



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIO SOBRE LA INTERACCIÓN  
RESISTENCIA-MOTILIDAD EN UN CONSORCIO  
BACTERIANO *ESCHERICHIA COLI* - *PAENIBACILLUS SP.***

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**ANDREA FERNÁNDEZ DUQUE**

**DIRECTOR**

**DR. RAFAEL PEÑA MILLER**

**CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS UNAM**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**SEPTIEMBRE, 2022**

*Para ella y sus recuerdos*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Rafael por darme la oportunidad de realizar un proyecto que me llevó al límite de mis capacidades y en el que tuve que desarrollar la independencia, iniciativa, el ser autodidacta y aprender a manejar la frustración. Por su siempre buen humor, disponibilidad y guía, por su emoción al ver a las bacterias, por las bromas, los consejos, el apoyo, los teoremas de pasteles y el premio por la transmutación de las especies. Por permitirme conocer un entorno que me ha forjado académicamente y donde adquirí nuevos intereses y habilidades.

Al CCG por permitirme ser parte de su comunidad y participar en diversos eventos.

A mi mamá por acompañarme, apoyarme y motivarme en todo momento, por su tiempo y disponibilidad, por los traslados que fueron fundamentales para poder terminar mis experimentos. A mi abuela y abuelo por el apoyo que me dieron toda su vida para continuar mi educación.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio: Deyanira, Fernando, Bruno, Maye, Abi y Fani. A Beto por sus visitas, ayuda y consejos para evitar la contaminación de mis cajas.

A mis sinodales por su retroalimentación, tiempo e interés. A aquellas profesoras y profesores que con su vocación me hicieron disfrutar de las materias, a Eunice por haberme apoyado y motivado desde el primer semestre.

A mi coach Edwin por confiar en mí, por haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado y tener mi primera experiencia de investigación. A Juan, por haber sido el mejor compañero en la carrera, por su ayuda, por las discusiones interesantes, chistes y explicaciones sobre la dirección del DNA.

Al CONACyT por la beca otorgada.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>8</b>
Antibióticos betalactámicos	8
Mecanismo de acción de antibióticos betalactámicos	9
Resistencia bacteriana a antibióticos betalactámicos	10
Betalactamasa TEM-1 y plásmido pBGT-1	11
Contexto ecológico para el estudio de la resistencia a antibióticos	12
Interacciones positivas y competencia	12
Comunidades bacterianas y antibióticos	14
Dispersión microbiana	15
Género <i>Paenibacillus</i>	<b>16</b>
<i>Paenibacillus vortex</i>	17
<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	19
<i>Paenibacillus lautus</i>	21
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>23</b>
Interacciones bacterianas y sobrevivencia a antibióticos	23
Heterogeneidad espacial y resistencia a antibióticos	24
Dispersión de microorganismos por <i>Paenibacillus sp.</i>	26
Consortio <i>Escherichia coli</i> - <i>Paenibacillus vortex</i>	27
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>30</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>31</b>
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
<b>ENFOQUE METODOLÓGICO</b>	<b>32</b>
Modelos computacionales	32
Primer modelo computacional del consorcio <i>Escherichia coli</i> - <i>Paenibacillus vortex</i>	33
Enfoque de modelación del proyecto: Modelo de Agentes Individuales	35
<b>METODOLOGÍA Y MATERIALES</b>	<b>37</b>
Descripción biológica del sistema experimental	37
Descripción de las características y funcionamiento del dispositivo de captura de imágenes	38
Evaluación de la distribución espacial y dinámica ecológica de las cepas en monocultivo en diferentes concentraciones de antibiótico	40
Evaluación de los patrones resultantes y la dinámica ecológica de los diferentes consorcios en medios con distintas concentraciones de antibiótico	41

Evaluación de las diferencias entre los patrones macroscópicos e interacciones microscópicas de los consorcios y monocultivos en cada concentración	42
Postulación de un modelo computacional del consorcio bacteriano	42
Definición del lenguaje de programación y <i>notebook</i>	42
Abstracción del sistema	43
Definición de la clase Bacteria y sus características	45
Modelación del metabolismo individual y división celular	46
Modelación del componente espacial	48
Modelación de la dinámica poblacional de una metacomunidad	50
<b>RESULTADOS</b>	<b>52</b>
Caracterización del sistema experimental	52
Cinéticas de crecimiento	52
Distribución espacial y dinámica en monocultivos	53
Distribución espacial y dinámica ecológica en consorcios	57
Conorcios de dos y tres elementos con <i>Paenibacillus dendritiformis</i>	57
Conorcios de dos y tres elementos con <i>Paenibacillus lautus</i>	62
Resultados del modelo computacional	68
Lectura cualitativa de las simulaciones	68
Simulación de las sustancias abióticas	69
Uso del recurso y crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>Paenibacillus sp.</i>	71
Producción de betalactamasa y antibiótico	72
Simulaciones en consorcio con medios homogéneos	76
<b>RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>
Experimentos <i>in vitro</i>	83
Patrones macroscópicos y dinámica ecológica	83
Conorcios con <i>P. dendritiformis</i>	83
Conorcios con <i>P. lautus</i>	86
Área y movilidad de las bacterias <i>cargo</i>	90
Experimentos <i>in silico</i>	93
Funcionalidad del modelo computacional	93
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>95</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>97</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>99</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>119</b>

## RESUMEN

La resistencia bacteriana a antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. La investigación en torno a este fenómeno es esencial para generar estrategias que permitan entender y atacar el problema de forma asertiva. La resistencia a antibióticos suele ser estudiada en monocultivos y en medios de cultivo homogéneos, ignorando el hecho de que en la naturaleza la mayoría de las bacterias se encuentran embebidas en comunidades microbianas rodeadas por un ambiente heterogéneo.

La respuesta de las bacterias ante los antibióticos está fuertemente moldeada por la presencia e interacción de otros microorganismos, por ejemplo, generando sinergias que incrementan su probabilidad de sobrevivir. Por otro lado, los ambientes heterogéneos como aquellos con gradientes de antibióticos presentan condiciones idóneas para la selección de mutantes resistentes, influenciando directamente la supervivencia de ciertas poblaciones bacterianas.

Con base en lo anterior, en este proyecto se estudia el comportamiento de distintos consorcios bacterianos de dos y tres integrantes en varias concentraciones de ampicilina, combinando una *E. coli* no mótil-resistente, una *E. coli* no mótil-susceptible y dos especies de *Paenibacillus* móviles-susceptibles. Las interacciones entre cepas y su ubicación espacial se capturaron en imágenes digitales a escala macroscópica y microscópica aprovechando ciertas proteínas fluorescentes. Las imágenes se editaron y analizaron con el programa ImageJ para obtener las medidas de colonización y la dinámica microscópica.

Nuestros resultados demuestran que nuevas interacciones entre los componentes del consorcio emergen como consecuencia del estrés inducido por la ampicilina. Las cepas *Paenibacillus* son capaces de acarrear diferentes especies en su camino y dicha interacción no es estática, sino que cambia dependiendo de la concentración de antibiótico.

Por otro lado, se registró la generación de patrones de crecimiento como un fenómeno emergente de los consorcios y dependientes tanto de la concentración de antibiótico como del tipo de cepa *Paenibacillus* presente.

El proyecto reitera la importancia de estudiar la resistencia a antibióticos desde un enfoque multidisciplinario, incluyendo diferentes especies y heterogeneidad ambiental para reproducir las condiciones naturales en las que se encuentran las comunidades bacterianas, y de esta manera registrar los fenómenos emergentes que tengan una consecuencia directa sobre la subsistencia de las comunidades bacterianas ante los antibióticos.

Por otro lado, se realizó un modelo computacional con base en los datos experimentales, que mediante la abstracción de ciertas características logra generalizar el comportamiento de un consorcio resistencia-motilidad. El modelo podrá ser utilizado para describir otros consorcios bacterianos que contengan en sus principales variables la movilidad, resistencia a antibióticos e interacciones entre especies.



# 1. INTRODUCCIÓN

La **resistencia antimicrobiana** es el fenómeno que sucede cuando virus, hongos, parásitos y bacterias sobreviven y se adaptan a aquellos fármacos utilizados en su contra, inutilizando tratamientos médicos para enfrentar infecciones (Dadgostar, 2019). La resistencia antimicrobiana se considera una amenaza a la salud pública mundial, particularmente aquella relacionada con las **bacterias** (Dadgostar, 2019).

