicrobianos en aguas residuales, generando cada vez más una selección ambiental de organismos resistentes a los antibióticos (Levy & Marshall, 2004). Por ello es importante considerar además del trasfondo molecular de los antibióticos, los efectos que generan a nivel ecológico y principalmente en la dinámica de las interacciones.

#### 4.1. Cloranfenicol (CHL)

En bacterias, el ribosoma (70S) es un complejo conformado de dos subunidades de ribonucleoproteínas: subunidades 50S y 30S (Kohanski, Dwyer & Collins, 2010). Como ya se mencionó antes, los antibióticos bacteriostáticos tienen como blanco el ribosoma, un ejemplo es la acción del antibiótico cloranfenicol (CHL).

El cloranfenicol (CHL) es un bacteriostático aislado de *Streptomyces venezuelae* (1947) (Schwarz *et al.*, 2004). El mecanismo de acción de este antibiótico es atravesar la membrana celular para llegar a su objetivo, la subunidad 50S ribosomal, e inhibir la peptidiltransferasa (Schwarz *et al.*, 2004; Kohanski, Dwyer & Collins, 2010), con lo que impide la transferencia de aminoácidos y la formación de enlaces peptídicos, y, asimismo, la formación de péptidos y proteínas. El espectro de ataque abarca grampositivas y gramnegativas, aerobias y anaerobias, así como clamidias, micoplasmas y rickettsias (Schwarz *et al.*, 2004).

Mediante análisis fenomenológico (Smith *et al.*, 2010) de forma experimental y con un modelo proteómico (Reyes-González, 2022), se ha observado modificaciones en la producción de proteínas posteriores a la exposición de dosis subletales de CHL generando importantes implicaciones en el reacomodo del proteoma.

## Pregunta de investigación

¿La estructura espacial disminuye la susceptibilidad a un antibiótico bacteriostático en un consorcio sintrófico?

## Hipótesis

La estructura espacial favorece la cooperación en comunidades bacterianas con intercambio metabólico. Podemos modificar la interacción por medio de la suplementación del recurso limitante en el medio, en medios mínimos el consorcio coopera, en contraste, con medios ricos donde el consorcio compete. Esta interacción dinámica tiene un efecto en la susceptibilidad a antibióticos. En un gradiente de presiones de selección entre más cooperativo es el consorcio más tolerancia tiene al antibiótico.

## Objetivos

### Objetivo general

Modelar computacional y experimentalmente la dinámica de un consorcio sintrófico con estructura espacial que contempla dos poblaciones expuestas a medios con y sin suplementación de aminoácidos, y presiones de selección producidas por distintas concentraciones de antibiótico bacteriostático.

## Objetivos particulares

- Construir un modelo computacional basado en agentes individuales que simule la dinámica de dos bacterias auxótrofas en distintos medios espacialmente explícitos.
- Evaluar las mismas condiciones del modelo computacional de forma experimental.
- Comparar los resultados de ambos modelos.

## Antecedentes

En la última década se han realizado varias investigaciones que buscan encontrar los principios rectores que rigen a las comunidades microbianas, y así indagar más sobre su trasfondo ecológico. Dada la gran complejidad de las comunidades naturales se ha optado por la ecología sintética, la cual brinda la oportunidad de utilizar consorcios y comunidades sintéticas. Las investigaciones en este campo han puesto en evidencia que el intercambio metabólico es un factor mediador en la composición de las comunidades y consorcios (Harcome, 2010; Mee *et al.*, 2014; Germerodt *et al.*, 2016; Hoek *et al.*, 2016; Adamowicz *et al.*, 2018; Dal Co *et al.*, 2020; Reyes-González *et al.*, 2022). Por otro lado, la biología sintética ha echado mano de herramientas de modelación que han permitido predecir comportamientos colectivos que nos acercan cada vez más a la realidad de las comunidades (Gorochowski, 2016). En este apartado abordaré los principales trabajos de investigación que se han realizado en base a las interacciones en consorcios microbianos, así como de la modelación basada en agentes con los mismos fines.

Se sabe que, en medios sin estructura espacial, es decir típicamente en medio líquido, las poblaciones están bien mezcladas por lo que cada individuo tiene la misma probabilidad de interactuar mediante bienes públicos. En este sentido, Mee y colaboradores (2014) demostraron que particularmente el intercambio metabólico de aminoácidos es un comportamiento extendido en la naturaleza, y por medio de consorcios sintéticos con tercias de cepas de *Escherichia coli* auxótrofas a distintos aminoácidos comprobaron que las bacterias con múltiples auxotrofías dependen del *cross-feeding* para sobrevivir. En un trabajo similar, pero con auxótrofas de *Saccharomyces cerevisiae*, Hoek y colaboradores (2016) realizaron un estudio donde describen la dinámica de la interacción en medio heterogéneo de un par de levaduras cada una auxótrofa a un aminoácido (leucina y triptófano) pero sobre

productora del aminoácido de su socio. Ellos observaron que, dependiendo del ambiente, de un medio mínimo cada vez más enriquecido con aminoácidos, la interacción transitaba de mutualismo obligado hacia el extremo de exclusión competitiva, demostrando así que las interacciones cambian dependiendo del efecto combinado de la disponibilidad de nutrientes y la dinámica de las poblaciones.

En lo que a estructura espacial se refiere, Germerodt y colaboradores (2016) estudiaron seis genotipos computacional y experimentalmente, bacterias mutantes de *E. coli* entre ellos auxótrofos y/o sobre productores de arginina y leucina, en ambientes estructurados espacialmente muestran una fluctuante disponibilidad de nutrientes cuya función es seleccionar una pérdida de genes biosintéticos cuando los metabolitos correspondientes están suficientemente disponibles en el ambiente, además confirmaron que se favorece el *cross-feeding* cuando los metabolitos son escasos o nulos. Asimismo, Dal Co y colaboradores (2020) cuyo objetivo fue determinar el rango de interacción de su consorcio de auxótrofas de *E. coli* a prolina y triptófano, mostraron que agregados celulares más densos tienden a tener interacciones célula-célula, por consiguiente, la densidad celular es un parámetro importante que modula las interacciones. Además, observaron que los rangos de interacción dependen de la diferencia en las tasas de absorción, las tasas de exportación y las constantes de difusión de los aminoácidos que intercambian.

Los resultados de Adamowicz y colaboradores (2018) sugieren que el *cross-feeding* altera la tolerancia a los antibióticos. Estudiaron el efecto de los antibióticos en las interacciones de *cross-feeding* en una comunidad de tres especies diferentes bajo tetraciclina y ampicilina tanto en medios líquidos y sólidos. Los autores infieren que, en cooperación, la tolerancia de la comunidad, es decir la concentración mínima para inhibir el crecimiento del consorcio se determina por la tolerancia del *eslabón más*

*débil* (el socio menos tolerante). Además, confirman que la estructura espacial puede permitir a las bacterias sensibles crecer localmente en un menor gradiente de antibiótico.

Con el avance tecnológico hoy en día podemos formular predicciones con modelos basados en agentes<sup>4</sup> (ABM, por sus siglas en inglés) e incluso predecir resultados aún no probados experimentalmente (Hellweger *et al.* 2016). ABM es una técnica computacional que modela una colección de entidades autónomas de toma de decisiones llamadas agentes en base a un conjunto de reglas dentro de un entorno virtual (Bonabeau, 2002).

Los agentes pueden configurarse según reglas de comportamiento, de interacción y propiedades del sistema. Las propiedades incluyen biomasa, tamaño o estado fisiológico de cada individuo; por otro lado, tenemos comportamientos que incluyen obtención de sustratos del ambiente o síntesis de nueva biomasa; y, las interacciones pueden ser de carácter competitivo, sinérgico o parasitario entre los individuos de una población o una comunidad (Hellweger *et al.* 2016). En biología, particularmente en ecología de comunidades bacterianas se requieren enfoques como el de ABM, ya que permite comprender las propiedades intrínsecas de la comunidad, es decir, propiedades que solo surgen en el contexto de colectivo (Stenl kke, *et al.*, 2018). Entre los trabajos previos de modelación con cepas con

---

<sup>4</sup>La invención de la herramienta ABM se remonta desde el estudio de agentes autómatas en la década de los años 40's, en los principios de las ciencias de la computación y de las máquinas auto-replicadas propuestas por von Neumann. Entre las décadas de los 80's y 90's se utiliza por primera vez el término de "agente". Entre los primeros programas utilizados para modelar ABM destaca *NetLogo*. Desde entonces se ha generalizado el uso de ABM en campos como la economía, comportamiento social, ecología, microbiología y la epidemiología (Gorochofski, 2016).

interdependencias metabólicas destacan los de Estrela & Brown (2013), Germerodt y cool. (2016) y Pande y cool. (2016).

En el trabajo de Estrela y Brown (2013) utilizan ABM para modelar una comunidad de dos especies con estructura espacial y funciones que dependen del intercambio metabólico entre las poblaciones de *cross-feeding* unidireccional. En el análisis de sus simulaciones llegaron a la conclusión de la existencia de una fuerte interdependencia metabólica que favorece la emergencia del mutualismo como consecuencia de cómo se mezclaron las poblaciones inicialmente y la difusión de los metabolitos. Otro trabajo es el de Pande y colaboradores (2016) quienes mediante experimentos y un modelo ABM estudiaron las interacciones cooperativas de dos especies auxótrofas que cuando están los socios interactuando con un tercero, no cooperador, tanto sus simulaciones como sus experimentos en caja Petri concuerdan con la segregación del no cooperador.

Todas las investigaciones concluyen que los factores como las interacciones bióticas y abióticas dan forma a las comunidades bacterianas. Las interacciones bióticas dirigen la dinámica de las poblaciones proveyendo de funcionalidad al sistema. Por otro lado, factores abióticos como las características del espacio ambiental tienen efectos sobre la dinámica de las interacciones bióticas. Para la biología es importante contemplar factores que nos ayuden a entender mejor el contexto ecológico y cómo éste influye en la dinámica de las poblaciones para poder posteriormente hacer inferencias a escalas superiores. Apoyarnos en herramientas de modelación computacional como el ABM nos sirve de puente entre comportamientos a nivel individual con aquellos emergentes de forma colectiva en poblaciones y comunidades, al mismo tiempo nos permite abstraer los hechos experimentales o

bien probar las consecuencias de premisas previas, así como exponer las inconsistencias y vacíos de nuestro conocimiento del fenómeno.

Por otro lado, en el laboratorio de Biología Sintética a cargo de la Dra. Ayari Fuentes Hernández, ya existía un precedente del estudio del sistema de auxotrofías realizado por la Dra. Daniela Reyes González (2022) quién encontró que dentro del consorcio la cooperación provee de un aumento en la tolerancia al antibiótico a dosis subletales en ambientes homogéneos, además corroboró que suplementando el medio se favorece el cambio en las interacciones encontrando un continuo que tiende a la competencia en medios con altas concentraciones de aminoácido suplementado. De tal forma que en el laboratorio aún prevalecía la pregunta de si observaríamos el mismo fenómeno en ambientes espacialmente estructurados.

## Métodos generales

En el presente trabajo nos planteamos estudiar la dinámica de dos poblaciones de bacterias auxótrofas en un mutualismo obligado con *cross-feeding* bidireccional en distintos ambientes, desde medio mínimo hasta medio altamente enriquecido con aminoácidos, al mismo tiempo evaluamos cómo responden ante la presión de selección por antibiótico bacteriostático. En dicho sistema enfatizamos el medio físico como la estructura espacial dirige la dinámica de crecimiento de las poblaciones, ya que la difusión de los recursos es baja, dicha cualidad es capaz de regular las interacciones. Nuestra intención con esta investigación es poner en relevancia que el contexto ecológico proporciona una variable fundamental para la sobrevivencia del consorcio.

Para evaluar la importancia de la estructura espacial nos dimos a la tarea de programar un ABM con características simples que nos sirvió para observar la dinámica de modelo de estudio, posteriormente, realizamos experimentos en el laboratorio con dos cepas auxótrofas de *Escherichia coli* con las cuales evaluamos la dinámica de las poblaciones ante altas concentraciones de cloranfenicol (CHL) mediante pruebas de difusión por disco. Con ambos métodos obtuvimos resultados tanto cualitativos como cuantitativos, los cuales al final comparamos (**Figura 3**).

¿La estructura espacial disminuye la susceptibilidad a un antibiótico bacteriostático en un consorcio sintrófico?

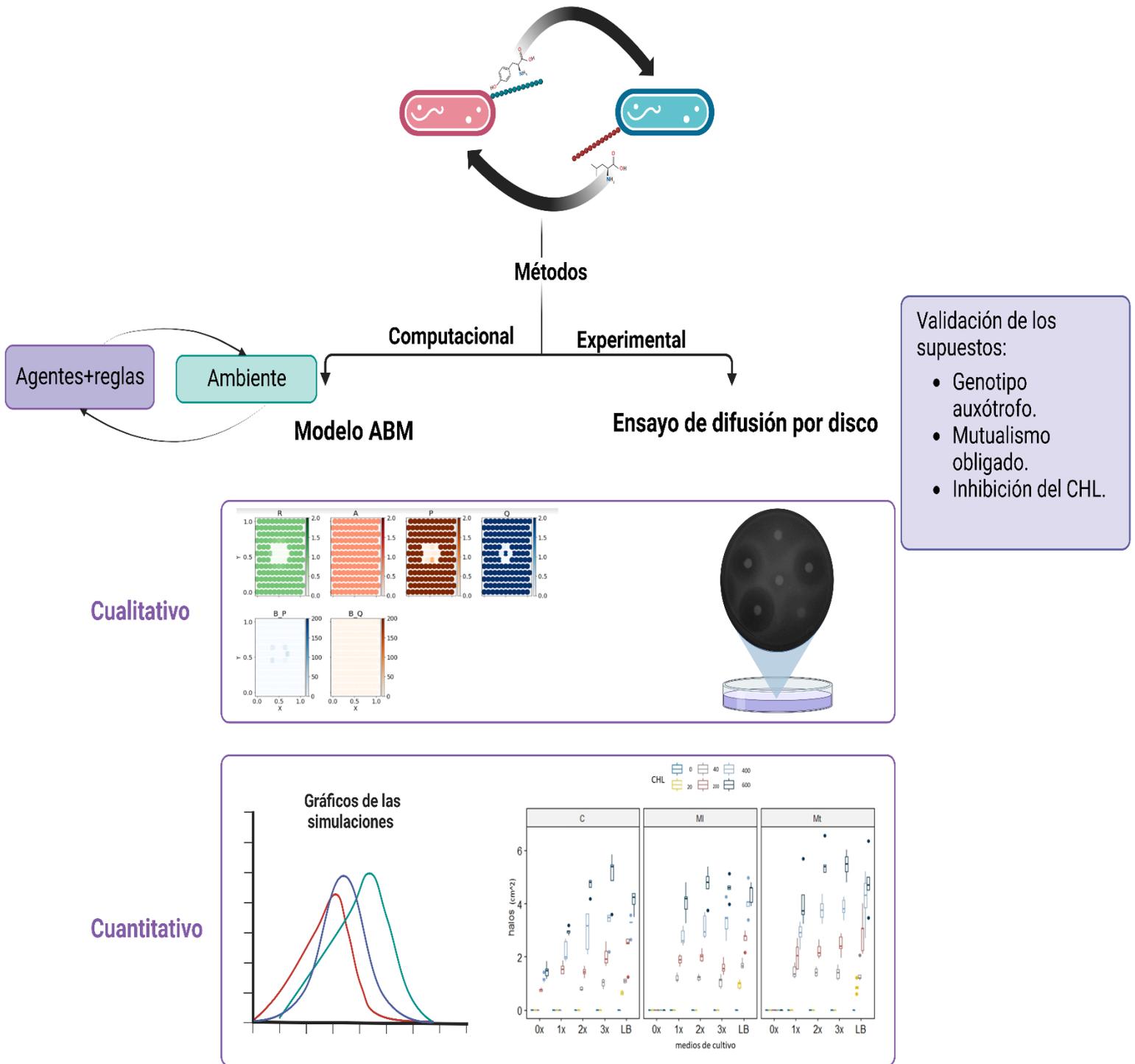


Figura 3. Esquema de los métodos empleados en el presente trabajo.

## Método computacional

Desarrollamos un modelo basado en agentes para medir la dinámica de un consorcio integrado por dos bacterias auxótrofas programadas en medio mínimo, donde las bacterias sólo crecieron en cocultivo, y en medio suplementado a distintas concentraciones de los metabolitos necesarios para su crecimiento, así como con distintos pulsos de antibiótico bacteriostático. Realizamos dichas simulaciones con base a un modelo ABM en Python 3.0 con la interfaz de Google Colab. Para ello, utilizamos las siguientes librerías: *numpy*, *matplotlib.pyplot*, *random*, *seaborn*, *pandas*, *sys* e *imageio*.