Los **antibióticos**, sustancias naturales o sintéticas que inhiben el crecimiento de las **bacterias**, son una herramienta vital para tratar las infecciones bacterianas (Bottery *et al.*, 2022; Nature, 2020). Sin embargo, las bacterias son capaces de sobrevivir y/o adaptarse al antibiótico en entornos naturales y clínicos, generando un fenómeno de **resistencia a antibióticos** (Bottery *et al.*, 2022; Wiener, 1996).

El **estudio** de la **resistencia** a antibióticos cuenta con innumerables protocolos siempre y cuando se estudie en **monocultivos** y medios de cultivo **homogéneos**. Sin embargo, dichos procedimientos se ven rebasados cuando se desea estudiar la influencia de los antibióticos en **comunidades** bacterianas por la aparición de propiedades emergentes (Bottery *et al.*, 2022).

Las condiciones ambientales pueden favorecer o evitar las **interacciones** entre especies, jugando un papel fundamental en presencia de mecanismos de resistencia cooperativos (Sharma *et al.*, 2021). La susceptibilidad a un antibiótico puede verse reducida o magnificada por las interacciones con otras especies bacterianas (Adamowicz *et al.*, 2018; Bottery *et al.*, 2022). Por otro lado, hay otro factor a considerar para el estudio de la resistencia a antibióticos: la **heterogeneidad espacial**. Los gradientes se pueden entender como regiones cuya concentración de antibiótico selecciona para una variante genotípica específica (Baquero y Negri, 1997).

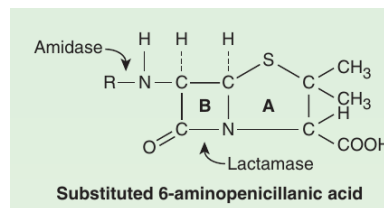
En este proyecto se estudian dos consorcios bacterianos compuestos por dos especies del género **Paenibacillus** (*P. dendritiformis* y *P. lautus*), combinadas con una **E. coli** resistente a **ampicilina** y una *E. coli* susceptible. En el proyecto se incluyen las variables mencionadas anteriormente, tales como la **diversidad taxonómica** para su estudio desde un contexto de **comunidades microbianas** y diferentes **concentraciones** de **antibiótico** para observar su comportamiento en condiciones parecidas a las encontradas en la naturaleza.



## 2. MARCO TEÓRICO

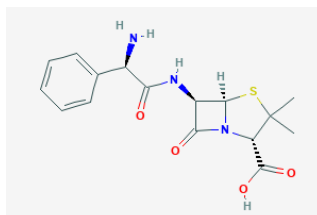
### 2.1. Antibióticos betalactámicos

Desde el descubrimiento del primer [antibiótico](#) en 1928 (**penicilina**) la **inhibición** del **crecimiento** de ciertos **microorganismos** patógenos fue posible (Fleming, 1929; García Hernández *et al.*, 2011). La **penicilina** fue el primer antibiótico perteneciente al grupo de los [antibióticos betalactámicos](#) (Fischer y Ganellin, 2006), nombrados así por presentar en su estructura química una amida cíclica de cuatro miembros, llamada **anillo betalactámico** ([Figura 2.1](#)) (Fisher *et al.*, 2005). Los betalactámicos son antibióticos de acción [bactericida](#); actúan sobre la fase final de síntesis de la pared celular (Miranda García, 2013).



**Figura 2.1.** Ácido-6-aminopenicilánico. Anillo de tiazolidina (A), anillo betalactámico (B) (Katzung *et al.*, 2012).

La **ampicilina** ([Figura 2.2](#)) es una aminopenicilina sintética de **espectro extendido** más eficaz que la penicilina pues ataca a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (Batchelor, 1959; Katzung *et al.*, 2012; Kaushik *et al.*, 2014).



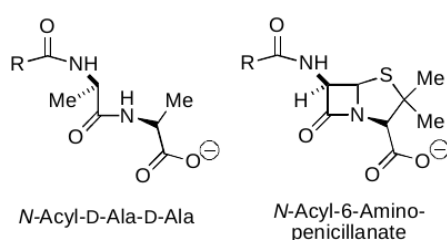
**Figura 2.2.** Estructura química de la **ampicilina** (PubChem, 2020).

### 2.1.1. Mecanismo de acción de antibióticos betalactámicos

Todos los antibióticos betalactámicos inhiben el crecimiento bacteriano interfiriendo en la reacción de **transpeptidación** para la síntesis de la **pared celular** bacteriana (Katzung *et al.*, 2012). En la transpeptidación se rompe una cadena de cinco aminoácidos del ácido-N-acetilmurámico (**NAM**), tarea que lleva a cabo una proteína (**PBP**) y que permite formar un **enlace cruzado** con el péptido más cercano de otro NAM (Katzung *et al.*, 2012; Tipper y Strominger, 1965). Los **enlaces cruzados** son fundamentales para conferir a la pared celular su **rigidez** estructural (Katzung *et al.*, 2012).

Sin embargo, en presencia de un **betalactámico**, la formación de enlaces cruzados es inhibida. Dichos antibióticos se unen a las **PBP** de las bacterias susceptibles por ser estructuralmente análogos a su sustrato natural ([Figura 2.3](#)) (Katzung *et al.*, 2012; Kaushik *et al.*, 2014).

Una vez unidos a ellas la reacción de **transpeptidación** que estas proteínas llevan a cabo es inhibida por la unión entre el antibiótico y el sitio activo de las PBP (Katzung *et al.*, 2012; Kaushik *et al.*, 2014). Como consecuencia, la pared celular deja de sintetizarse correctamente, afectando la **rigidez** estructural de la célula y llevándola a la **muerte** (Bush, 2018; Frère *et al.*, 1976; Spratt, 1983).



**Figura 2.3.** Comparación de las estructuras de un dipéptido N-acil-D-Ala-D-Ala (izquierda) y una N-acil aminopenicilina (derecha) (Fisher y Mobashery, 2009).

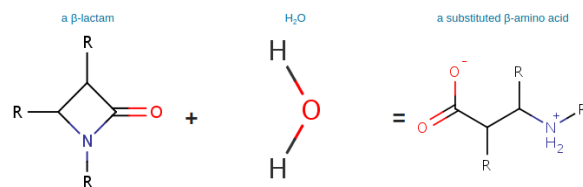
## 2.2. Resistencia bacteriana a antibióticos betalactámicos

A la par del descubrimiento de la penicilina, se descubrió que no todas las **bacterias** eran afectadas igualmente por el agente bactericida; presentaban **resistencia** (Fleming, 1929). La **resistencia a antibióticos** es la **habilidad heredable** de los **microorganismos** que les permite crecer en concentraciones altas de **antibióticos** y se mide por medio de la **concentración mínima inhibitoria (MIC)** (Brauner *et al.*, 2016).

Actualmente se sabe que la **resistencia** a antibióticos **betalactámicos** es consecuencia de alguno de los siguientes mecanismos celulares (Katzung *et al.*, 2012):

- Inactivación enzimática del antibiótico por producción de betalactamasas.
- Modificación de la proteína diana (PBP).
- Reducción de la permeabilidad o paso del antibiótico.
- Mecanismo de eflujo o expulsión del antibiótico.

El **mecanismo** de resistencia más común contra los antibióticos betalactámicos es la producción de **betalactamasas**, un conjunto de **enzimas** (Hall y Barlow, 2004; Katzung *et al.*, 2012). Las **betalactamasas** son capaces de hidrolizar compuestos químicos que contienen un anillo betalactámico (Bush, 2018; Katzung *et al.*, 2012). Específicamente, las betalactamasas **hidrolizan** el **enlace amida** del anillo betalactámico (**Figura 2.4**) (Matagne *et al.*, 1998).



**Figura 2.4.** Reacción llevada a cabo por la betalactamasa TEM-1 (UniProt, 2020).

### 2.2.1. Betalactamasa TEM-1 y plásmido pBGT-1

En las bacterias **Gram negativas** la adquisición de resistencia a antibióticos betalactámicos se debe en su mayoría a la **transferencia horizontal** de **elementos genéticos**, como los **plásmidos** (Bush, 2018). Tal es el caso de la **betalactamasa TEM-1**.

En 1963 se aisló la bacteria resistente a penicilina ***E. coli* TEM**, argumentando que la resistencia se debía a la presencia de un plásmido de resistencia, específicamente **R<sub>TEM</sub>**, conocido ahora como **TEM-1** (Bush, 2018; Datta y Kontomichalou, 1965; Miranda García, 2013; Salverda *et al.*, 2010).

**TEM-1** codifica para la enzima **penicilinas** (**EC 3.5.2.6**), conocida también como **betalactamasa TEM-1**, la cual otorga una resistencia elevada a penicilinas, con una hidrólisis relativa mayor hacia la **ampicilina** (Datta y Kontomichalou, 1965; Medeiros, 1984; Rodriguez-Beltran *et al.*, 2018; Salverda *et al.*, 2010).

Actualmente la **betalactamasa TEM-1** es uno de los sistemas **mejor caracterizados** ya que se conoce su **secuencia** y las secuencias de aquellas betalactamasas que a su vez derivan de TEM-1 (Miranda García, 2013; San Millan *et al.*, 2016). Por estas razones la betalactamasa TEM-1 se considera un **modelo excelente** para el **estudio** de la **evolución** molecular *in vitro* transformando el cromosoma bacteriano con su respectivo gen (**bla<sub>TEM1</sub>**) o por medio de **plásmidos** (Rodriguez-Beltran *et al.*, 2018; San Millan *et al.*, 2016).

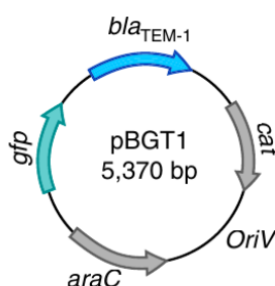


Figura 2.5. Mapa del plásmido pBGT-1 (Rodriguez-Beltran *et al.*, 2018).

Uno de estos plásmidos es **pBGT-1**, originado sintéticamente a partir de los plásmidos pBGT y pBGT R164S (Rodriguez-Beltran *et al.*, 2018). pBGT-1 le otorga a las células portadoras **resistencia** a medios con concentraciones de hasta **8,192 mg/l** de **ampicilina** gracias la síntesis de la **betalactamasa TEM-1** (San Millan *et al.*, 2016). A su vez, contiene

el gen para la **proteína verde fluorescente (gfp)** controlada por un promotor inducible de **L-arabinosa (araC)** y resistencia a cloranfenicol por el **gen cat** ([Figura 2.5](#)) (Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2018; San Millán *et al.*, 2016). En este proyecto se utilizará justamente el plásmido **pBGT-1**.

## 2.3. Contexto ecológico para el estudio de la resistencia a antibióticos

Es importante recordar que en la **naturaleza** los microorganismos no se encuentran aislados, sino viviendo en presencia de otras especies y formando **comunidades** (Song *et al.*, 2014). En una comunidad biológica las diferentes especies forman una red de **interacciones intra e interespecíficas** y no estáticas (Mougi y Kondoh, 2012; Thompson, 1988). Estas interacciones pueden ser positivas (+), neutrales (0) o negativas (-), dependiendo desde cuál componente de la interacción se estudie (Martín, 2009). Las interacciones interespecíficas se conocen como **mutualismo (+,+)**, **amensalismo (-,0)**, **comensalismo (+,0)**, **depredación o parasitismo (+,-)**, **competencia (-,-)** y **neutralismo (0,0)**.

### 2.3.1. Interacciones positivas y competencia

Los **mutualismos**, una interacción positiva en donde todos los componentes resultan beneficiados, juegan papeles importantes en determinar cómo se organizan las comunidades biológicas (Little, *et al.*, 2008; Traveset y Richardson, 2014). Si bien los mutualismos más conocidos son **monofilicos** (compuestos por dos especies), existen mutualismos **oligofilicos** y **polifilicos** (menos de cinco especies y más de cinco, respectivamente) (Boucher *et al.*, 1982). Aquellos mutualismos donde existe contacto físico directo entre los componentes pueden clasificarse como **simbióticos** si son obligados y generados por coevolución, o **no simbióticos** si son **facultativos** y de origen no evolutivo (Boucher *et al.*, 1982).

Generalmente se describen con base en los **bienes** intercambiados entre especies, por ejemplo, un bien **nutricional**, **energético**, de **protección** o de **transporte** (Boucher *et al.*, 1982). Los mutualismos obligados generalmente intercambian bienes nutricionales y energéticos, mientras que los **facultativos** pueden intercambiar además bienes de **protección** o **transporte** (Boucher *et al.*, 1982). Por esta razón no es sorprendente que las

interacciones positivas entre especies sean una vía para expandir el **nicho ecológico** y aumentar la **persistencia** poblacional, influenciando los valores de riqueza y abundancia de las comunidades (Cordes, *et al.*, 2005).

A los productos o funciones de los comportamientos cooperativos microbianos se les conoce como **bienes públicos** y una de sus características más importantes es proveer un **beneficio colectivo**, así como incrementar la densidad poblacional (Smith y Schuster, 2019). Sin embargo, si los bienes del mutualismo se difunden al ambiente, existe la posibilidad de ser aprovechados por bacterias que se encuentran coexistiendo en el mismo ambiente pero que no pagan el costo por formar parte del mutualismo. A estas **bacterias** se les conoce como ***cheaters***; individuos no cooperativos que se benefician de la producción de bienes públicos sin generar un bien público a cambio que beneficie a toda la comunidad (Dunny *et al.*, 2008; Smith y Schuster, 2019).

Los estudios de interacciones con ***cheaters*** han permitido definir que su presencia en cocultivo con cepas productoras de bienes afecta la densidad poblacional de las bacterias productoras, llegando incluso a desplazar por completo a la población productora (Smith y Schuster, 2019). Por lo tanto, las bacterias ***cheaters*** presentan una **interacción** de tipo **competencia** que puede afectar la biodiversidad de las comunidades donde se encuentre (Leinweber *et al.*, 2017). Por otro lado, existen bacterias capaces de producir **metabolitos secundarios** con acción **bactericida**, que a diferencia de los bienes públicos mencionados anteriormente, generan un efecto contrario (Wiener, 1996). Este fenómeno se ha descrito como una **adaptación** para inhibir a los microorganismos que **compiten** por los mismos recursos que los microorganismos productores de antibióticos (Wiener, 1996).

Por ejemplo, los microorganismos productores son capaces de **invadir** territorios colonizados por otras poblaciones no productoras e inhibir su crecimiento, así como prevenir la invasión hacia su colonia (Wiener, 1996). Sin embargo, a la par de la producción de antibióticos por microorganismos y su relativo éxito, se seleccionaron las primeras **bacterias resistentes** a estos metabolitos secundarios (Wiener, 1996).

### 2.3.2. Comunidades bacterianas y antibióticos

Si bien los **mecanismos de resistencia bacteriana** a antibióticos se pueden identificar en células individuales, todavía no se entiende con la misma claridad cómo suceden estos procesos en ambientes naturales con **comunidades microbianas complejas** (Klümper *et al.*, 2019; Vega y Gore, 2014).

La susceptibilidad a antibióticos puede verse reducida o magnificada por diversos factores bióticos, por ejemplo mediante el **efecto inóculo** o la formación de **biopelículas** (Bottery *et al.*, 2022). El **efecto inóculo** es una estrategia de comportamiento cooperativo que explica cómo a mayor densidad celular se registra una menor eficacia de los antibióticos que se encuentran en el entorno (Tan *et al.*, 2012). Estrictamente hablando, el efecto inóculo es un fenómeno de **tolerancia** a antibióticos, sin embargo, si la tolerancia sucede por **periodos prolongados**, puede permitir la **selección de mutantes resistentes** (Tan *et al.*, 2012).

Por otro lado, con la formación de **biopelículas** (*biofilms*) también se registran eventos de **tolerancia** a antibióticos. Las biopelículas son consorcios de bacterias embebidos en una matriz autosecretada de polisacáridos, proteínas y DNA (Hoiby *et al.*, 2010). Las biopelículas presentan tolerancia a ciertos antibióticos, llegando a aumentar su MIC de cien hasta mil veces comparada con aquella registrada para bacterias en cultivo líquido (Hoiby *et al.*, 2010).

Otro de los factores que permite la supervivencia de varias especies bacterianas a medios con antibiótico es la producción de **enzimas** degradadoras de antibióticos que generan un efecto protector a la comunidad (Bottery *et al.*, 2022). Por ejemplo, ciertas bacterias productoras de **betalactamasa** muestran la capacidad de proteger a bacterias **susceptibles** a penicilina mediante la **liberación** de la **enzima** al ambiente (bien público) (Brook, 2009).

Otro fenómeno interesante en ambientes con antibiótico se encuentra cuando las especies de la comunidad presentan **codependencia metabólica obligada** con otras especies. Se ha demostrado que cuando las cepas involucradas en dicho mutualismo presentan diferencias en su MIC a cierto antibiótico, y son cultivadas juntas, la MIC de la comunidad es igual a la MIC de la cepa menos resistente (Adamowicz *et al.*, 2018).