Los parámetros utilizados en este modelo, descritos en el **Cuadro 1**, fueron declarados con base a valores numéricos exploratorios con los que medimos la dinámica de los agentes. Se denominó a los agentes como bacterias BQ y BP. Ambas poblaciones coexistieron en el entorno virtual con sólo una fuente de carbono (R). Nuestro consorcio se caracteriza por ser mutualista obligado en *cross-feeding*, lo que implica que las bacterias BQ sintetizan el metabolito Q, pero requieren de la suplementación externa del metabolito P, de forma inversa las bacterias BP producen el metabolito P, pero necesitaron de la suplementación externa del metabolito Q, de tal manera que ninguna de las poblaciones crece sin el recurso que necesitan suplementar (**Figura 4**).

Parámetros	Nombre	Valores numéricos	Definición
<b>c</b>	Tasa de conversión de R	0.05	Qué tan rápido es el metabolismo de la célula para convertir el recurso (R) en ATP.
<b>Vmax</b>	Tasa máxima de consumo	0.4	La velocidad máxima en la que la célula importa un recurso del medio exterior.
<b>Km</b>	Constante media de saturación	1	Constante de saturación implicada en el crecimiento bacteriano (ecuación de Monod).
<b>Amic</b>	Susceptibilidad del antibiótico	1	Valor fijo de susceptibilidad al antibiótico bacteriostático.
<b>Pmax</b>	Tasa máxima de exportación de P	0.05	Cuánto P secreta BP al medio exterior.
<b>Qmax</b>	Tasa máxima de exportación de Q	0.05	Cuánto Q secreta BQ al medio exterior.
<b>T</b>	Tiempo	12	Duración de las simulaciones.
<b>ATPmax</b>	Tasa máxima de ATP	0.00001	Cuánto ATP utiliza la célula.
<b>ROs</b>	Recursos	R= 1 A= 0 a 5 P= 0 a 5 Q= 0 a 5	R son todos los recursos disponibles en el medio externo: R=fuente de carbono, A=antibiótico, P=metabolito P y Q=metabolito Q
<b>diff_coef_Bs</b>	Coefficientes de difusión de las bacterias	0.005	Cuánto se difunde cada bacteria en el medio (parámetro fijo).
<b>diff_coef_Rs</b>	Coefficientes de difusión de los recursos	R= 0.001 A= 0.001 P= 0.0001 Q= 0.0001	Cuánto se difunde cada recurso en el medio (parámetro fijo).
<b>loc_iniCells</b>	Número de células con el que inicia cada simulación	BP= 1000 BQ=1000	Cantidad de bacterias con las que inicia cada simulación.

**Cuadro 1.** Valores numéricos de los parámetros utilizados en las simulaciones.

### "Cross-feeding" obligado

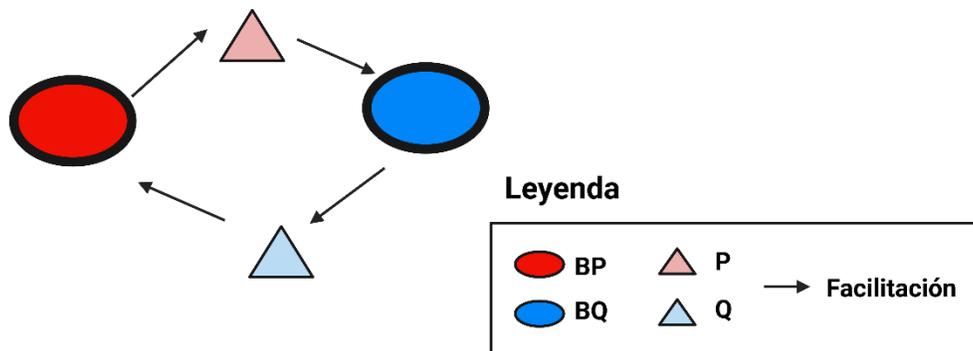


Figura 4. Esquema del modelo ABM.

Para dichos objetos consideramos las siguientes clases: *Bacteria*, *Location* y *World*. En la clase *Bacteria* agrupamos las variables con los respectivos parámetros metabólicos de las células, crecimiento<sup>5</sup> y división celular. En la clase *Location* definimos la locación de cada tipo celular y del recurso, el recurso agrupó a todas las moléculas que se encontraban disponibles y difundidas en el medio ambiente, en este caso fueron: fuente de carbono, antibiótico bacteriostático, metabolito Q y metabolito P. Y la clase *World* cumplió la función de simular el crecimiento bacteriano, constituido por el espacio en gradilla hexagonal y el vecindario de cada célula.

<sup>5</sup> Modelamos el crecimiento bacteriano utilizando la ecuación de Monod:  $\mu = \frac{\mu_i \cdot r_i}{r_i + K_i}$ ; donde  $\mu_i$  representa la tasa máxima de ingreso del sustrato  $i$  a la bacteria, y  $K_i$  la correspondiente constante de saturación (Monod, 1949). Asimismo, el sustrato  $i$  está asociado a una constante que representa la tasa de conversión del recurso en ATP para el crecimiento celular.

Realizamos simulaciones en monocultivo y en cocultivo en distintas condiciones tanto de metabolitos y de antibiótico.

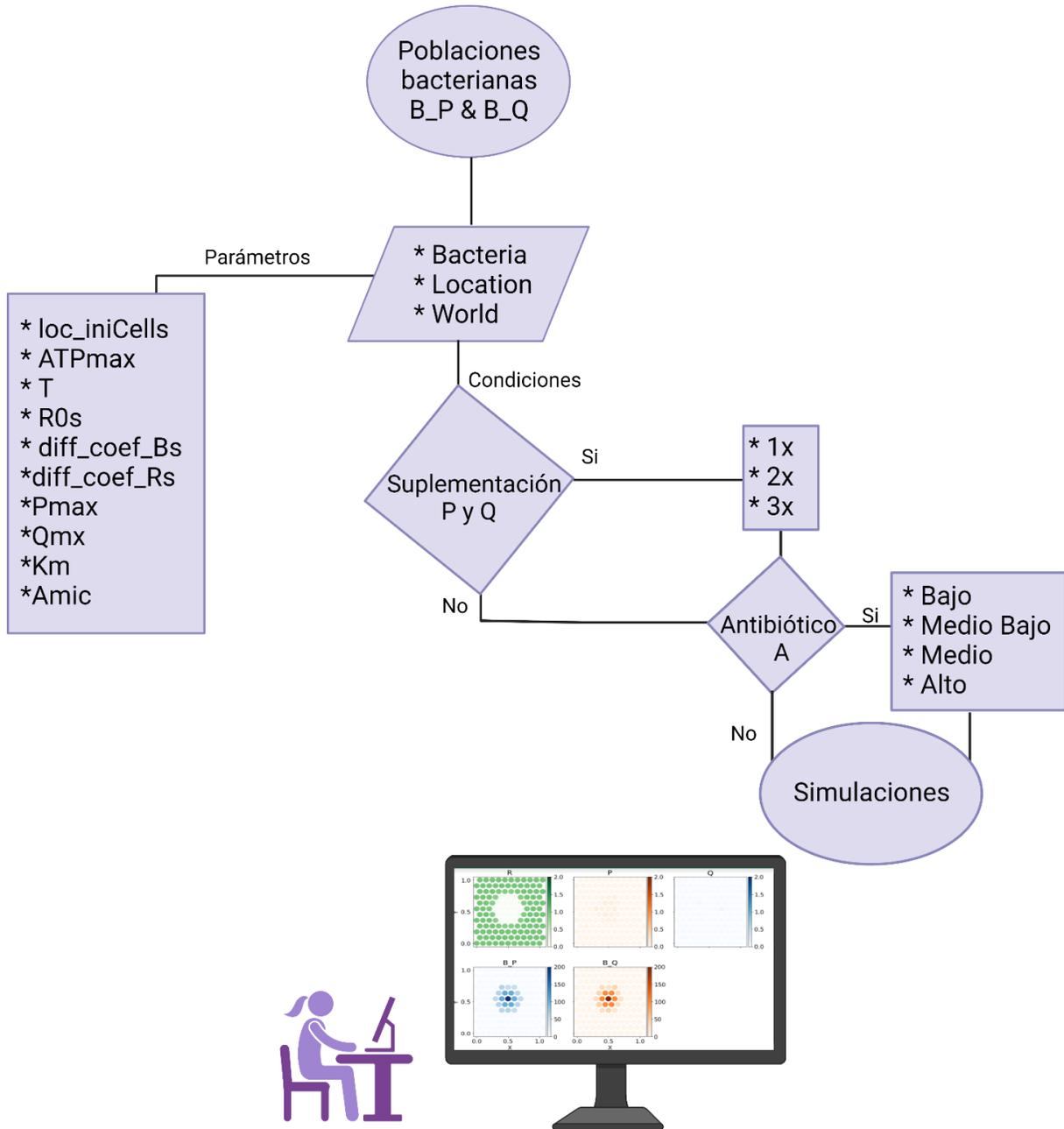
- ☞ Las condiciones con metabolitos P y Q: sin suplementación (P=0 y Q=0) y en distintas concentraciones de los mismos.
- ☞ Simultáneamente las expusimos a condiciones de antibiótico bacteriostático: sin antibiótico (A) y hasta altas concentraciones de antibiótico. Asimismo, para probar concentraciones mayores del antibiótico bacteriostático se definió la concentración mínima inhibitoria (**Amic**) de las poblaciones en 1 unidad.

Se sabe que a medida que la difusión molecular es más rápida se representa medios cada vez más fluidos y, por consiguiente, más homogéneos, es decir, sin una estructura espacial definida, por lo que en medios carentes de agua observamos una lenta difusión<sup>6</sup>. Por lo tanto, para simular un ambiente estructurado, es decir un medio con un mínimo de fluidez, configuramos las simulaciones con los parámetros mostrados en el **Cuadro 1** y **Figura 5**.

---

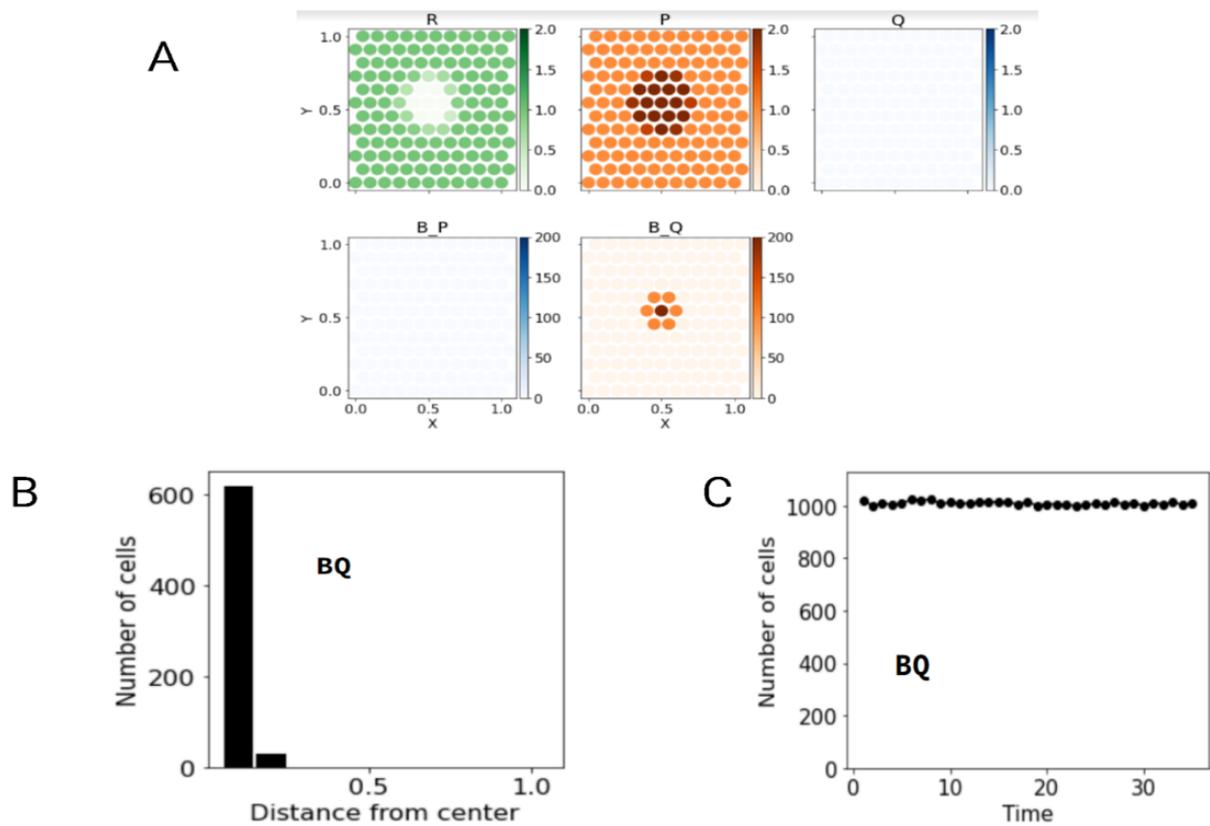
<sup>6</sup> La difusión de sustancias químicas es un factor influenciado por el gradiente de concentración entre dos puntos dados, el medio de transporte (por ejemplo, por flujo de corrientes de agua), la temperatura, el tamaño de las moléculas (por ejemplo, moléculas pequeñas se difunden más rápido porque tienen coeficientes de difusión más grandes), presencia y estructura del medio y por la naturaleza misma de las moléculas. La ecuación básica utilizada para describir la difusión es la ley de Fick:  $J = D \frac{(C_1 - C_2)}{x_1 - x_2}$ ; donde  $J$  es la cantidad de un compuesto que se difunde por unidad de área de tiempo (función del coeficiente de difusión  $D$  [tasa intrínseca de difusión], la diferencia de la concentración  $C$ , y la distancia  $x$  entre los puntos 1 y 2 (Dodds & Whiles, 2010).

Por otro lado, el movimiento de difusión de nuestros modelos en medio sólido fue posible gracias al movimiento aleatorio de las moléculas del medio acuoso del pulso de antibiótico en conjunto pues sus átomos individuales vibran y eventualmente se mueven dentro del material (Wilensky, 2007). Este movimiento se da de regiones de alta concentración a regiones de baja concentración.

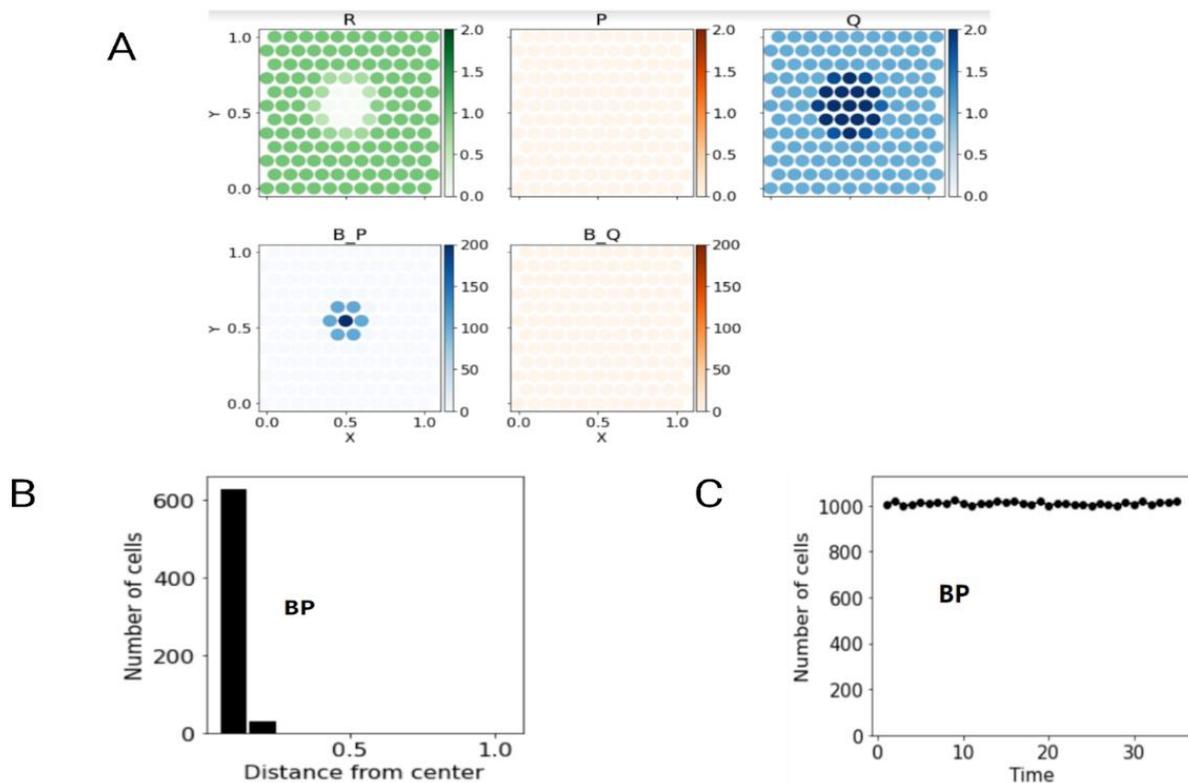


**Figura 5.** Diagrama de flujo que representa los procesos requeridos para la construcción del programa.

Como muestra en las **Figuras 6 y 7**, se observan las simulaciones que representan los crecimientos en monocultivos con suplementación de P y Q.