Por lo tanto, la habilidad de una especie para crecer en presencia de **antibiótico** es una **combinación** de su **tolerancia** intrínseca a dicho antibiótico pero también de la tolerancia de las otras bacterias con las que coexiste e interactúa (Adamowicz *et al.*, 2018). En un contexto clínico la sensibilidad a antibióticos debe considerarse como una **propiedad emergente** de las infecciones polimicrobianas, determinadas por las propiedades genéticas del patógeno, su **ambiente** físico y la **diversidad** bacteriana que le rodea (Bottery *et al.*, 2022).

Para estudiar este tipo de **interacciones** se hace uso de los **consorcios** microbianos, considerados **elementos verdaderos** de los ecosistemas y una herramienta para desmenuzar la **complejidad** de las comunidades (Haruta y Yamamoto, 2018; Hu *et al.*, 2010).

### 2.3.3. **Dispersión microbiana**

La **dispersión** es el movimiento de los organismos a través del espacio y tiempo, y es otro de los procesos fundamentales para definir la **estructura** e **interacciones** de las **comunidades** biológicas (Custer *et al.*, 2022). Dependiendo del mecanismo que origina la movilidad, la dispersión microbiana se puede clasificar como activa o pasiva:

- **Activa:** Iniciada por procesos internos y movimiento directo de la célula, tal como el uso de flagelos o cilios.
- **Pasiva:** Mediada por fuerzas externas físicas (corrientes de agua o viento) o biológicas (vectores, acarreo).

Por otro lado, dependiendo de su tasa de éxito se puede clasificar como **efectiva** (establecimiento exitoso después del evento de dispersión) o **inefectiva** (después de la dispersión se presenta un periodo corto de persistencia), ambas generando impactos a largo plazo en la estructura de las comunidades microbianas receptoras (Custer *et al.*, 2022).

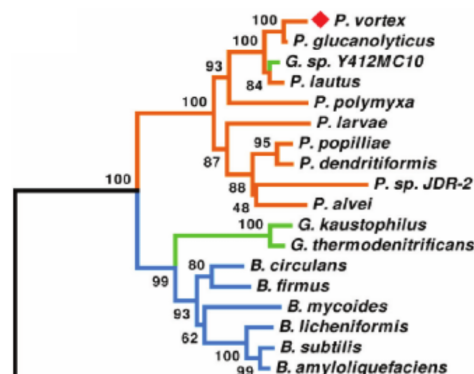
Las comunidades microbianas generalmente están formadas por **subpoblaciones** con diferentes tasas de **movilidad**, lo que promueve la **segregación espacial** de subpoblaciones y la generación de **patrones** de distribución (Zuo y Wu, 2020). La dispersión se vuelve relevante al saber que diferentes **genotipos** son favorecidos por diferentes **ambientes** (Clarke *et al.*, 2020; Hermsen y Hwa, 2010; Shade *et al.*, 2008).



Las bacterias productoras de bienes públicos cuentan con algunas estrategias para aumentar la cooperación entre células semejantes y así excluir a las *cheaters*. Entre estas estrategias se encuentra la **estructuración espacial** y la **disminución de su dispersión**, lo que en última instancia favorece la formación de áreas poblacionalmente **homogéneas** (Smith y Schuster, 2019). Es decir, a menor movilidad, mayor homogeneidad en la población.

## 2.4. Género *Paenibacillus*

*Paenibacillus* es un género parafilético de bacilos **Gram positivos**, de **2 a 6µm** de longitud, **anaerobios facultativos**, formadores de **esporas** elipsoidales, con **flagelos peritricos**, capaces de **fermentar** una variedad de azúcares y secretores de **enzimas** hidrolíticas (Ash *et al.*, 1993; Celandroni *et al.*, 2016; Grady *et al.*, 2016; Loong *et al.*, 2018). El árbol filogenético lo ubica como grupo hermano del género *Bacillus* (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Árbol filogenético basado en rRNA 16S de *Paenibacillus* (P), *Bacillus* (B), *Geobacillus* (G) (Sirota-Madi *et al.*, 2010).

Una de las características más llamativas del género es su habilidad para formar **estructuras** multicelulares **complejas** y **patrones** en superficies de agar, un fenómeno generado por su movilidad en **swarming**; el **movimiento colectivo coordinado** de bacterias **alineadas** por su eje longitudinal sobre una superficie **sólida** (Ben-Jacob, 2014; Ben-Jacob *et al.*, 1998, 2016; Harshey, 2003; Turner *et al.*, 2010; Zeigler, 2013). Las especies más estudiadas en este aspecto son *P. vortex* y *P. dendritiformis*.

Bacterias de *Paenibacillus* se han aislado tanto de muestras **ambientales** (suelos, agua, rizósfera, tejidos de plantas, tejidos de insectos), como de muestras **clínicas** (catéteres, orina, sangre) de las que se ha registrado la presencia de **genes de virulencia y resistencia a antibióticos** (Celandroni *et al.*, 2016).

A continuación se describen tres especies del género *Paenibacillus*, todas ellas de interés para el proyecto aquí presentado.

#### 2.4.1. *Paenibacillus vortex*

*P. vortex* es una bacteria del suelo originalmente aislada en Israel, con 2 a 8 flagelos por micrómetro de longitud (Figura 2.7), y con una **organización social** que le permite formar **patrones complejos** mediante uniones físicas y señalización química (Ben-Jacob, 2014; Ingham y Ben-Jacob, 2008; Roth *et al.*, 2013; Sirota-Madi *et al.*, 2010).

Su epíteto específico (**vortex**) se debe a su característico crecimiento por medio de la **rotación vigorosa** de sus colonias completas (Figura 2.8) (Ingham y Ben-Jacob, 2008; Sirota-Madi *et al.*, 2010). La **rotación** observada puede deberse a la **forma curvada** de las células, que tienen una **desviación** promedio de **18.6°** (Ingham y Ben-Jacob, 2008; Zeigler, 2013).

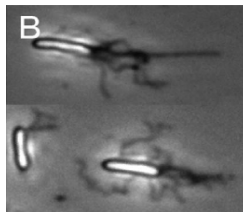
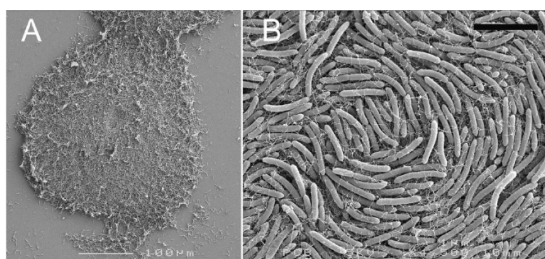


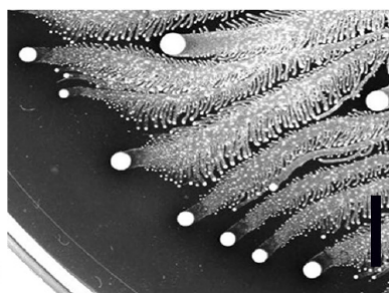
Figura 2.7. Células de *P. vortex* en agar MH mostrando sus flagelos (1.5% w/v) (Ingham y Ben-Jacob, 2008)

Los patrones de *P. vortex* son el resultado de la **atracción, repulsión, fusión y separación** de **vórtices** gracias a su desplazamiento por *swarming*, sin embargo, este es un fenómeno sensible y dependiente de las condiciones ambientales; en *P. vortex* el *swarming* se deja de observar cuando la temperatura asciende a **42°C** (Ingham y Ben-Jacob, 2008).



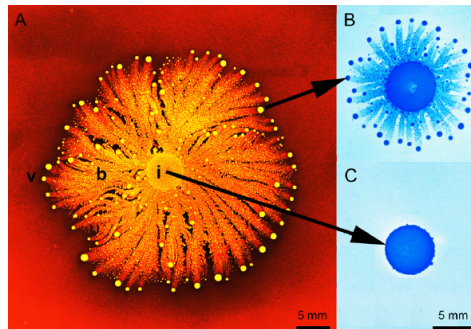
**Figura 2.8.** A: Vista de una colonia rotatoria de *P. vortex* en contacto con otra colonia. B: Centro de la colonia con el patrón típico vortex (Ingham y Ben-Jacob, 2008).

En **superficies** con **baja** concentración de agar, el patrón de crecimiento de *P. vortex* se ve dominado por la formación de estructuras ‘**serpiente**’, las cuales se extienden con rapidez (Zeigler, 2013). Por otro lado, en **superficies** relativamente **duras** (1.5 - 2.25% agar w/v), el crecimiento de *P. vortex* se caracteriza por la formación de **enjambres** y **vórtices** (Figura 2.9). Cada **vórtice** funciona como **inóculo** para generar una nueva colonia (Ingham y Ben-Jacob, 2008; Roth *et al.*, 2013; Sirota-Madi *et al.*, 2010).



**Figura 2.9.** Crecimiento de *P. vortex* en un plato de agar. Se pueden observar sus ramas y vórtices (Sirota-Madi *et al.*, 2010).

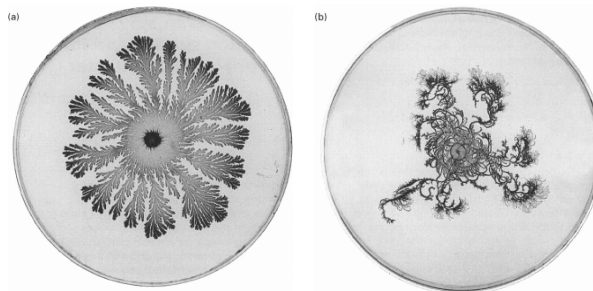
*P. vortex* mantiene dos **subpoblaciones** diferentes fenotípicamente: **células vegetativas (constructoras)** de poca movilidad que mantienen el crecimiento de la colonia, y **células hiper-flageladas y elongadas (exploradoras)** que se dedican a expandir la colonia (Figura 2.10) (Finkelshtein *et al.*, 2016; Harshey, 2003). Ambos **morfotipos coexisten** en cultivo y son **interconvertibles**, sin embargo, sus proporciones cambian dependiendo de la edad y condiciones ambientales (Finkelshtein *et al.*, 2016).



**Figura 2.10.** Fenotipo constructor (*builders*) de *P. vortex* (C) y fenotipo explorador (*explorers*) de *P. vortex* (B). Colonia de *P. vortex* (A) (Roth *et al.*, 2013).

### 2.4.2. *Paenibacillus dendritiformis*

*P. dendritiformis*, descrita por primera vez en 1999, es una **bacteria del suelo, móvil** y formadora de **patrones**, característica a la que hace referencia su epíteto específico ***dendritiformis*** (*dendron*: árbol, *fomis*: forma) (Tcherpakov, 1999). Posee dos **morfotipos interconvertibles** en su colonia: **ramificado (T)** y **quiral (C)** (Figura 2.11) (Sirota-Madi *et al.*, 2012).

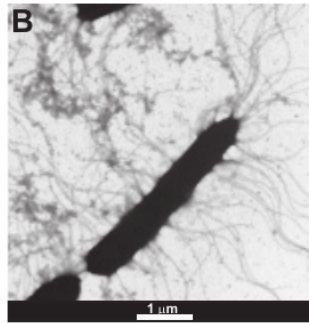


**Figura 2.11.** Morfotipo T (a) y morfotipo C (b) de *P. dendritiformis* creciendo en medio sólido (Tcherpakov, 1999).

El **morfotipo T** está marcado por la **ramificación** de las **puntas** de la colonia y presenta bacilos de menores longitudes, mientras que el **morfotipo C** genera **ramas rizadas** con una orientación bien definida y bacilos rígidos **hiper elongados** y **flagelados** (Sirota-Madi *et al.*, 2012). La **concentración** de **agar** en el medio influencia el tipo de patrón resultante; el morfotipo **T** se observa a mayores concentraciones de agar y a menores concentraciones aparece el morfotipo **C** (Ben-Jacob *et al.*, 1995).

Los **bacilos** del **morfotipo C** presentan un amplio rango de **longitudes**, con un promedio de 17µm, lo que dificulta su rotación y la probabilidad de formar remolinos (Be'er *et al.*,

2013). Dependiendo de las condiciones ambientales pueden presentar hasta 100 flagelos por célula, repartidos uniformemente y en ocasiones formando ramilletes (Be'er *et al.*, 2013) ([Figura 2.12](#)).



**Figura 2.12.** Flagelos peritricos de *P. dendritiformis* (Be'er *et al.*, 2013).

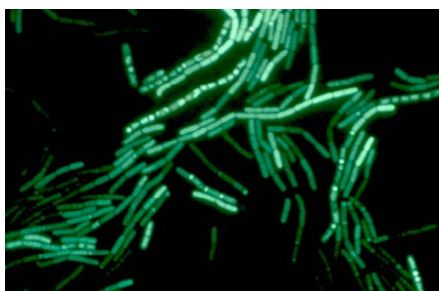
Por otro lado, los **bacilos** del **morfotipo T** tienen una longitud de 4μm, lo que les permite rotar y formar remolinos a nivel microscópico (Be'er *et al.*, 2009). En conjunto se trasladan mediante **swarming** en una matriz secretada por las mismas células (**surfactante**), lo que les permite desarrollar patrones macroscópicos con forma de **arbusto** (Be'er *et al.*, 2009) ([Figura 2.11](#)).

Cuando el **morfotipo T** se desarrolla en **medios ricos** en nutrientes, la velocidad y crecimiento de la colonia están influenciados por la **concentración** de **agar** en el medio (Be'er *et al.*, 2009). Contrario a lo que se esperaría, la fuerza impulsora del **crecimiento** de la **colonia** no es la movilidad de las células individuales, sino de la capacidad de la colonia para producir un **surfactante** que reduzca la tensión del agar (Be'er *et al.*, 2009).

### 2.4.3. *Paenibacillus lautus*

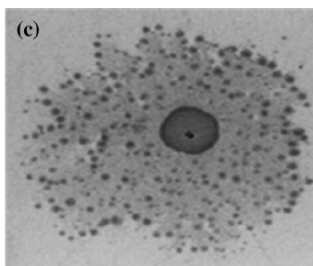
*P. lautus* (*lautus*: espléndida, elegante) es una bacteria descrita por primera vez en 1984 de 2.25 a 4.5µm de longitud, que cuenta con una variedad de enzimas para **degradar** celulosa, **fermentar** glucosa, maltosa y sacarosa (Batchelor, 1919; Loong *et al.*, 2018; Nakamura, 1984; Yadav, 2018) ([Figura 2.13](#)).

Haciendo honor a su género se mueve mediante **swarming**, crea **patrones** y **vórtices** en superficies de agar y presenta dos **subpoblaciones interconvertibles**. Los **vórtices** crecen y se expanden al exterior, estableciendo nuevas colonias a su paso ([Figura 2.14](#)) (Mangwani *et al.*, 2014).



**Figura 2.13.** Micrografía de *P. lautus* (teñida con colorante fluorescente) (Mead *et al.*, 2012).

Se ha **aislado** de una gran variedad de **ambientes**, encontrándose en muestras de **orina**, en el **tracto intestinal humano**, aguas termales, agua marina, suelos, tejidos de insectos, en la superficie de ciertos frutos e incluso en tinta para tatuar (Batchelor, 1919; Biocyc, 2020; Celandroni *et al.*, 2016; Loong *et al.*, 2018; Mangwani *et al.*, 2014; Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011; Yadav, 2018).

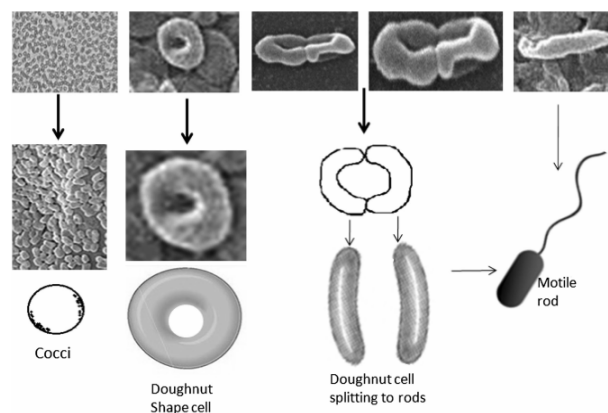


**Figura 2.14.** Patrón de *P. lautus* generado por el *swarming* en caja con 1.5% agar (Mangwani *et al.*, 2014).

*P. lautus* tiene la capacidad de **resistir** distintos **antibióticos**, como la penicilina, **ampicilina**, clindamicina y cloranfenicol, entre otros (Celandroni *et al.*, 2016; Loong *et al.*, 2018). Se ha reportado también su capacidad para producir compuestos antimicrobianos, como la iturina A y surfactina (Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011).