**Figura 6.** Simulación de Monocultivo BQ en un medio con R y P=1. **A)** Simulación al tiempo final del Monocultivo BQ. **B)** Gráfica del número de células BQ y su distancia al centro. **C)** Gráfica de crecimiento de BQ.



**Figura 7.** Simulación de Monocultivo BP en un medio con R y Q=1. **A)** Simulación al tiempo final del Monocultivo BP. **B)** Gráfica del número de células BP y su distancia al centro. **C)** Gráfica de crecimiento de BP.

En cada simulación generamos imágenes en formato png, de tal forma se recabó la siguiente información: imagen de la última iteración del programa, gráfica de crecimiento de la/las poblaciones bacterianas, gráfica de la distancia de las células al centro del panel en la última iteración (como lo mostrado en las **Figuras 6 y 7**). Asimismo, obtuvimos una animación en formato gif de cada simulación.

## Método experimental

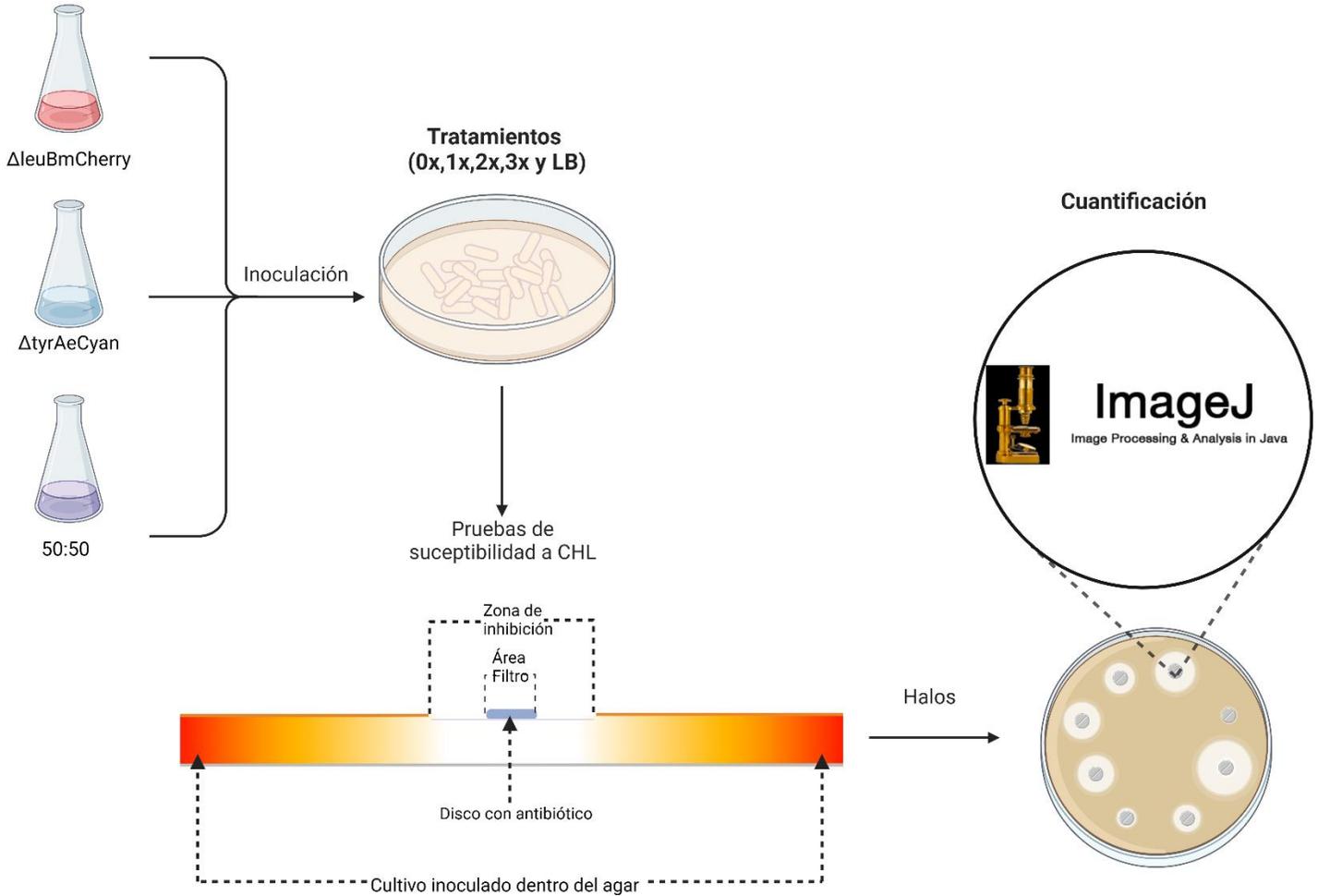
### **Prueba de susceptibilidad en medio espacialmente explícito a distintas concentraciones de CHL**

El principal propósito de estos ensayos fue observar la dinámica de inhibición en medios espacialmente explícitos. Para ello, consideramos inóculos inmersos dentro del agar en monocultivo y cocultivo para las siguientes condiciones: M9 sin suplementación de aminoácidos (0x), M9 con baja suplementación de aminoácidos (1x), M9 con media suplementación de aminoácidos (2x), M9 con alta suplementación de aminoácidos (3x)<sup>7</sup> y medio rico (LB).

El protocolo que usamos para medir la inhibición es el de susceptibilidad a antibióticos por medio de difusión por disco (Hudzicki, 2009). El fundamento de la prueba es la utilización de círculos de papel filtro impregnados de una concentración conocida de antibiótico sobre una caja Petri con medio de cultivo sólido e inoculada previamente con la población o consorcio de interés. La tasa de difusión del antimicrobiano en el agar y el filtro permite generar un gradiente de alta a baja concentración de éste, de tal forma que mientras más próximo al círculo de papel filtro mayor es la concentración del antibiótico. Posteriormente medimos los halos de inhibición a las 24 horas y 72 horas por medio del software ImageJ (**Figura 10**).

---

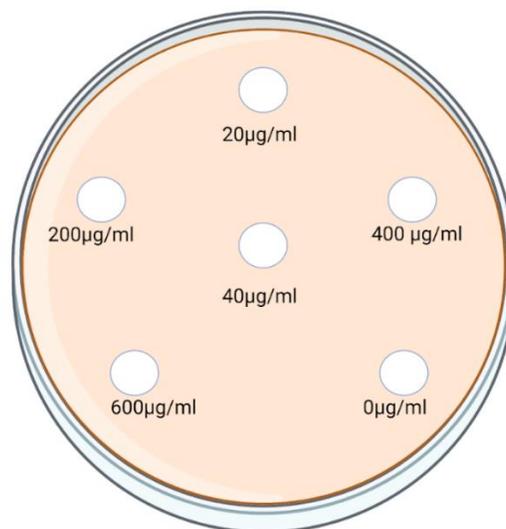
<sup>7</sup>Los anteriores requerimientos de aminoácidos suplementados indican que añadimos 1, 2 y 3 veces la concentración mínima requerida para producir un gramo de peso seco de bacteria. Reyes-González (2022) a partir de la estimación del modelo metabólico de formación de biomasa iML1515 (antes iJO1366) descrito para *E. coli* MG1655 (King et al. (2016)), indicó que el mínimo requerimiento para estas auxotrofías, lo equivalente a 1x, es de leucina = 16.91 mg/L y de tirosina= 7.15 mg/L (Reyes-González, 2022).



**Figura 8.** Prueba de susceptibilidad a CHL. Consiste en tener las células lavadas (monocultivos y cocultivo) para inmersión en agar en las condiciones de: 0x, 1x, 2x, 3x y LB. Después de la inoculación se pone el papel filtro con la concentración de CHL. Posteriormente se observarán los halos que se cuantifican mediante ImageJ.

El protocolo que se ilustra en la **Figura 8** muestra primero que cultivamos las cepas dentro del agar con 500  $\mu$ l de células con absorbancias en un rango de 0.2 a 0.45  $OD_{630}$ . En los cocultivos cuidamos que la diferencia entre las cepas fuera no mayor a 0.005  $OD_{630}$ . La inoculación de las cepas fue dentro del agar, dependiendo la condición, añadimos además de 500  $\mu$ l del inóculo, 4500  $\mu$ l de medio M9 agar con:

200  $\mu$ l sales de M9, 380  $\mu$ l agua destilada estéril, 5  $\mu$ l ampicilina<sup>8</sup> [100  $\mu$ g/ml] (1  $\mu$ l por cada 1 ml de medio), 5  $\mu$ l kanamicina<sup>9</sup> [40  $\mu$ g/ml] (1  $\mu$ l por cada 1 ml de medio), 0.01 g glucosa y 4 ml agar bacteriológico, para suplementar a 1x el medio añadimos 1  $\mu$ l del stock del aminoácido por cada 1 ml del medio y el volumen se lo restamos al volumen total de agua destilada (agregamos lo doble para 2x y lo triple para 3x); para el medio LB agar: 5  $\mu$ l ampicilina, 5  $\mu$ l kanamicina y 4490  $\mu$ l LB agar. Una vez solidificada las células en el agar procedimos a insertar los círculos de papel filtro con las concentraciones de antibiótico (**Figura 9**). Añadimos 20  $\mu$ l de cada concentración de antibiótico CHL al papel filtro. Posteriormente dejamos incubar y tomamos fotos para analizar halos de inhibición en 24 y 72 horas con el dispositivo *Bionic Apparatus For Fluorescent Light Estimation (BAFFLE)* (Tardío *et al.*, 2022). Para poder monitorear el crecimiento tomamos las fotos a las cajas sin la tapa y con envoltura plástica transparente para evitar contaminación.



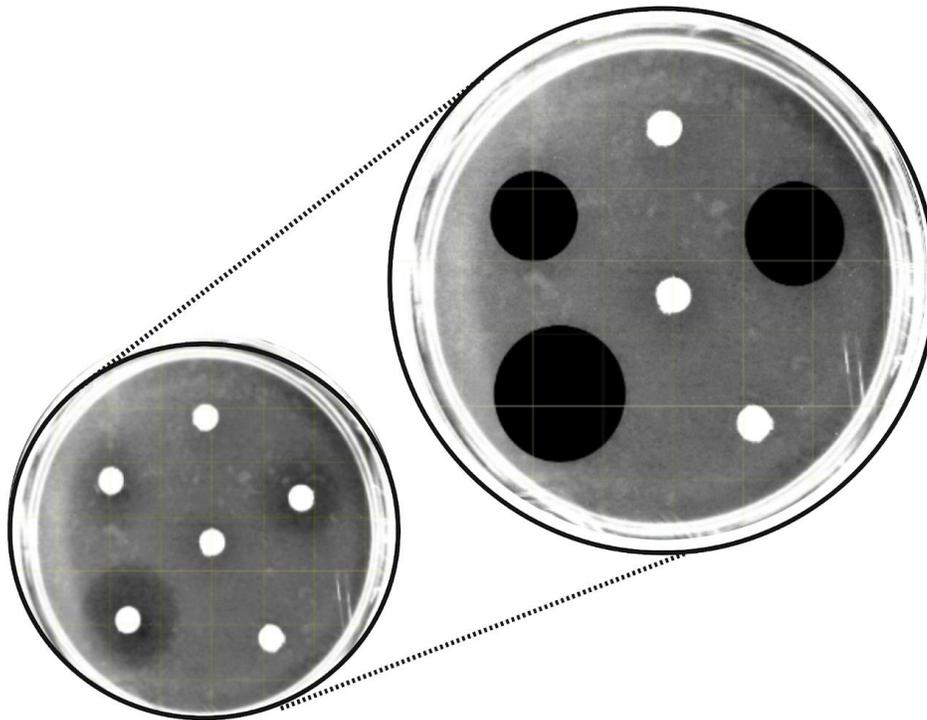
**Figura 9.** Disposición de los papeles filtro para la prueba de susceptibilidad a CHL.

---

<sup>8,9</sup> Se utilizan AMP y KAN a dichas concentraciones debido a que son necesarios para que las cepas mantengan el plásmido multicopia con la proteína fluorescente.

## Análisis de Imagen

Las imágenes las analizamos con ImageJ. Para procesar las imágenes primero medimos las áreas de todos los platos en píxeles. Mediante la fórmula de área de un círculo  $A = \pi r^2$  donde  $r$  es el radio de la circunferencia, sacamos el diámetro en píxeles e hicimos la equivalencia de la cantidad de píxeles por centímetro real del diámetro de la caja Petri (9 cm). Dando como resultado  $452.51 \pm 1$  píxeles por cada centímetro. Una vez configurada la escala de píxeles a cm procedimos a: insertar una gradilla amarilla de  $1.45 \text{ cm}^2$ , homogenizar cada imagen a 16 bits y ajustar el brillo y el contraste para poder distinguir mejor cada halo. Finalmente seleccionamos y medimos el área correspondiente al halo de inhibición (**Figura 10**). Este procedimiento lo repetimos para 5 réplicas por tratamiento.

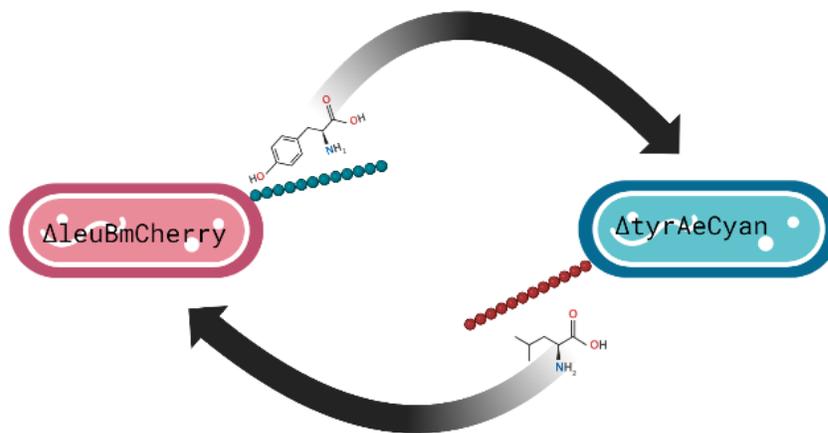


**Figura 10.** Análisis de imagen con ImageJ. Medimos áreas de inhibición para cada imagen (se ejemplifica con áreas en color negro).

## Validación experimental

### Características del consorcio

Utilizamos como modelo experimental dos cepas de *Escherichia coli* provenientes de la colección *Keio* (Baba *et al.*, 2006), cada cepa con una delección de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos esenciales: leucina y tirosina respectivamente. Cada cepa se marcó con una proteína fluorescente en plásmidos multicopia que nos permitió distinguirlas (obtenidas del estudio de Reyes-González, 2022). El consorcio se caracteriza por ser un mutualismo obligado en medio mínimo M9 ya que cada auxótrofa puede sintetizar otros aminoácidos, incluyendo el de la auxotrofia de su socio (**Figura 11**).

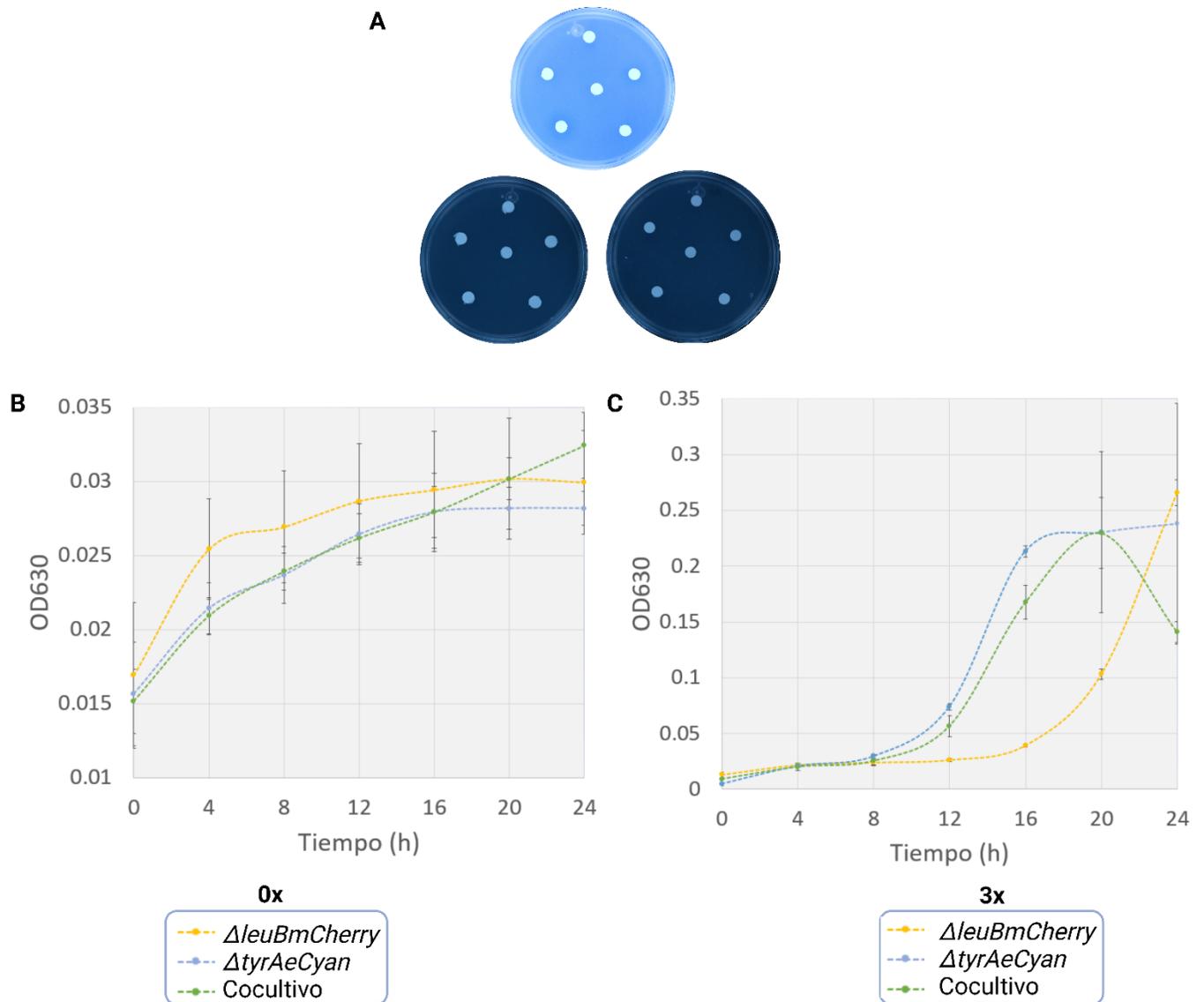


**Figura 11.** Consorcio experimental compuesto de las cepas auxótrofas: a leucina marcada con proteína roja fluorescente mCherry ( $\Delta leuBmCherry$ ) y a tirosina marcada con proteína azul fluorescente eCyan ( $\Delta tyrAeCyan$ ). La cepa  $\Delta leuBmCherry$  sintetiza tirosina mientras que la cepa  $\Delta tyrAeCyan$  sintetiza leucina.

Como todas las cepas auxótrofas, nuestras cepas  $\Delta leuBmCherry$  y  $\Delta tyrAeCyan$  no crecieron en monocultivo en medio mínimo M9 sin la suplementación de sus

respectivos aminoácidos. En la **Figura 12** mostramos los crecimientos en monocultivo y cocultivo de nuestras auxótrofas. En medio sólido pudimos observar de manera cualitativa el nulo crecimiento en monocultivo, y el crecimiento en cocultivo (**Figura 12A**). Por otro lado, en medio líquido cuantificamos el crecimiento durante 24 horas en monocultivo y cocultivo. Las curvas de crecimiento contrastan crecimientos en medio M9 sin aminoácidos (**Figura 12B**) versus en condiciones de concentraciones de aminoácidos a 3x (**Figura 12C**). Nótese que la escala de nuestras gráficas se diferencia en orden de magnitud de una décima, siendo la cinética en 3x la que se graficó en una mayor escala.

Las cinéticas nos permitieron ver que a medida que suplementemos el medio, los monocultivos crecieron cada vez más rápido, además este crecimiento fue proporcional a la concentración de aminoácidos añadidos. Mientras que en cocultivo, observamos que crecieron muy lento y poco en la condición sin suplementación de aminoácidos, pero a medida que suplementamos, las curvas de crecimiento primero tuvieron un pico alto y luego decrecieron pasadas las 16 horas. Asimismo, observamos que la medición de OD<sub>630</sub> a las 24 horas los cocultivos en condiciones suplementadas tuvieron absorbancias menores a los monocultivos. En cuanto a los monocultivos en condiciones suplementadas, notamos *ΔtyrAeCyan* crece más rápido que *ΔleuBmCherry*, no obstante, *ΔleuBmCherry* alcanzó a las 24 horas absorbancias más altas.

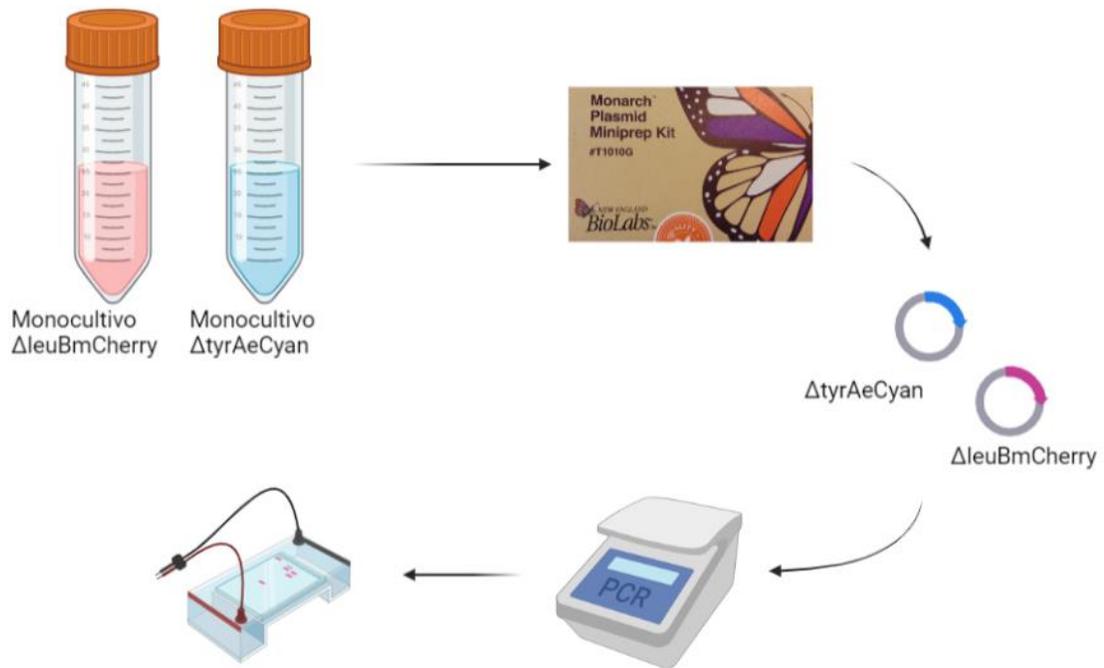


**Figura 12.** Crecimientos en monocultivo y cocultivo en medio mínimo M9 sólido (**Figura 12A**) y líquido (**Figura 12B-C**). **A)** Monocultivos  $\Delta leuBmCherry$  y  $\Delta tyrAeCyan$ , y cocultivo en medio sólido en campo claro. **B)** Cinética de crecimiento de 24 horas en monocultivos y cocultivo en condiciones de M9 sin aminoácidos (0x).

**C)** Cinética de crecimiento de 24 horas en monocultivos y cocultivo en condiciones de M9 con 3x de aminoácidos. Inoculamos con densidades ópticas a 630 nm (OD<sub>630</sub>):  $\Delta leuBmCherry$  = 0.335 y  $\Delta tyrAeCyan$  = 0.327. Realizamos 5 réplicas de cada condición en medio sólido y 4 réplicas para cada punto del crecimiento en la cinética (graficamos los promedios sin el blanco con su respectiva desviación estándar por punto).

## Validación del genotipo

Validamos que las cepas en cuestión poseyeran el genotipo auxótrofo correspondiente. Para ello realizamos PCR de plásmido usando primers río arriba y río abajo del sitio de delección (la banda correspondiente al *cassette* de resistencia a kanamicina). Para ello se utilizó el Monarch® Plasmid Miniprep Kit para la extracción de plásmido. Posteriormente se realizó PCR y electroforesis conforme al protocolo de Reyes-González (2022) para estas auxotrofías (**Figura 13**).



**Figura 13.** Protocolo de validación de las auxotrofías mediante PCR de plásmido y electroforesis.

En el gel de electroforesis observamos bandas con el peso molecular correspondiente a lo indicado por el *gen ruler* (pocillo 0). Las bandas de los plásmidos de  $\Delta leuBmCherry$  (**Figura 14**. [Pocillos del gel 1-6]) se mantuvieron cerca de la banda 11 del *gen ruler* (500pb). Por otro lado, las bandas de los plásmidos

$\Delta tyrAeCyan$  (Figura 14. [Pocillos del gel 7-12]) se mantuvieron entre de la banda 10 y 11 del gen ruler (700pb-1000pb). De antemano conocíamos el peso que debían tener las bandas:  $\Delta leuBmCherry$  de 507pb y  $\Delta tyrAeCyan$  de 792pb, de tal forma que confirmamos que las bandas correspondían al peso molecular esperado, por lo que concluimos que las cepas utilizadas poseían el genotipo auxótrofo correspondiente.

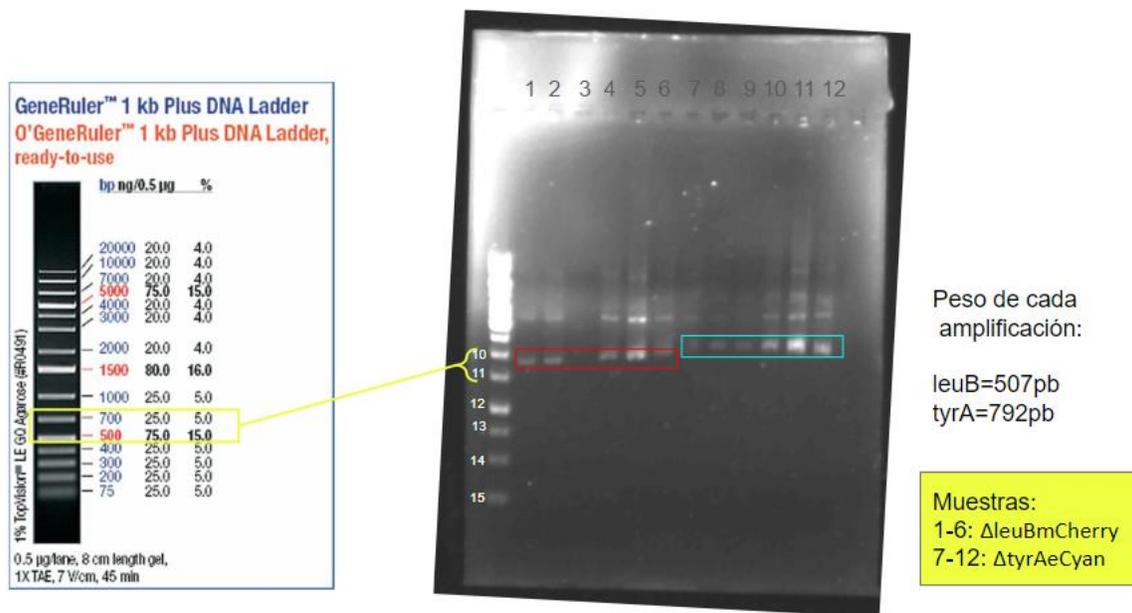
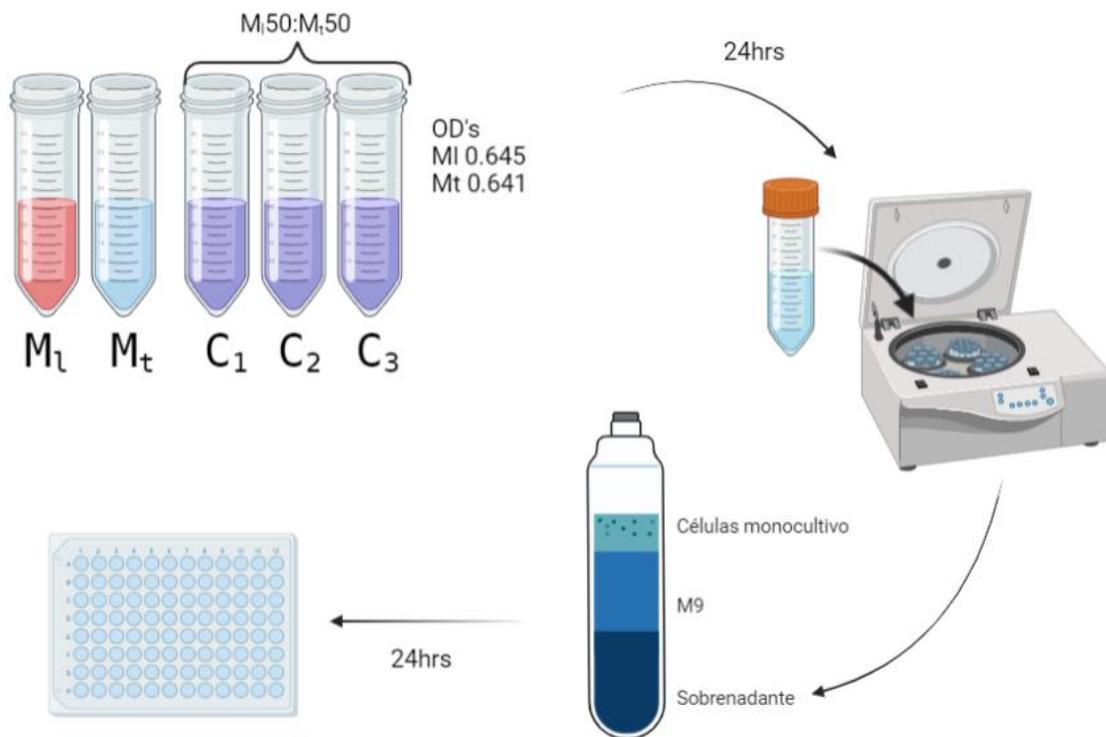


Figura 14. Gel de electroforesis de 6 muestras de plásmido de cada auxótrofo.

## Mutualismo obligado

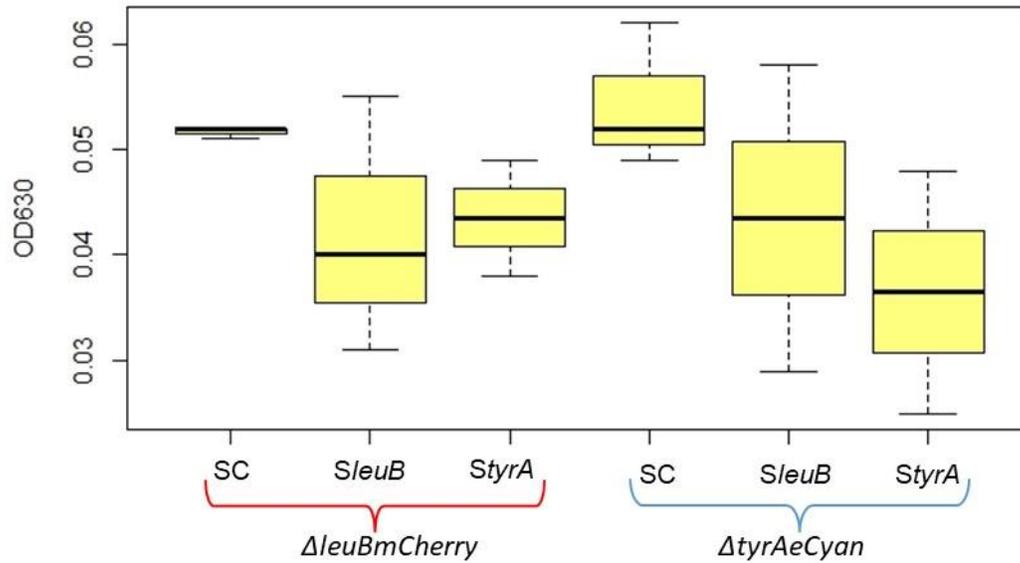
Realizamos una prueba que nos permitió cuantitativamente ver si nuestras cepas están cooperando en *cross-feeding* (**Figuras 15**) en medio mínimo sin suplementación de aminoácidos, ya que en esta condición no crecen los monocultivos, lo que implica que están en un mutualismo obligado (**Figuras 11 y 12**).

El protocolo que utilizamos consistió en poner cultivos *overnight* en medio M9 monocultivos y cocultivo. Después de 24 horas centrifugamos el preinóculo, recuperamos sólo el sobrenadante. Posteriormente inoculamos las células lavadas en monocultivo con medio conformado con sobrenadante y M9 (mitad del volumen M9 y la otra el sobrenadante del preinóculo). Finalmente medimos absorbancia 24 horas después de la incubación en lector de placas (**Figura 15**).



**Figura 15.** Prueba para comprobar *cross-feeding* en el consorcio de las cepas auxótrofas  $\Delta leuBmCherry$  y  $\Delta tyrAeCyan$ .

Una vez que realizamos el protocolo anterior, en los resultados de la **Figura 16** y **Cuadro 2** se puede apreciar que los monocultivos en el sobrenadante en cocultivo versus al sobrenadante de su socio generaron un  $p$ -value mayor en comparación al  $p$ -value donde se compara el sobrenadante cocultivo versus al sobrenadante del mismo monocultivo. No obstante, no encontramos diferencias significativas entre los crecimientos del sobrenadante del cocultivo con los del sobrenadante del monocultivo. Asimismo, es evidente que el crecimiento en los sobrenadantes de los monocultivos es similar entre ellos ( $p$ -values más grande, de 0.96 y 0.74) lo que nos dice que la síntesis de aminoácidos al medio externo en medio mínimo es a tasas bajas. Además, con estos resultados comprobamos que la velocidad crecimiento en M9 es lenta. Comparando las cinéticas de la **Figura 12B-C** encontramos que a diferencia de los cultivos en M9 sin suplementación de aminoácidos (donde llegan a  $OD_{630} \approx 0.02$ ), los sobrenadantes presentan un crecimiento mayor  $OD_{630} > 0.02$ . Por lo tanto, con estos resultados afirmamos que el consorcio coopera.