Al crecer en platos de agar, *P. lautus* es capaz de formar biopelículas y presentar dos morfotipos interconvertibles; **cocos** y **bacilos** (Mead *et al.*, 2012). Los **cocos** no presentan **movilidad**, mientras que los **bacilos** sí. La fracción de bacilos en la población aumenta conforme una se aleja del centro de la colonia; respectivamente, al adentrarse al centro de la colonia la fracción de cocos aumenta (Mangwani *et al.*, 2014).

El **cambio fenotípico** de las células de *P. lautus* se da ante el **exceso de población**; los **cocos** son capaces de transformarse en **bacilos flagelados**, capaces de **migrar** a zonas donde la densidad poblacional sea menor y los recursos estén disponibles para establecer una nueva colonia (Mangwani *et al.*, 2014). Durante la conversión de un morfotipo a otro presentan un **estadio intermedio** con forma de **dona** (Mangwani *et al.*, 2014) ([Figura 2.15](#)).



**Figura 2.15.** Diferentes fases del cambio de morfotipo de *P. lautus* (coco, dona y bacilo) (Mangwani *et al.*, 2014).

Si bien las **infecciones** en humanos por *P. lautus* son raras y tienden a desarrollarse en pacientes inmunocomprometidos, la bacteria se considera un **patógeno oportunista** por el tipo de **ambientes** de donde ha sido aislada, por su capacidad para colonizar ambientes por medio del **swarming** y por su **resistencia** a diversos antibióticos (Grady *et al.*, 2016; Loong *et al.*, 2018).

## 3. ANTECEDENTES

### 3.1. Interacciones bacterianas y sobrevivencia a antibióticos

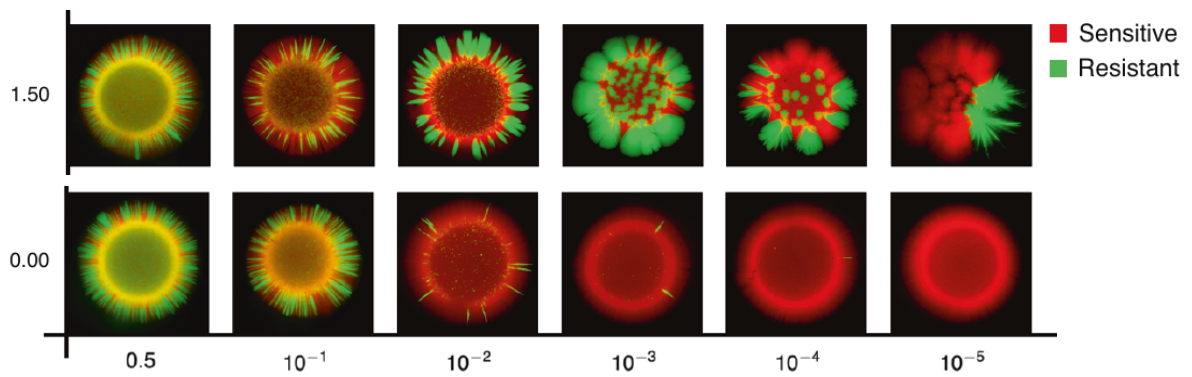
Cada vez existen más estudios en torno a los **antibióticos** que incluyen entre sus variables la **diversidad bacteriana** e **interacciones interespecíficas**. Por ejemplo, en el 2018 se indujo un mutualismo obligado por medio de la producción recíproca de metabolitos esenciales ([cross-feeding](#)) en un consorcio sintético de tres integrantes y se estudió su MIC (Adamowicz *et al.*, 2018).

El estudio permitió determinar que aunque los componentes del consorcio presentaban una MIC mayor en monocultivo, al existir una **interdependencia** metabólica y desarrollarse en cocultivo, la **MIC del consorcio** se redujo a la MIC de la cepa menos resistente; el eslabón más débil (Adamowicz *et al.*, 2018). Por lo tanto, la generación de **interacciones** interespecíficas como el *cross-feeding*, altera directamente la **tolerancia a antibióticos** de una comunidad llegando incluso a reducir la supervivencia grupal como consecuencia de la dependencia obligada (Adamowicz *et al.*, 2018).

Por otro lado, existen estudios donde el tipo de interacción inducida es diferente: bacterias **susceptibles** logran **sobrevivir** a concentraciones letales de antibiótico cuando se desarrollan en cocultivo con bacterias resistentes (Sharma, *et al.*, 2021). Este fenómeno se observa, por ejemplo, en un estudio de *Enterococcus faecalis* crecida en diferentes **concentraciones** de antibiótico con una mezcla de *E. faecalis* resistentes y susceptibles en el inóculo inicial (Sharma *et al.*, 2021).

El estudio permitió confirmar que las células susceptibles tienen posibilidad de sobrevivir a medios con antibiótico en concentraciones letales cuando se desarrollan en **poblaciones mixtas** con cepas **resistentes** (Sharma *et al.*, 2021). Se pudo determinar que la **concentración** de antibiótico en el medio y la **proporción** entre células **resistentes** y **susceptibles** en el **inóculo** inicial determinan los **patrones** resultantes de la interacción ([Figura 3.1](#)) (Sharma *et al.*, 2021).





**Figura 3.1.** Patrones espaciales en *E. faecalis* dependientes de la concentración de antibiótico y fracción resistente inicial. Las filas representan concentración nula de AMP (0.00) y concentración alta de AMP (1.50). Las columnas representan la proporción de inóculo resistente inicial (0.5 a  $10^{-5}$ ). Verde: células resistentes. Rojo: células susceptibles (Sharma *et al.*, 2021).

## 3.2. Heterogeneidad espacial y resistencia a antibióticos

Otro **factor** que influencia la **estructura** y **evolución** de las **comunidades microbianas** es la **heterogeneidad espacial** o **ambiental**. Como se comentó anteriormente, diferentes **genotipos** son favorecidos por diferentes **ambientes** (Clarke *et al.*, 2020; Hermsen y Hwa, 2010; Shade *et al.*, 2008).

La **heterogeneidad ambiental** es un factor particularmente importante cuando se desea estudiar la **resistencia** a antibióticos en **bacterias**, pues las **condiciones ambientales** influyen la presencia, aparición o adquisición de alelos de resistencia, así como la supervivencia o muerte de ciertas especies (Clarke *et al.*, 2020).

Gran parte del conocimiento existente sobre **resistencia** a **antibióticos** deriva de **experimentos** hechos en **medios** de cultivo **homogéneos**, sin embargo, existen numerosos estudios indicando que la **heterogeneidad** en la **concentración** del antibiótico puede modular la **evolución** de la **resistencia** (Sharma *et al.*, 2021).

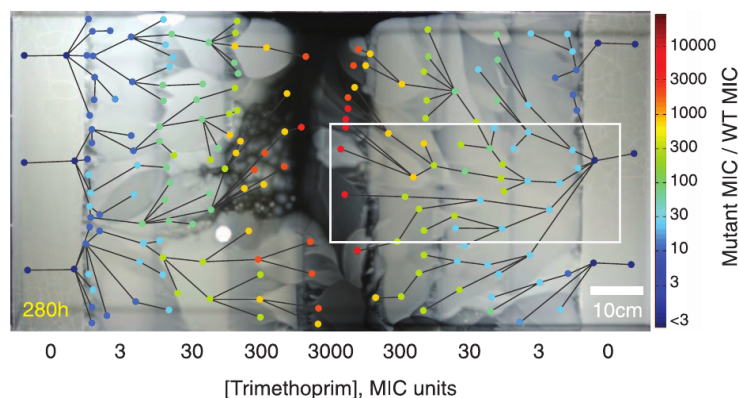
Por otro lado, la **heterogeneidad espacial** puede jugar un papel importante en presencia de **mecanismos** de **resistencia cooperativos**; puede facilitar o inhibir **interacciones** entre organismos, generando un ambiente donde la **cooperación**, **competencia** y **selección** son potencialmente moldeados por los parámetros espaciales (Sharma *et al.*, 2021).

En el 2011 se descubrió que en **presencia** de un **gradiente** de ciprofloxacina y ante el cual *E. coli* resultaba originalmente **susceptible**, se favorece la **selección** de **mutantes resistentes** que rápidamente colonizan el área con mayor concentración de antibiótico, alcanzando una resistencia de 200 veces su MIC original ([Figura 3.2](#)) (Zhang *et al.*, 2011).



**Figura 3.2.** Inóculo de  $10^6$  células de *E. coli* (con proteína verde fluorescente) creciendo en un plato con un gradiente de ciprofloxacina (CIPRO -, CIPRO +). Crecimiento a las 5 horas desde la inoculación, ubicado únicamente en el centro (a). Crecimiento a las 30 horas logra colonizar los bordes del plato, donde se encuentra la concentración más alta de ciprofloxacina (b) (Zhang *et al.*, 2011).