**Figura 16.** Gráfica de caja y bigote de inoculación de los monocultivos en sobrenadantes por 24 horas. Se observan los valores de absorbancia  $OD_{630}$  de los monocultivos en los siguientes sobrenadantes: SC = sobrenadante de cocultivo, *SleuB* = sobrenadante del monocultivo  $\Delta leuBmCherry$ , *StyrA* = sobrenadante del monocultivo  $\Delta tyrAeCyan$ . Inoculamos los monocultivos con las siguientes absorbancias iniciales:  $OD_{630} = 0.383$  ( $\Delta leuBmCherry$ ) y  $0.343$  de ( $\Delta tyrAeCyan$ ). Restamos a cada valor el blanco ( $OD_{630\text{blanco}} = 0.075$ ). Realizamos tres réplicas por condición en monocultivo y seis réplicas por condición en cocultivo.

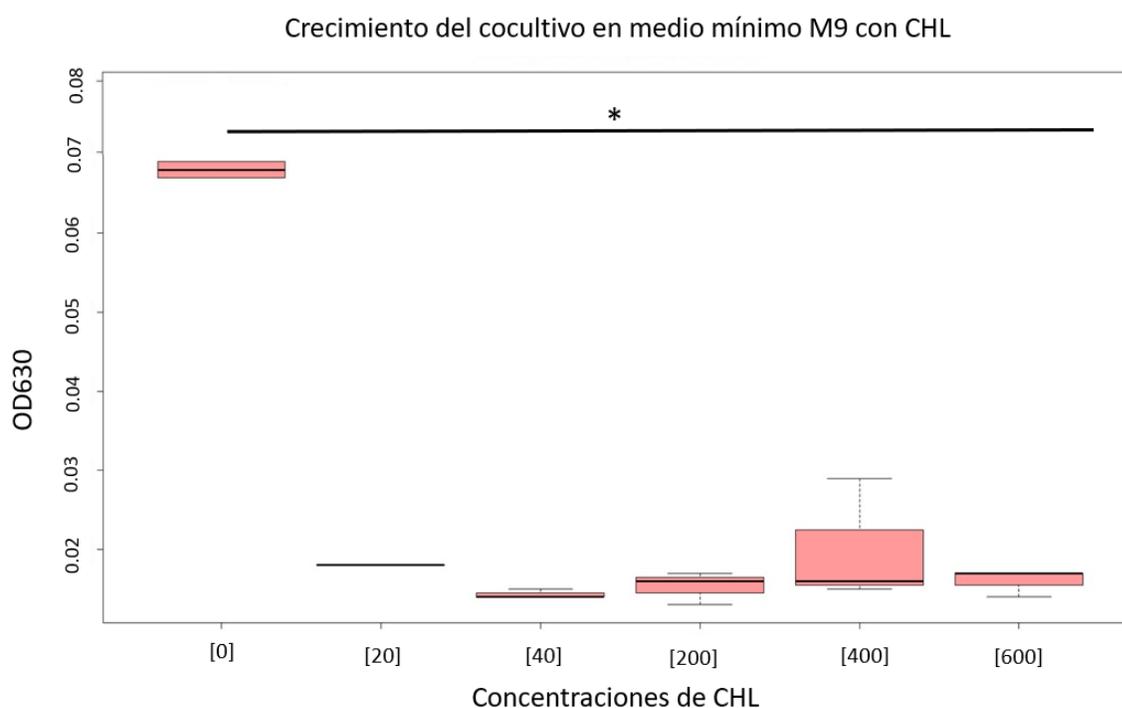
Cepa	Comparación de sobrenadantes	p-value	Significativo
<i>ΔleuBmCherry</i>	Cocultivo vs Monocultivo <i>ΔleuBmCherry</i>	0.3396	No
	Cocultivo vs Monocultivo <i>ΔtyrAeCyan</i>	0.4453	No
	Monocultivo <i>ΔleuBmCherry</i> vs Monocultivo <i>ΔtyrAeCyan</i>	0.9621	No
<i>ΔtyrAeCyan</i>	Cocultivo vs Monocultivo <i>ΔleuBmCherry</i>	0.5134	No
	Cocultivo vs Monocultivo <i>ΔtyrAeCyan</i>	0.2137	No
	Monocultivo <i>ΔleuBmCherry</i> vs Monocultivo <i>ΔtyrAeCyan</i>	0.743	No

**Cuadro 2.** p-value de los tipos de sobrenadantes obtenidos de la prueba de Tukey.

## Inhibición a CHL en medio líquido

Comprobamos que las concentraciones del antibiótico cloranfenicol presentan una dinámica de inhibición como lo reportado en la literatura, dónde se sabe que cepas silvestres de *E. coli* han presentado concentraciones mínimas de inhibición de entre 2 µg/ml a 32 µg/ml (Kidsley *et al.*, 2018). En nuestro estudio, nuestras cepas auxótrofas no presentan resistencia al antibiótico cloranfenicol, de tal forma que decidimos probar una serie de concentraciones del antibiótico, primero en medio mínimo M9 líquido sin suplementación de aminoácidos para confirmar su susceptibilidad conforme a lo antes reportado para *E. coli*. Para ello realizamos cocultivos de 24 horas con las siguientes concentraciones: 0, 20, 40, 200, 400 y 600 µg/ml.

Observamos en la **Figura 17** que en medio mínimo sin antibiótico el crecimiento del cocultivo tuvo diferencias estadísticamente significativas en comparación a los tratamientos con antibiótico. Por otro lado, los efectos del CHL son de inhibición desde la concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  y en todas las demás concentraciones no encontramos diferencias significativas. Pudimos concluir que las concentraciones probadas en medio líquido indican inhibición del crecimiento desde la concentración 20  $\mu\text{g/ml}$  para este consorcio en medio líquido.



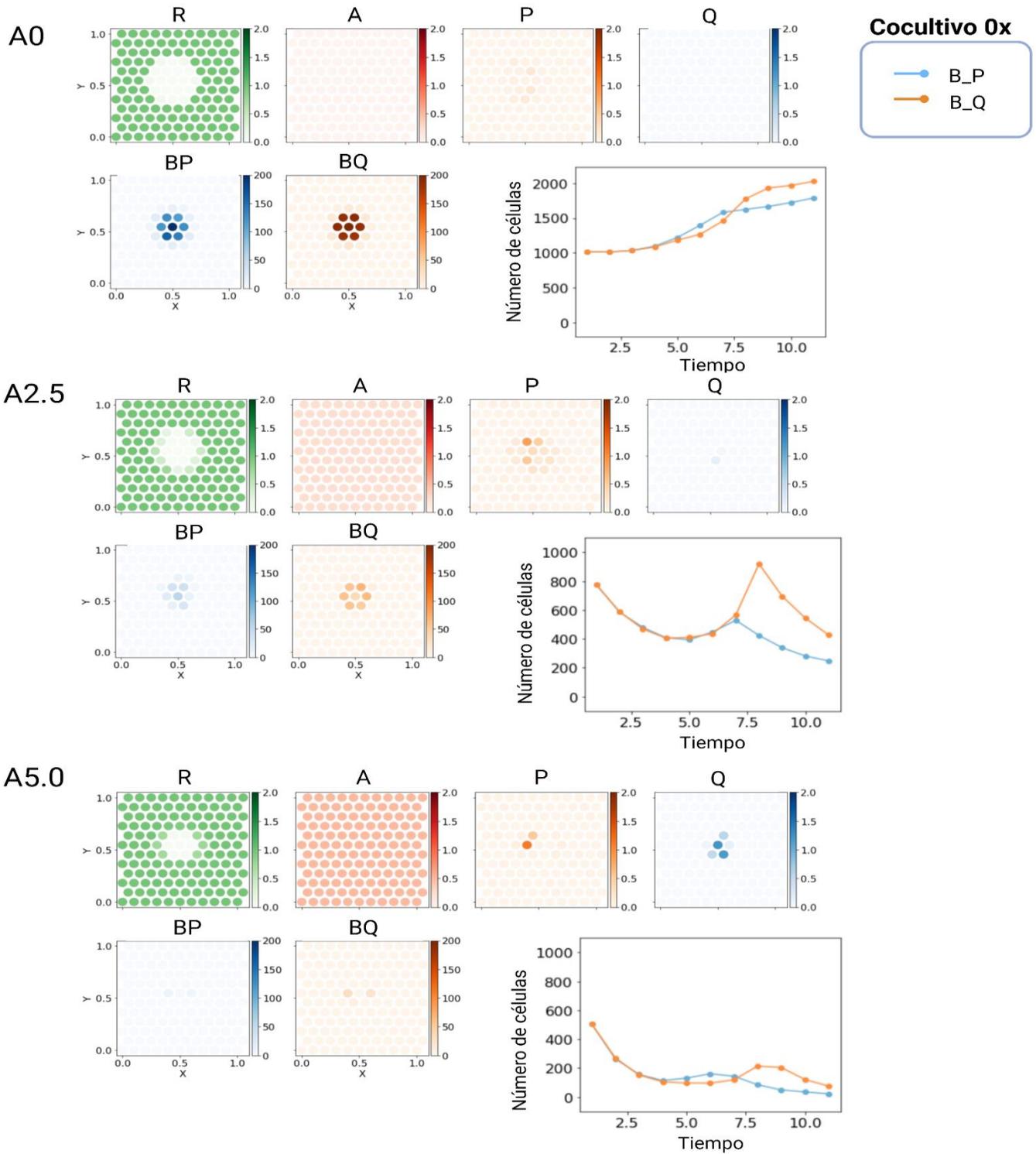
**Figura 17.** Gráfica de caja y bigote del crecimiento de cocultivos en medio M9 con distintas concentraciones de CHL en medio líquido después de 24 horas de incubación. En medio mínimo M9 durante 24 horas cultivamos cocultivos a distintas concentraciones de antibiótico cloranfenicol: [0]= sin CHL, [20]= 20  $\mu\text{g/ml}$ , [40]= 40  $\mu\text{g/ml}$ , [200]= 200  $\mu\text{g/ml}$ , [400]= 400  $\mu\text{g/ml}$  y [600]= 600  $\mu\text{g/ml}$ . Restamos a cada valor el blanco  $\text{OD}_{630} = 0.075$ . Inoculamos el cocultivo 50:50 con las siguientes absorbancias iniciales:  $\text{OD}_{630} = 0.607$  (*ΔleuBmCherry*) y 0.608 de (*ΔtyrAeCyan*). Realizamos una ANOVA y prueba de Tukey para encontrar el tratamiento con diferencias significativas. Con\* denotamos el tratamiento con diferencia significativa (Prueba de Tukey,  $p\text{-value} = 3.06 \times 10^{-15} < \alpha = 0.05$ ). Realizamos 3 réplicas por condición.

## Resultados

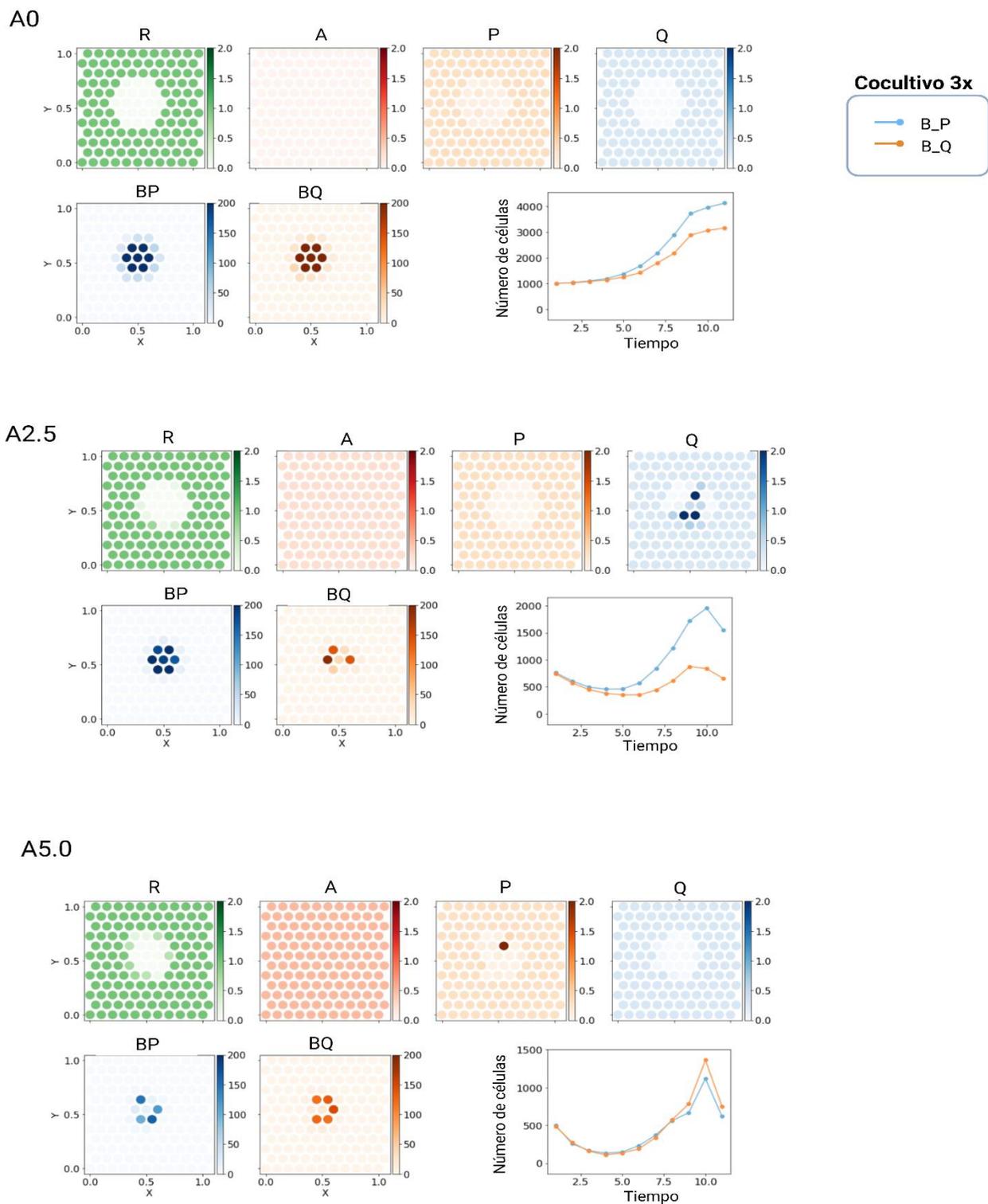
### Modelo computacional: Simulaciones

En esta sección se presenta las simulaciones en cocultivo que realizamos con dos poblaciones de células: BQ y BP. Como se explicó en la **Figura 4** nuestros agentes, las bacterias, son auxótrofas por lo que ninguna de ellas crece sin el recurso que necesitan suplementar, por tanto, en medio sin suplementación de los recursos P y Q cuando son simuladas juntas crecen. Cabe resaltar, que sólo incluimos los cocultivos porque los monocultivos crecen de forma similar en todas las simulaciones tanto con baja como con alta concentración de antibiótico.

En la **Figura 18**, el cocultivo sin suplementación de P y Q y sin antibiótico (A0) observamos crecimiento similar hasta después del tiempo 5 donde vimos que las poblaciones empiezan a crecer de forma diferente, siendo BQ la de mayor densidad celular al tiempo final. No obstante, a medida que aumentamos el pulso de antibiótico (A2.5 y A5.0) las poblaciones decrecen, siendo BP la de mayor susceptibilidad. En la **Figura 19**, cocultivo con suplementación 3x de P y Q, observamos una dinámica claramente distinta a la observada en la condición 0x (**Figura 18**). Como era de esperarse, en medio suplementado sin antibiótico (A0), el consorcio creció mucho más rápido. Por otro lado, con la presencia de antibiótico observamos un decremento inicial del crecimiento en los primeros 4 tiempos de la simulación y posteriormente ambas poblaciones presentaron un pico de crecimiento y luego un decremento inmediato (es más notorio en la concentración A5.0). Asimismo, vimos que en A0 y A2.5 la población BP fue mayor en toda la simulación, no obstante, en A5.0 después del tiempo 8, BQ creció un poco más que BP.