Otro de los descubrimientos más llamativos sobre este tema sucedió en 2016, donde se detectó cómo *E. coli*, originalmente **susceptible** a trimetoprima (TMP) experimenta una selección hacia sus mutantes resistentes gracias a la presencia de regiones con una **presión selectiva moderada** ([Figura 3.3](#)) (Baym *et al.*, 2016).



**Figura 3.3.** MEGA plate con trimetoprima a diferentes concentraciones. Después de 12 días *E. coli* logra colonizar áreas del plato con una concentración tres mil veces mayor gracias al surgimiento de mutantes. Los puntos de colores indican el seguimiento de las mutantes y su nueva MIC (Baym *et al.*, 2016).

Existen otros enfoques para estudiar la influencia de la heterogeneidad ambiental sobre la resistencia a antibióticos, por ejemplo al modificar el **medio de cultivo**, las **condiciones aeróbicas** y la **fuentes de carbono** (Clarke *et al.*, 2020).

### 3.3. Dispersión de microorganismos por *Paenibacillus sp.*

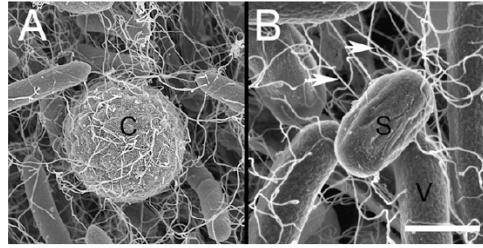
Los microorganismos presentan varias **estrategias** para atravesar los obstáculos **físicos** y **geográficos** de su ambiente; por ejemplo, ser arrastrados por corrientes de agua, por el viento, o por un organismo más grande (Ben-Jacob *et al.* 2016). El **swarming** es precisamente uno de los **mecanismos** por el que algunos microorganismos sésiles son transportados por microorganismos móviles (Ben-Jacob *et al.* 2016).

En esta dispersión facilitada mediante **swarming** existen dos componentes: el **transportador**, que es el organismo que provee la fuerza para el movimiento, y el **cargo** o cargamento, que es el organismo transportado (Ben-Jacob *et al.* 2016).

El desplazamiento de las especies de *Paenibacillus* mediante **swarming**, la formación de **patrones**, la **capacidad de transportar** a otros microorganismos y el hecho de que las **bacterias móviles** se consideran más **hábiles** para enfrentar cambios ambientales, inspiraron nuevas investigaciones sobre las posibles **interacciones**, **costos** y **beneficios** entre *Paenibacillus sp.* y los **cargos** que estaría arrastrando en su camino (Finkelshtein *et al.*, 2015; 2016).

*P. vortex* es capaz de arrastrar otros organismos dependiendo de las condiciones de estrés del medio y necesidades de la colonia; puede **transportar algas fotosintéticas** cuando los **recursos** alimenticios **escasean** para posteriormente consumirlas, o trasladar *E. coli* recombinantes con características útiles, como la expresión de **betagalactosidasas** y **celulasas** que aprovechan para consumir los recursos del medio (Ben-Jacob, 2014; Polikovsky *et al.*, 2015).

También se ha registrado su capacidad para arrastrar esporas de *Aspergillus fumigatus*, donde la bacteria utiliza el **micelio** del hongo como medio para **transportarse** por los espacios de aire en el suelo, mientras que los **conidios** del hongo son **dispersados** por la bacteria al quedar atrapados entre sus flagelos ([Figura 3.4](#)) (Finkelshtein *et al.*, 2016; Ingham *et al.*, 2011).



**Figura 3.4.** Conidio de *A. fumigatus* (C) siendo transportado por un enjambre de *P. vortex* (A). Espora de *P. vortex* transportada por un enjambre de *P. vortex* (B). Durante el *swarming*, los flagelos de *P. vortex* atrapan en su camino a los conidios y a las esporas (Ingham *et al.*, 2011).

*P. dendritiformis* y *P. lautus* han sido poco estudiadas en este aspecto, sin embargo, los estudios existentes se presentan como una primera proyección de lo que potencialmente se puede estudiar con estas dos especies.

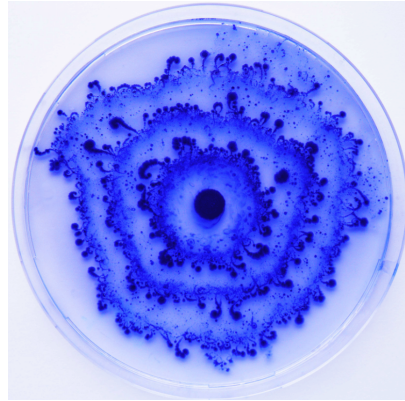
### 3.3.1. Consorcio *Escherichia coli* - *Paenibacillus vortex*

Haciendo énfasis en las características del *cargo*, en el 2015 se desarrolló el **consorcio bacteriano *Escherichia coli* - *Paenibacillus vortex***, compuesto por un agente **trasladado** y con menor movilidad (*E. coli*) y un agente **transportador** (*P. vortex*).

El parámetro más interesante que se puede modificar del consorcio es el agente **trasladado** (*E. coli*), modificado para presentar **resistencia a antibióticos betalactámicos** mediante el gen *bla*<sub>TEM-1</sub> (Finkelshtein *et al.*, 2015). En presencia de **ampicilina**, (y recordando que *P. vortex* es susceptible a antibióticos betalactámicos), el consorcio *E. coli* - *P. vortex* desarrolla un **mutualismo por conveniencia**, es decir, una **cooperación temporal** influenciada por la presencia del antibiótico que permite que ambas bacterias prosperen (Finkelshtein *et al.*, 2015; Roth *et al.*, 2013). El consorcio presenta una **correlación positiva** entre **resistencia** a ampicilina y **dispersión** (Finkelshtein *et al.*, 2015).

En **monocultivo** y bajo estas condiciones ninguna de las especies es capaz de utilizar todos los recursos del plato de agar, sin embargo, en **cocultivo**, *E. coli* (con una capacidad significativamente menor para translocarse) es **dispersada** gracias a *P. vortex*; y *P. vortex*, **susceptible** a ampicilina, logra **sobrevivir** y **expandirse** gracias a que *E. coli* descontamina el medio ([Figura 3.5](#)) (Finkelshtein *et al.*, 2015).

El consorcio crece formando **anillos concéntricos** con periodos de expansión reducida y acelerada, coincidiendo respectivamente con la **detoxificación** del medio por *E. coli* y el posterior **swarming** de *P. vortex* ([Figura 3.5](#)) (Finkelshtein *et al.*, 2015).



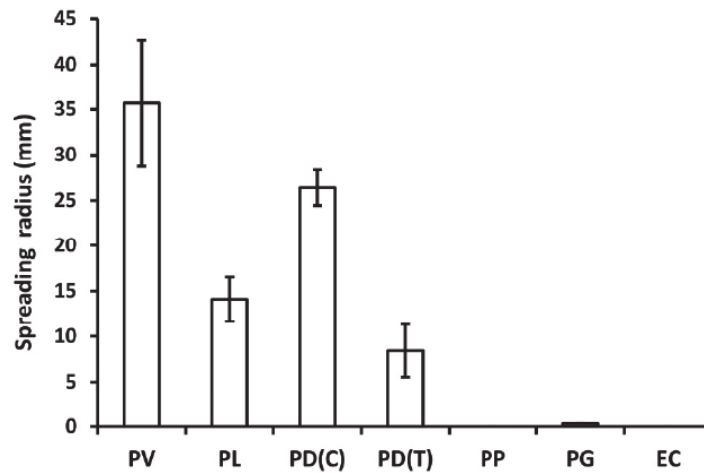
**Figura 3.5.** Anillos concéntricos del consorcio *E. coli* - *P. vortex* formados periódicamente después de 72h de incubación con 200 µg/ml de ampicilina. Plato teñido con azul de Coomassie (Finkelshtein *et al.*, 2015).

En las **primeras olas** de **expansión** del consorcio, mediadas por el fenotipo **explorador** de *P. vortex*, **no** se encuentran **cargos**; *E. coli* es transportada posteriormente por olas de **swarming** más grandes y lentas (Finkelshtein *et al.*, 2015). Esto significa que *P. vortex* primero tiene la oportunidad de **explorar** y **explotar** el nuevo territorio **sin cargos** potencialmente competitivos (Finkelshtein *et al.*, 2015).