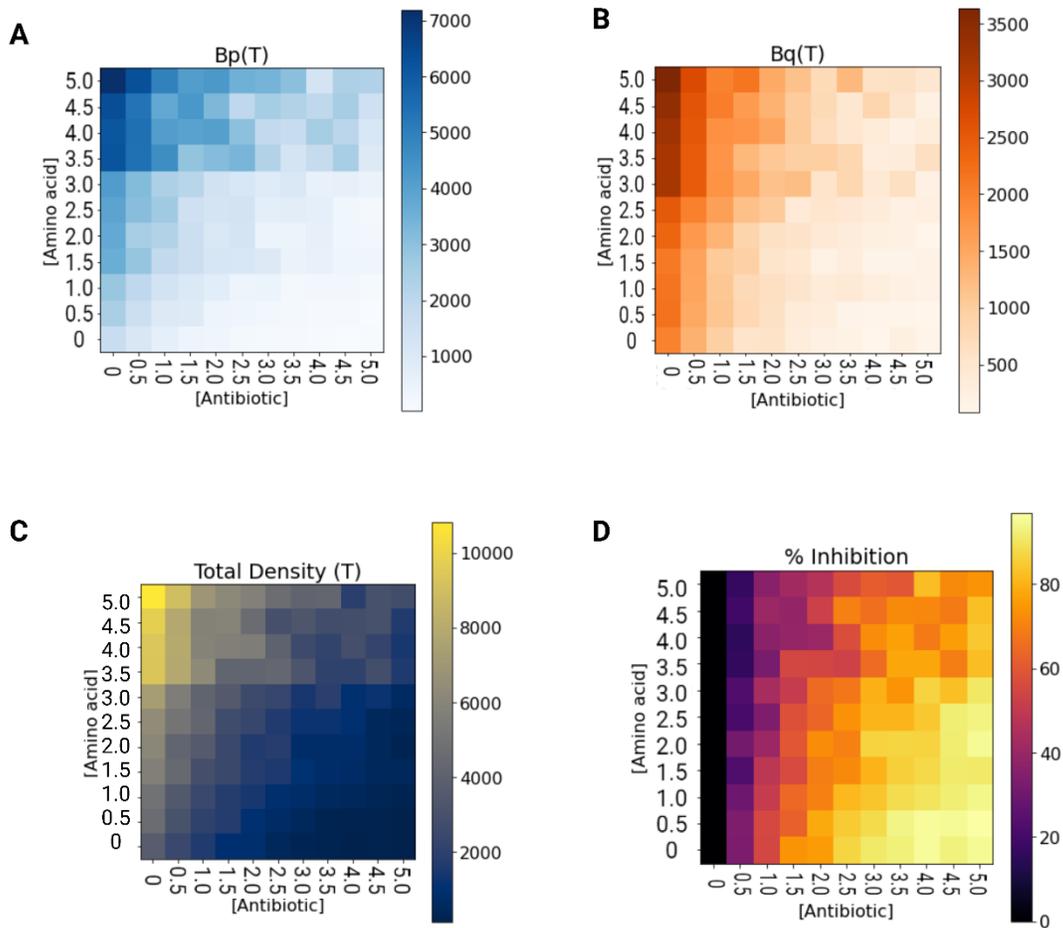


**Figura 18.** Simulaciones en condiciones de cocultivo sin suplementación de metabolitos P y Q. Se representan tres pulsos de antibiótico: sin antibiótico (A0), con 2.5 unidades de antibiótico (A2.5) y con 5.0 unidades de antibiótico (A5.0).



**Figura 19.** Simulaciones en condiciones de cocultivo con suplementación de  $P=3$  y  $Q=3$ . Se representan tres pulsos de antibiótico: sin antibiótico (A0), con 2.5 unidades de antibiótico (A2.5) y con 5.0 unidades de antibiótico (A5.0).

Dada la gran cantidad de simulaciones que generamos, realizamos un resumen de lo obtenido con gráficos de calor (**Figura 20**) que describen las densidades celulares que se recabaron en todas las simulaciones al tiempo final. Nuestro modelo explica que cuando no hay recursos P y Q ni antibiótico en el medio, el consorcio crece porque cooperan ambas poblaciones, mientras más recursos existan en el medio, sin pulso de antibiótico, las poblaciones crecen exponencialmente y además BP crece más que BQ, por lo que ya no cooperan entre ellas, ahora compiten por el recurso limitante, R. Por otro lado, en presencia de cada vez una concentración mayor de antibiótico observamos una progresiva disminución de las poblaciones y un mayor porcentaje de inhibición. Las simulaciones con mayor porcentaje de inhibición fueron en condiciones sin suplementación de P y Q, por consiguiente, nuestro modelo indicó que a mayor cooperación mayor susceptibilidad al antibiótico bacteriostático.



**Figura 20.** Resumen de los resultados obtenidos de todas las simulaciones realizadas en cocultivo con distintas concentraciones de P y Q, y antibiótico. Representamos con gráficas de calor la densidad de células al tiempo final de cada simulación: **A)** densidad celular de BP, **B)** densidad celular de BQ y **C)** densidad celular total de ambas poblaciones. **D)** Gráfico de calor del porcentaje de inhibición con respecto al crecimiento sin antibiótico de ambas poblaciones al tiempo final.

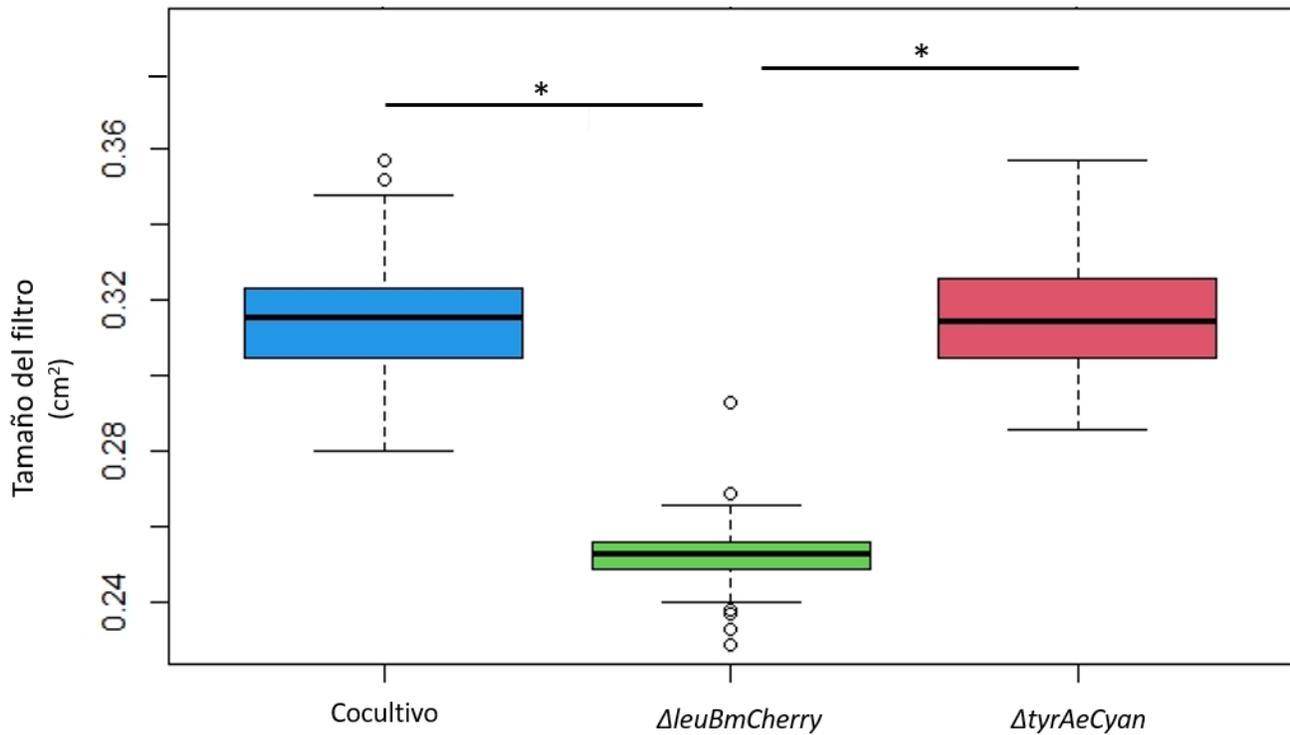
## Experimentación: Cuantificación de los halos de inhibición

Al desarrollar el protocolo descrito anteriormente (**Figura 8**), inoculamos las cepas dentro del agar. Dada esta técnica, la densidad celular de las poblaciones en los experimentos fue de gran importancia para el consorcio. Los resultados presentados a continuación los obtuvimos inoculando las cepas en las siguientes absorbancias según el tipo de cultivo: en el Monocultivo *ΔleuBmCherry*  $OD_{630}=0.403$ , en el Monocultivo *ΔtyrAeCyan*  $OD_{630}= 0.246$  y en cocultivo inoculamos en una proporción de 50:50 con una absorbancia de los monocultivos de *ΔleuBmCherry*  $OD_{630}= 0.447$  y *ΔtyrAeCyan*  $OD_{630}= 0.442$  (diferencia de  $OD_{630}=0.005$ ).

Realizamos 5 réplicas por condición de cada cultivo, cuantificando así un total de 75 cajas Petri, a las cuales les tomamos fotos con el dispositivo BAFFLE a las 24 y 72 horas de incubación (**Figura 22-25**). Las fotos nos sirvieron para cuantificar las zonas donde no crecieron nuestros cultivos, las cuales representan los halos de inhibición. Cada halo de inhibición se formó con respecto a una concentración determinada de cloranfenicol (**Figura 9**). Las áreas de inhibición recabadas en centímetros cuadrados se etiquetaron por su respectiva concentración de antibiótico y por el tipo de medio de cultivo (**Figuras 8 y 9**). Por otro lado, también cuantificamos el área que abarca cada papel filtro (**Figura 21**). Con dichos datos generamos los siguientes gráficos en RStudio.

Como ya se mencionó, utilizamos círculos de papel filtro para insertar las concentraciones probadas del antibiótico cloranfenicol (**Figura 17**). En la **Figura 21** graficamos las áreas del papel filtro en los monocultivos y en el cocultivo. Notamos que los círculos de papel filtro en el monocultivo *ΔleuBmCherry* fueron más pequeños en comparación con los otros cultivos, ello se debe a que utilizamos dos

perforadoras distintas para cortar el papel filtro, la cual fue estadísticamente significativo. No obstante, dado que añadimos a todas las condiciones el mismo volumen de antibiótico, el tamaño del papel filtro no debiera de perjudicar los resultados aquí presentados.



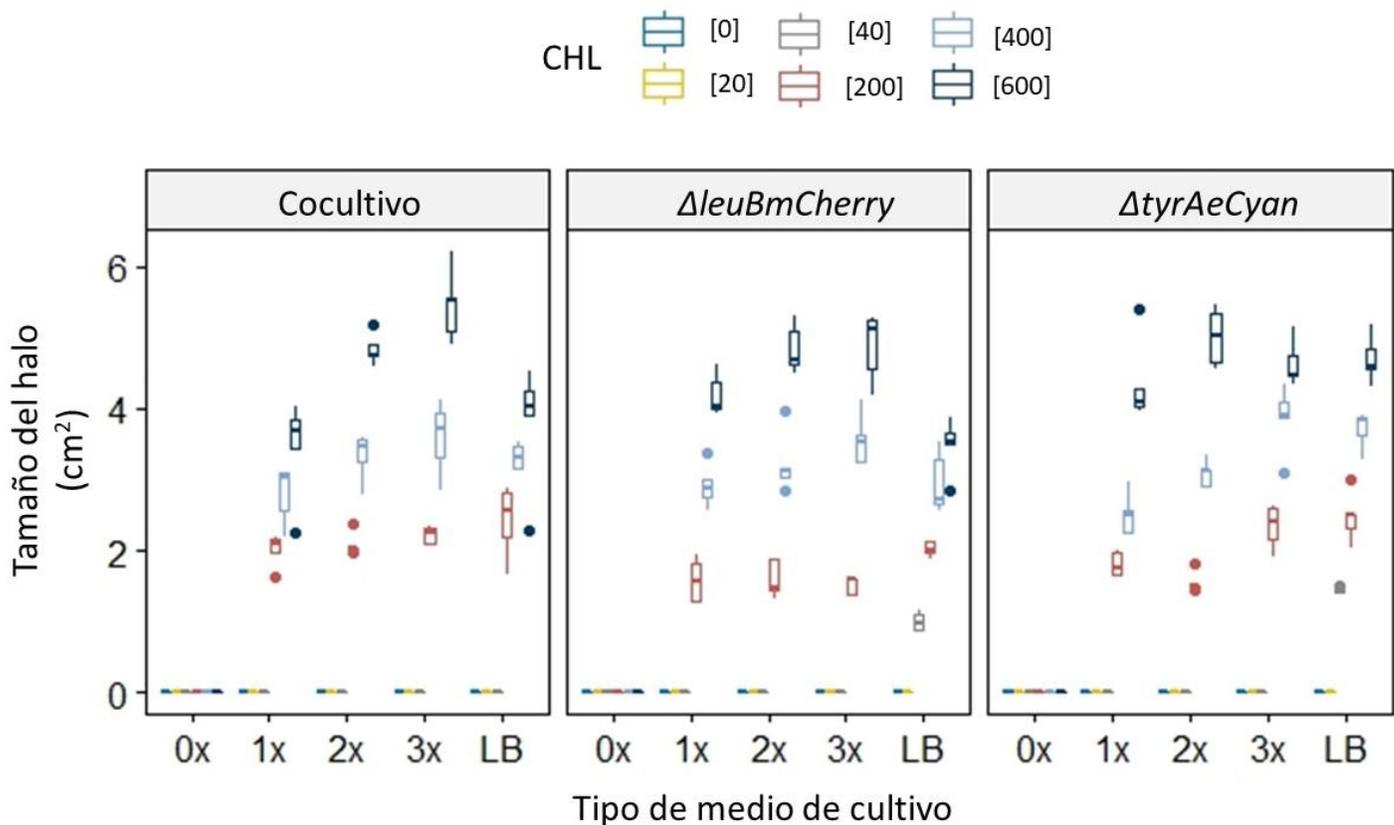
**Figura 21.** Gráfica de caja y bigote del área de los papeles filtro usados en las caja Petri por cultivo. Realizamos una ANOVA y prueba de Tukey para encontrar el tratamiento con diferencias significativas. Con\* denotamos el tratamiento con diferencia significativa (Prueba de Tukey,  $p\text{-value}=0 < \alpha=0.05$ ). Se incluyen 25 réplicas por cada tipo de cultivo.

En la **Figura 22** presentamos el tamaño de los halos de inhibición en las primeras 24 horas de incubación. Observamos que en el monocultivo  $\Delta leuBmCherry$  en medios mínimos suplementados hay un progresivo aumento de la susceptibilidad desde la

concentración 200 µg/ml de CHL (caja roja), pero desde la concentración 400 µg/ml (azul claro) notamos que a mayor concentración de aminoácidos también aumentó el tamaño de los halos de inhibición. No obstante, en el medio rico LB, la inhibición se presentó desde la concentración 40 µg/ml (caja gris). Además, en LB conforme mayor fue la concentración de antibiótico mayor la inhibición, sin embargo, ésta se observa en menores dimensiones que la observada en la condición 3x, inclusive se puede decir que la susceptibilidad, al menos desde la concentración 400 µg/ml (azul claro), puede que sea mayor que la encontrada en la condición 1x, pero menor que en 2x ([1x<LB<2x]) (**Figura 22**). En el monocultivo *ΔtyrAeCyan* se observa un patrón de inhibición similar al del monocultivo *ΔleuBmCherry* en medio M9 suplementado con excepción de algunas curvas que muestran una disminución de la inhibición como en la condición 2x en la concentración 200 µg/ml (caja roja) y en 3x en la concentración 600 µg/ml (caja azul fuerte), probablemente debido a variación de las muestras. No obstante, la susceptibilidad en medio LB a las 24 horas fue mayor en el monocultivo *ΔtyrAeCyan* que en el monocultivo *ΔleuBmCherry*. En LB el monocultivo *ΔtyrAeCyan* presentó un patrón similar a condición 3x (con excepción de que en LB la inhibición inicia desde 40 µg/ml de CHL (caja gris)) (**Figura 22**).

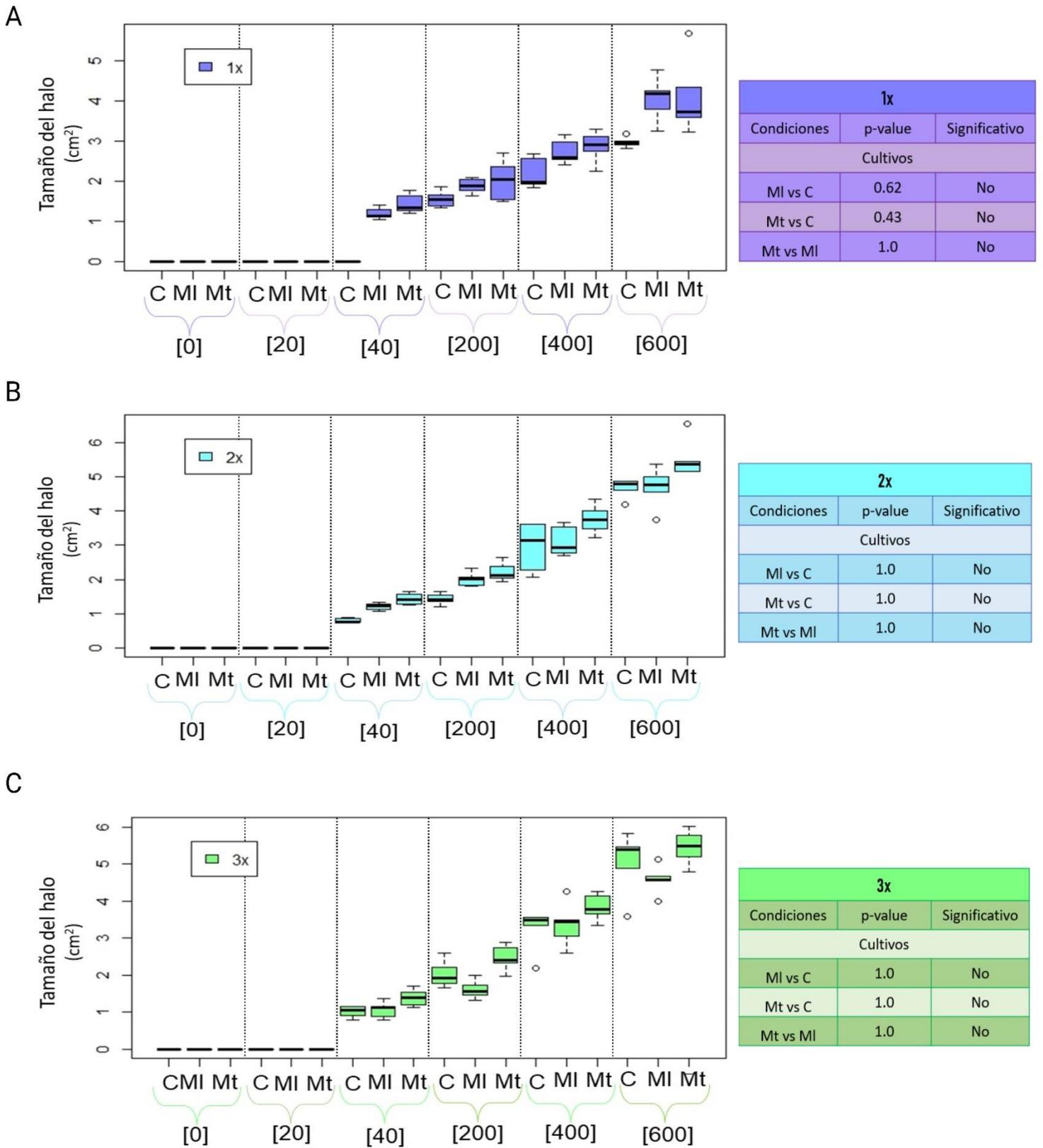
Por otro lado, los cocultivos en las cinco condiciones presentaron un aumento de la susceptibilidad desde la concentración 200 µg/ml de CHL (caja roja). Cabe destacar, fue bastante más notoria la progresiva inhibición en cocultivo que en los monocultivos. Asimismo, la condición 3x fue la de mayor susceptibilidad. Y como se describió arriba para el monocultivo *ΔleuBmCherry*, la condición de LB tuvo un comportamiento que se puede clasificar entre las condiciones 1x y 2x (**Figura 22**).

Los tres paneles de gráficas de los tres tipos de cultivo coinciden en la nula inhibición en la condición de medio mínimo sin suplementación de aminoácidos, ello debido a que la condición no permite una tasa de crecimiento óptima para nuestro consorcio y mucho menos para nuestros monocultivos, por ello no se presenta crecimiento del cocultivo en las primeras 24 horas, puesto que otro caso es en los monocultivos donde, comprobamos en el apartado de validación que no crecieron sin la suplementación de los aminoácidos necesarios (**Figura 12A**).



**Figura 22.** Gráfico de caja y bigote de las áreas de inhibición a las 24 horas de incubación en campo claro por cada tipo de medio de cultivo. Paneles por cada cultivo: Cocultivo, monocultivo de  $\Delta leuBmCherry$  y monocultivo de  $\Delta tyrAeCyan$ . Cada caja y bigote está representada con un color diferente dependiendo la concentración de CHL. Presentamos 5 réplicas por cada condición de CHL+ medio de cultivo.

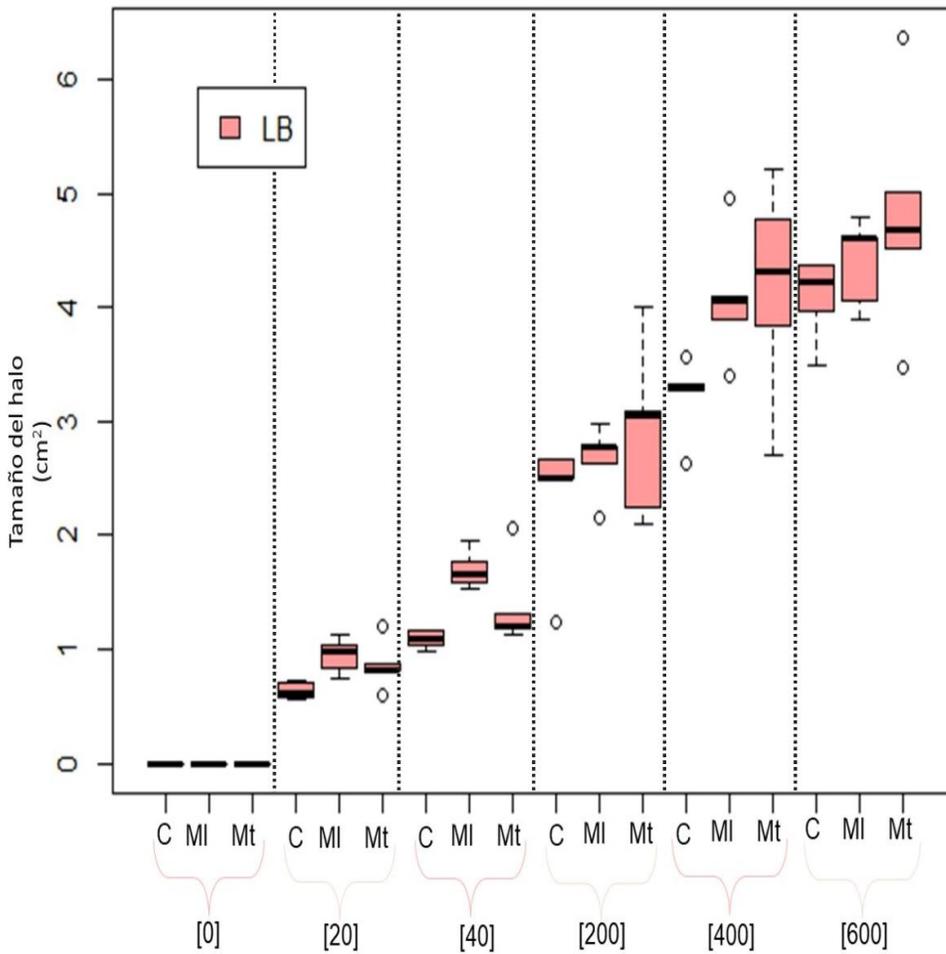
Los resultados de las primeras 24 horas de incubación nos brindaron información útil acerca del crecimiento bacteriano que sobre todo en medio mínimo era de esperarse que fuera más lento en comparación con medio suplementado y rico (**Figura 22**). Luego nos dimos a la tarea de cuantificar a las 72 horas de incubación, principalmente debido a que los cocultivos en medio sin suplementación de aminoácidos presentaron crecimiento después de las 48 horas por lo que era fundamental saber cuánta inhibición se obtenía en todas las condiciones durante 72 horas (**Figura 23**). Durante el tiempo total de incubación, destacamos una inhibición en las condiciones de medio mínimo suplementado desde la concentración 40 µg/ml de CHL, en el caso de los monocultivos es observable desde la condición 1x y en cocultivos desde la condición 2x. Asimismo, la dinámica de la inhibición en los cultivos en medios suplementados fue similar a lo descrito anteriormente en las primeras 24 horas de incubación (**Figura 22 y 23**). En las condiciones 1x, 2x y 3x no hubo diferencias estadísticamente significativas, por lo que las varianzas en dichas condiciones fueron muy similares (**Figura 23**). Además, cabe resaltar que la inhibición entre los tipos de cultivo tampoco fue significativa.



**Figura 23.** Gráficos de caja y bigote por cada condición de aminoácidos con concentraciones de CHL para

cada cultivo. Análisis estadístico de las condiciones utilizadas en la medición de halos de inhibición de 72 horas. En el eje x graficamos los medios de cultivo (C= cocultivo, MI= *ΔleuBmCherry* y Mt= *ΔtyrAeCyan*) con las siguientes concentraciones de antibiótico cloranfenicol: [0]= sin CHL, [20]= 20 μg/ml, [40]= 40 μg/ml, [200]= 200 μg/ml, [400]= 400 μg/ml y [600]= 600 μg/ml. Gráficas de caja y bigote de los cultivos con suplementación de aminoácidos a **A**) 1x, **B**) 2x y **C**) 3x. Realizamos prueba Kruskal-Wallis y luego una prueba de Wilcoxon para conocer las diferencias estadísticamente significativas. Se considera significativo si es menor a  $\alpha=0.05$ . Cada panel contiene 5 réplicas por cada condición.

Conforme a los resultados presentados anteriormente, notamos que la inhibición en condiciones de medio mínimo sin suplementación es muy diferente a la inhibición observada en medio rico. Los medios suplementados comparados con el medio LB no fueron diferentes estadísticamente, pero sí fueron significativas las diferencias con medio mínimo sin suplementación, por tanto, afirmamos que una vez enriquecido el medio la dinámica del consorcio cambia. En medio rico observamos inhibición en la primera dosis de antibiótico, en una concentración de 20 μg/ml para todos los cultivos, luego gradualmente fue incrementando la inhibición con la concentración de antibiótico (**Figura 24**). De igual forma a lo observado en las condiciones suplementadas, encontramos que la inhibición entre los tipos de cultivo fue muy similar (**Figura 23 y 24**). Por otro lado, en las concentraciones 400 y 600 μg/ml de CHL no fueron diferencias estadísticas en todas las condiciones por lo que presentaron halos de inhibición similares, cabe aclarar que todas las demás concentraciones de CHL en todos los medios tuvieron diferencias estadísticas (**Figura 24**).

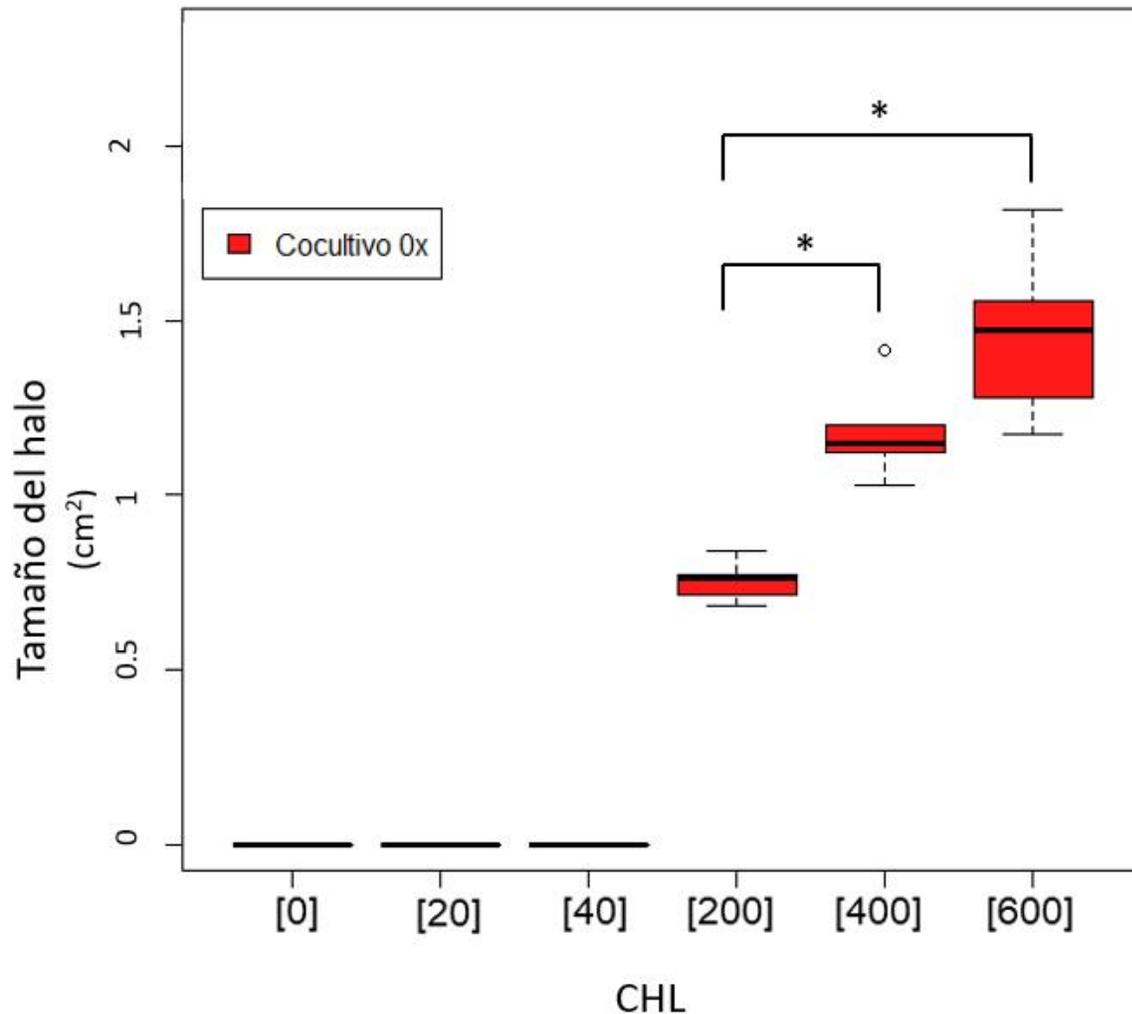


LB		
Condiciones	p-value	Significativo
Cultivos		
Ml vs C	0.86	No
Mt vs C	0.92	No
Mt vs Ml	1.0	No

**Figura 24.** Gráfica de caja y bigote de la inhibición en LB a las 72 h. En este gráfico comparamos la inhibición en los tres tipos de cultivo (C= cocultivo, MI= *ΔleuBmCherry* y Mt= *ΔtyrAeCyan*) con las siguientes concentraciones de antibiótico cloranfenicol: [0]= sin CHL, [20]= 20 µg/ml, [40]= 40 µg/ml, [200]= 200 µg/ml, [400]= 400 µg/ml y [600]= 600 µg/ml. Realizamos prueba Kruskal-Wallis y luego una prueba de Wilcoxon para conocer las diferencias estadísticamente significativas. Se considera significativo si es menor a  $\alpha=0.05$ . Representamos 5 réplicas por cada condición.

En contraste, en la condición 0x (**Figura 25**), donde sólo encontramos crecimiento del cocultivo, observamos inhibición desde la dosis de 200 µg/ml de CHL, es decir que la inhibición encontrada fue en concentraciones mayores, además que los halos

tuvieron una proporción menor en esta condición en comparación con las condiciones anteriores (**Figura 23 y 24**).



**Figura 25.** Gráfica de caja y bigote del cocultivo en medio M9 sin suplementado de aminoácidos. Con\* denotamos el tratamiento con diferencia significativa (Prueba de Wilcox,  $p\text{-value}=0 < \alpha=0.05$ ). Se incluyen 25 réplicas por cada tipo de cultivo. Presentamos 5 réplicas por condición.

Nuestros resultados nos muestran que el consorcio en cocultivo en medio mínimo presenta una mayor tolerancia, ya que observamos halos de inhibición en la

concentración 200  $\mu\text{g/ml}$  de CHL en comparación con los medios suplementados, donde encontramos halos de inhibición en 40  $\mu\text{g/ml}$  y en medio rico en 20  $\mu\text{g/ml}$  de CHL, y en comparación a lo observado en la validación en medio líquido (**Figura 17**). Por lo que el consorcio en medios ricos presenta una mayor susceptibilidad al antibiótico. Con lo anterior confirmamos que la interacción de cooperación se desacopla con la suplementación de aminoácidos, visto desde la concentración 1x, por lo tanto, suponemos que la interacción dominante es de competencia. Además, confirmamos que la estructura espacial propicia una fuerte cooperación, probablemente de célula a célula, que le permitió a nuestro consorcio en medio mínimo sin suplementación una mayor tolerancia al antibiótico.

## Discusión

La experimentación y las simulaciones demostraron que en medio mínimo la velocidad de crecimiento bacteriano es menor comparado con el crecimiento en medio enriquecido. Asimismo, el consorcio crece más lento que en monocultivos, además, tiene una velocidad de crecimiento menor en medio sin suplementación de aminoácidos con respecto a medios cada vez más enriquecidos. Lo anterior corresponde a la premisa de que el proteoma de las células depende del tipo de medio de crecimiento y de la disponibilidad de los recursos, es decir, que la tasa de crecimiento poblacional está gobernada por el contenido nutricional del medio (Scott *et al.*, 2010). Lo anterior implica que mientras más recursos indispensables estén disponibles, por ejemplo, a través de suplementación de aminoácidos, mayor tasa de síntesis de proteínas existe en la célula, y por consiguiente observamos altos niveles de crecimiento.

En ambos modelos comprobamos lo reportado anteriormente (Germeodt *et al.*, 2016; Hoek *et al.*, 2016; Reyes-González, 2022), el suministro de aminoácidos desacopla las interacciones metabólicas obligatorias, y aunado con la presión de selección, a medida que el pulso de antibiótico va incrementando también observamos una reducción significativa en la densidad poblacional. Además, el crecimiento del cocultivo en condiciones con suplementación fue mayormente fluctuante en todas las simulaciones lo que nos confirma que la dinámica de la interacción transita de cooperación hacia la competencia.

El modelo computacional predice que los cocultivos en medio suplementado son más tolerantes al antibiótico que en medio mínimo. Por otro lado, el modelo experimental comprueba lo contrario, pues confirmamos que el consorcio cuando

está cooperando en medio mínimo es mucho más tolerante al antibiótico que cuando está en medios suplementados e inclusive en medio rico LB es mucho más sensible. Por consiguiente, destacamos que nuestro modelo computacional se ve limitado, pues no refleja totalmente la realidad del experimento en caja Petri. Por lo tanto, concluimos que a nuestro modelo *in silico* le hacen falta contemplar parámetros metabólicos como son los costos de la auxotrofia, ya que en la parte experimental notamos que los costos de producción de los aminoácidos no son nada triviales para las células, por lo que en vista de ser proveídas con el metabolito en el medio la relación costo-beneficio no les resultó fácil de mantener más para aquella auxotrofia más costosa. Lo anterior se relaciona a lo encontrado en condiciones suplementadas a 1x, los monocultivos *ΔleuBmCherry* tuvieron una probabilidad más grande de parecerse a la inhibición del cocultivo a diferencia de los monocultivos de *ΔtyrAeCyan*, aunque fueron estadísticamente similares al cocultivo, la diferencia entre los *p*-values probablemente se deba al costo de la auxotrofia más cara energéticamente de sobrellevar. Suponemos que, si en todos los ambientes suplementados observamos que los cocultivos fueron estadísticamente similares, entonces sobrellevar en estos ambientes los costos-beneficios de la producción de aminoácidos ya no es indispensable para la sobrevivencia implicando que a partir del medio 1x el crecimiento celular es resultado de la competencia por el único recurso limitante, la glucosa.

Nuestros resultados experimentales concuerdan con la *hipótesis del gradiente de estrés* propuesta por Bertness y Callaway (1994), la cual nos dice que en medios ambientes difíciles para los organismos se promueven con mayor fuerza las interacciones positivas, sugiriendo que en conjunto la vecindad tiene la capacidad de amortiguar los efectos del estrés físico (Bertness & Callaway, 1994; Hoek *et al.*, 2016; Piccardi, Vessman & Mitri, 2019). Sin embargo, en medios ricos esto puede no ser una ventaja, seguramente porque la cooperación se ve debilitada o incluso desacoplada.

## Conclusiones

El entorno natural no tiene condiciones constantes, los microorganismos viven en ambientes con cambios persistentes, por ejemplo, debido a la presencia de perturbaciones físicas y químicas. Por lo tanto, el ambiente en su conjunto genera efectos sobre las interacciones entre los organismos. La incesante interrogante es cómo los organismos en interacción, particularmente mutualistas obligados, afrontan y se adaptan a los cambios ambientales. En este estudio nuestros resultados experimentales corroboran nuestra pregunta de investigación, el consorcio de auxótrofas con estructura espacial en medio limitante favorece una dinámica de cooperación que a su vez provee de una menor susceptibilidad al antibiótico bacteriostático. Esta conclusión es importante debido a que en la mayoría de los ambientes las comunidades son sometidas a condiciones limitantes que tienen gran peso en su dinámica. Además, los ambientes estructurados generan gradientes de baja y alta concentración, lo cual también es un determinante en la respuesta de las comunidades ante el estrés.

## Referencias

Adamowicz, E.M., Flynn, J., Hunter, R.C. *et al.* Cross-feeding modulates antibiotic tolerance in bacterial communities. *ISME J* 12, 2723–2735 (2018).

<https://doi.org/10.1038/s41396-018-0212-z>

Andresen, E. Arroyo-Rodríguez, V. Escobar, F. (2018). Tropical Biodiversity: The importance of biotic interactions for its origin, maintenance, function, and conservation. *Ecol. Netw. Trop.* 1–13.

Baba *et al.*, (2006), Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, *Molecular Systems Biology*, doi: [10.1038/msb4100050]

Baquero, F., Levin, B.R. (2021). Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 19, 123–132.

<https://doi.org/10.1038/s41579-020-00443-1>

Baumgartner M, Bayer F, Pfrunder-Cardozo KR, Buckling A, Hall AR (2020) Resident microbial communities inhibit growth and antibiotic-resistance evolution of Escherichia coli in human gut microbiome samples. *PLOS Biology* 18(4): e3000465. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000465>

Bertness, M. D. Callaway, R. (1994). Positive interactions in communities, *Trends in Ecology & Evolution*, Volume 9, Issue 5, Pages 191-193, ISSN 0169-5347, [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90088-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90088-4).

Blair, J., Webber, M., Baylay, A. *et al.* (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13, 42–51.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>

Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. *et al.* (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 14, 320–330. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>

Bogdanowski A, Banitz T, Muhsal LK, Kost C, Frank K. (2022). McComedy: A user-friendly tool for next-generation individual-based modeling of microbial consumer-resource systems. *PLoS Comput Biol* 18(1): e1009777. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009777>

Bonabeau, E. (2002). Agent-based modeling: Methods and techniques for simulating human systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (Suppl 3) 7280-7287; DOI: 10.1073/pnas.082080899

Cook, M. A., & Wright, G. D. (2022). The past, present, and future of antibiotics. *Science Translational Medicine*, 14(657), 1099–1102. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo7793>

Dal Co, A., van Vliet, S., Kiviet, D.J. *et al.* (2020). Short-range interactions govern the dynamics and functions of microbial communities. *Nat Ecol Evol* 4, 366–375. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1080-2>

Daniels, M. Van Vliet, S & Ackermann, M. (2022). Changes in interactions over ecological time scales influence single cell growth dynamics in a metabolically coupled marine microbial community. *bioRxiv* 2022.02.08.479118; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.02.08.479118>

Darwin, C. (1860). *On the origin of species by means of natural selection*. Chapter 3, p. 75 [Antonio de Zulueta (Traducción) / Juan Comas (Estudio introductorio). 2a edición. 2018. UNAM. México]

Del Val, E & Boege, K. (2011). Bichos vemos relaciones no sabemos. *Diversidad e importancia de las interacciones bióticas*. *Ciencias*, núm. 102, abril-junio, pp. 5-11.

Del Val, E & Boege, K. (2012). VI. Interacciones entre múltiples especies. En *Ecología y evolución de las interacciones bióticas* (176-204). México: UNAM-Fondo de Cultura Económica.

Dodds, W. K., & Whiles, M. R. (2010). Movement of Light, Heat, and Chemicals in Water. *Freshwater Ecology (Second Edition)*, 45-64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374724-2.00003-9>

Estrela S, Brown SP (2013) Metabolic and Demographic Feedbacks Shape the Emergent Spatial Structure and Function of Microbial Communities. *PLoS Comput Biol* 9(12): e1003398. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003398>

Feichtmayer, J. Deng, L. & Griebler, C. (2017) Antagonistic Microbial Interactions: Contributions and Potential Applications for Controlling Pathogens in the Aquatic Systems. *Front. Microbiol.* 8:2192. doi: 10.3389/fmicb.2017.02192

Fraser, D. Soul, L. Tóth, A. et. al. (2021). Investigating Biotic Interactions in Deep Time. *Trends in Ecology & Evolution*, 36, Pages 61-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.09.001>

Friedman, J. Gore, J. (2017). Ecological systems biology: The dynamics of interacting populations. *Current Opinion in Systems Biology*, Volume 1. 114-121 pp. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2016.12.001>

Gaxiola, A & Armesto, J. J. (2012). I. Competencia. En *Ecología y evolución de las interacciones bióticas* (15-42). México: UNAM-Fondo de Cultura Económica.

Germerodt S, Bohl K, Lück A, Pande S, Schröter A, Kaleta C, et al. (2016) Pervasive Selection for Cooperative Cross-Feeding in Bacterial Communities. *PLoS Comput Biol* 12(6): e1004986. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004986>

Gorochowski, T. E. (2016). Agent-based modelling in synthetic biology. *Essays in Biochemistry*, 60(4), 325-336. <https://doi.org/10.1042/EBC20160037>

Harcombe, William. (2010). Novel cooperation experimentally evolved between species. *Evolution* 64: 2166-2172. *Evolution; international journal of organic evolution.* 64. 2166-72. 10.1111/j.1558-5646.2010.00959.x.

Hardin, G. The tragedy of the commons. *Science* **162**, 1243–1248 (1968).  
[https://www.jstor.org/stable/1724745?seq=2#metadata\\_info\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/1724745?seq=2#metadata_info_tab_contents)

Hellweger, F., Clegg, R., Clark, J. *et al.* Advancing microbial sciences by individual-based modelling. *Nat Rev Microbiol* **14**, 461–471 (2016).  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.62>

Herren CM. (2020). Disruption of cross-feeding interactions by invading taxa can cause invasional meltdown in microbial communities. *Proc Biol Sci.* 287(1927):20192945. doi: 10.1098/rspb.2019.2945. Epub 2020 May 13. PMID: 32396806; PMCID: PMC7287355.

Hoek TA, Axelrod K, Biancalani T, Yurtsev EA, Liu J, Gore J. (2016). Resource Availability Modulates the Cooperative and Competitive Nature of a Microbial Cross-Feeding Mutualism. *PLoS Biol* **14**(8): e1002540. doi:10.1371/journal.pbio.1002540

Holland J. N. DeAngelis D. L. & Bronstein J. L. (2002). Population Dynamics and Mutualism: Functional Responses of Benefits and Costs. *The American Naturalist.* 159:3, 231-244

Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. 16-06-22, de American Society for Microbiology Sitio web:  
<https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>

Ings, T.C. Hawes, J.E. (2018). The history of ecological networks. In *Ecological Networks in the Tropics*; Springer: Berlin, Germany, pp. 15–28.

Kidsley, AK. Abraham, S. Bell, JM. O’Dea, M. Laird, TJ. Jordan, D. Mitchell, P. McDevitt, CA. & Trott, DJ. (2018). Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. Isolates From Healthy Pigs in Australia: Results of a Pilot National Survey. *Front. Microbiol.* 9:1207. doi: 10.3389/fmicb.2018.01207

King ZA *et al.* (2016). BiGG Models: A platform for integrating, standardizing, and sharing genome-scale models, *Nucleic Acids Research*, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1049>

Kodera, S.M., Das, P., Gilbert, J.A., Lutz, H.L. (2022). Conceptual strategies for characterizing interactions in microbial communities, *ISCIENCE*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103775>

Kohanski, M., Dwyer, D. & Collins, J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 8, 423–435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>

Levy, S., Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10, S122–S129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>

Lipsitch M, Samore MH. (2002). Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis.*8(4):347-54. doi: 10.3201/eid0804.010312

Little, A. Robinson, C. Peterson, B. Raffa, K. Handelsman, J. (2008). Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. *Annual Review of Microbiology* 62:1, 375-401. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>

Mee, M. Collins, J. Church, G. Wang, H. (2014). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (20) E2149-E2156; DOI: 10.1073/pnas.1405641111

Miller, G.; Spoolman, Scott (2009). *Living in the Environment Principles, Connections, and Solutions*. Brooks/Cole, Cengage Learning. Canada.

Mitri, S., Clarke, E. & Foster, K. (2016). Resource limitation drives spatial organization in microbial groups. *ISME J* 10, 1471–1482. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.208>

Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3(1), 371–394. doi:10.1146/annurev.mi.03.100149.002103

Morris B. E.L. Henneberger, R. Huber, H. Moissl-Eichinger, C. (2013). Microbial syntrophy: interaction for the common good, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 37, Issue 3, Pages 384–406, <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12019>

Morris JJ, Lenski RE, Zinser ER. (2012). The Black Queen Hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. *mBio* 3(2): e00036-12. doi:10.1128/mBio.00036-12

Nadell, C., Drescher, K. & Foster, K. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 14, 589–600 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.84>

Pande, S., Kaftan, F., Lang, S. *et al.* Privatization of cooperative benefits stabilizes mutualistic cross-feeding interactions in spatially structured environments. *ISME J* 10, 1413–1423 (2016). <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.212>

Piccardi, P. Vessman, B. Mitri, S. (2019). Toxicity drives facilitation between 4 bacterial species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 15979–15984.

Pringle EG (2016) Orienting the Interaction Compass: Resource Availability as a Major Driver of Context Dependence. *PLoS Biol* 14(10): e2000891. doi:10.1371/journal.pbio.2000891

Reyes-González D. De Luna-Valenciano H. Utrilla J. Sieber M. Peña-Miller R. Fuentes-Hernández A. (2022). Dynamic proteome allocation regulates the profile of interaction of auxotrophic bacterial consortia. *R. Soc. open sci.* 9212008212008 <http://doi.org/10.1098/rsos.212008>

Reyes-González, D. (2022). Dinámica ecológica de comunidades microbianas sintéticas. [Tesis para optar por el grado de Doctora en Ciencias Biomédicas]. CCG-UNAM

Ricklefs, R.E. (2008). *The Economy of Nature*, 6th edition. WH Freeman, USA.

Sachs JL, Mueller UG, Wilcox TP, Bull JJ. (2004). The evolution of cooperation. *Q Rev Biol* 79: 135–160.

Schwarz, S. Kehrenberg, C. Doublet, B. Cloeckaert, A. (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 28, Issue 5, Pages 519–542, <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>

Scott, M. Gunderson, C. Mateescu, M. Zhang, Z. Hwa, T. (2010). Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. *Science*, 330(6007):1099–1102.

Seth, E. & Taga, M. (2014). Nutrient cross-feeding in the microbial world. *Front. Microbiol*, 5, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00350>

Smith NW, Shorten PR, Altermann E, Roy NC, and McNabb WC (2019) The Classification and Evolution of Bacterial Cross-Feeding. *Front. Ecol. Evol.* 7:153. doi: 10.3389/fevo.2019.00153

Stenl kke, J. S rensen, S & Burm lle, M. (2018). Bacterial social interactions and the emergence of community-intrinsic properties, *Current Opinion in Microbiology*, 42: 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.018>

Tard o Pi, C., Reyes-González, D., Fernández-Duque, A., Fuentes-Hernández, A., Santos-Escobar, F. and Peña-Miller, R., 2022. BAFFLE: A 3D printable device for macroscopic quantification of fluorescent bacteria in space and time. *Journal of Open Hardware*, 6(1), p. None.

Tarnita, C. Levine, J. Kronauer, D. Dickinson, M. (2017). The ecology and evolution of social behavior in microbes. *J Exp Biol* 1. 220 (1): 18–24. doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.145631>

Thanos CA (1994) Aristotle and Theophrastus on plant-animal interactions. In: Arianoutsou M, Groves RH (eds) Plant-animal interactions in Mediterranean-type ecosystems. Springer, Dordrecht, pp 3–11.

Toprak, E., Veres, A., Michel, J. B., Chait, R., Hartl, D. L., & Kishony, R. (2011). Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nature genetics*, 44(1), 101–105. <https://doi.org/10.1038/ng.1034>

Van Der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. and Van Straalen, N.M. (2008), The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11: 296-310. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>

West, S., Griffin, A., Gardner, A. *et al.* Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 4, 597–607 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1461>

Yanni, D. Márquez-Zacarías, P. Yunker, R. Ratcliff, W. (2019). Drivers of Spatial Structure in Social Microbial Communities. *Current Biology*.29:11, R545-R550.<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.068>

Wilensky, U. (2007). NetLogo Solid Diffusion model. <http://ccl.northwestern.edu/netlogo/models/SolidDiffusion>. Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University, Evanston, IL.

Zamora-Muñoz, Carmen. (2019). La Tragedia de los (bienes) Comunes Garrett Hardin (1968). 25. 57-64. [https://www.researchgate.net/publication/337654216\\_La\\_Tragedia\\_de\\_los\\_bienes\\_Comunes\\_Garrett\\_Hardin\\_1968](https://www.researchgate.net/publication/337654216_La_Tragedia_de_los_bienes_Comunes_Garrett_Hardin_1968)

Zengler, K., & Zaramela, L. S. (2018). The social network of microorganisms - how auxotrophies shape complex communities. *Nature reviews. Microbiology*, 16(6), 383–390. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0004-5>

Zhang, Q. Li, R. Li J. Shi, H. (2018). Optimal Allocation of Bacterial Protein Resources under Nonlethal Protein Maturation Stress, *Biophysical Journal*, Volume 115, Issue 5, Pages 896-910, ISSN 0006-3495, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.07.021>.