Sin embargo, al encontrarse una **presión selectiva**, la primera ola no logra sobrevivir, y la **segunda ola**, arrastrando a *E. coli* en el camino, permite la supervivencia de *P. vortex* (Finkelshtein *et al.*, 2015). Por otro lado, cuando *E. coli* no es necesaria, no es arrastrada por *P. vortex* (Finkelshtein *et al.*, 2015). Este comportamiento le valió a la interacción el nombre de **mutualismo por conveniencia**, donde se considera que *P. vortex* explota al **cargo** sólo cuando lo necesita (Finkelshtein *et al.*, 2015).

En la misma investigación de Finkelshtein *et al.* (2015), se menciona vagamente el uso de ***P. dendritiformis*** y ***P. lautus*** como elementos **transportadores** del consorcio. Ambas especies demostraron su capacidad para acarrear a la *E. coli* resistente, sin embargo, el **acarreo** fue **limitado** y se vio opacado al compararlo con los resultados de *P. vortex* ([Figura 3.6](#)).

No se registró formación de **patrones** ni **anillos concéntricos** en los consorcios con ***P. dendritiformis*** y ***P. lautus***, y la información más relevante se centró en identificar al **morfotipo C** de ***P. dendritiformis*** como más efectivo que su contraparte T para acarrear **cargos** resistentes (Finkelshtein *et al.*, 2015).



**Figura 3.6.** Radio de expansión de los diferentes consorcios de *Paenibacillus* transportando una *E. coli* resistente a ampicilina. PV: *P. vortex*. PL: *P. lautus*. PD(C): *P. dendritiformis* quiral. PD(T): *P. dendritiformis* ramificada. PP: *P. polymyxa*. PG: *P. glucanolyticus*. EC: *E. coli* resistente a ampicilina en monocultivo (Finkelshtein *et al.*, 2015).

Considerando que ***P. dendritiformis*** y ***P. lautus*** son capaces de **acarrear cargos resistentes** cuando son expuestas a medios con **antibiótico**, y que no se ha profundizado en dicha interacción, en este proyecto se hará uso de ambas especies como **agentes transportadores** para estudiar el consorcio resistencia-movilidad en diferentes condiciones ambientales.

## 4. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias cuentan con diversas estrategias para obtener **resistencia** a los **antibióticos**, siendo una de ellas la **cooperación** entre especies. El uso de **consorcios bacterianos** que se pueden manipular experimentalmente es una opción viable para tratar de describir los **principios ecológicos** y **evolutivos** que dirigen la **cooperación**, **comportamiento** y **evolución** de la **resistencia** a **antibióticos** en comunidades naturales o clínicas que actualmente son difíciles de rastrear.

El consorcio bacteriano *Escherichia coli* - *Paenibacillus vortex* se presenta como un sistema resistencia-movilidad para estudiar los principios que rigen una interacción **mutualista** temporal que permite la **supervivencia** de una especie **susceptible** a **ampicilina** siempre y cuando esté creciendo en **cocultivo** con una especie **resistente**.

Debido a la **versatilidad** del género *Paenibacillus* en este proyecto se estudia el consorcio con dos distintas cepas transportadoras (*P. dendritiformis* y *P. lautus*) y una bacteria **cargo** que porta **resistencia** a **ampicilina** en un **plásmido multicopia**. Además, se incluye una tercera bacteria **fluorescente**, idéntica al **cargo** pero **susceptible** a **ampicilina** para evaluar la interacción entre especies cuando la **diversidad bacteriana** aumenta en su entorno. Para evaluar la dinámica, los consorcios se estudiarán a nivel macroscópico y microscópico en **distintas concentraciones de antibiótico**.

Añadir o quitar **cargos**, así como intercambiar a los **agentes transportadores** le da flexibilidad al sistema para evaluar la **dinámica** de las comunidades, acercándose a lo que potencialmente está sucediendo en **ambientes** con diferentes concentraciones de **antibióticos** y donde existe **diversidad** de especies **bacterianas**, como es el cuerpo humano o el suelo.

Por último, la postulación de un **modelo computacional** permite estudiar sistemas parecidos, abstraerlos y estudiarlos desde sus **características principales** y generar **hipótesis** que posteriormente pueden ser evaluadas con experimentos *in vitro*.

## 5. HIPÓTESIS

La **concentración** de **antibiótico** en el medio moldeará la **dinámica ecológica** y los **patrones** del consorcio *Escherichia coli - Paenibacillus sp.*

## 6. OBJETIVO

### 6.1. Objetivo general

Evaluar **computacional** y **experimentalmente** la **dinámica ecológica** de un consorcio bacteriano **resistencia-motilidad** (*E. coli - Paenibacillus sp.*) en ambientes con **estructura espacial**.

### 6.2. Objetivos específicos

- 6.2.1. **Describir** al sistema experimental (cepas *E. coli* y *Paenibacillus*).
- 6.2.2. **Describir** las características y funcionamiento del dispositivo de captura de imágenes.
- 6.2.3. Evaluar la **distribución espacial** y **dinámica ecológica** de las cepas en **monocultivo** en diferentes concentraciones de **antibiótico**.
- 6.2.4. Evaluar los **patrones** resultantes y la **dinámica ecológica** de los diferentes **consorcios** en medios con distintas concentraciones de **antibiótico**.
- 6.2.5. Evaluar las **diferencias** entre los **patrones macroscópicos** e **interacciones microscópicas** de los consorcios y monocultivos en cada concentración.
- 6.2.6. Postular un **modelo computacional** del consorcio bacteriano.



## 7. ENFOQUE METODOLÓGICO

Para poder cumplir con el **objetivo** de evaluar experimental y **computacionalmente** la **dinámica ecológica** del consorcio *E. coli* - *Paenibacillus sp.*, el proyecto requiere una **metodología** distinta tanto para la parte *in vitro* como para la parte *in silico*. En este apartado se describe la teoría correspondiente a la parte **computacional** del proyecto, que en última instancia permite determinar la **metodología**.

### 7.1. Modelos computacionales

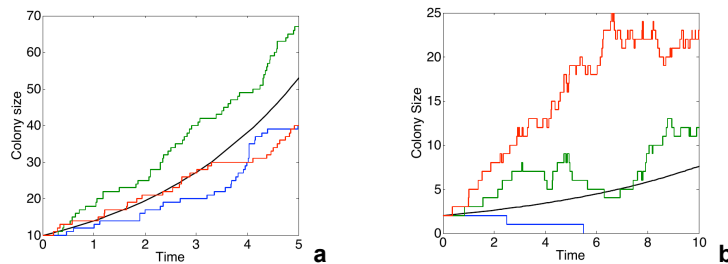
Un **modelo computacional** es una **abstracción** que **representa** un **sistema real** mediante el uso de la **computación** para explorar distintas hipótesis, suposiciones y parámetros mediante **simulaciones** (Baggio, 2017; NIH, 2020; Railsback y Grimm, 2005, 2019). Los modelos se realizan generalmente para saber **cómo funciona** un sistema, para **explicar** los **patrones** observados y para **predecir** el **comportamiento** de un sistema frente a un cambio (Railsback y Grimm, 2019).

Una de las ventajas de realizar un modelo computacional es la posibilidad de hacer miles de **repeticiones** sin necesitar más que una computadora (NIH, 2020; Railsback y Grimm, 2019). En este caso, aumentar el número de **repeticiones** es el medio más sencillo para incrementar la **precisión** con la que se estiman los **promedios**, lo que permite entender el **comportamiento promedio** del **sistema** (Romaina, 2012).

Cada **ecuación**, **parámetro**, **regla**, inclusión o exclusión de **variables** del modelo deben estar basados en **literatura** ya publicada, **datos empíricos** o **hipótesis** específicas (Baggio, 2017). El considerar conjuntamente estas características permite **diseñar** correctamente las respectivas **suposiciones** y **algoritmos** del sistema a simular (Railsback y Grimm, 2019).

Los **modelos** pueden ser **deterministas** o **estocásticos** dependiendo de cómo simulan la dinámica de un sistema. Un modelo es **determinista** cuando su futuro está completamente determinado por sus **condiciones iniciales** y se pueden resolver con **ecuaciones** diferenciales (Anderson, 2011). Por otro lado, un **modelo estocástico** es un proceso **azaroso** que **evoluciona** en el **tiempo** y cuyo resultado final no se puede determinar sólo conociendo los parámetros iniciales (Anderson, 2011). El tipo de **modelo** y las **reglas** impuestas determinan hasta qué grado los resultados son influenciados por el **azar**.

El **crecimiento bacteriano** se puede modelar de ambas formas; por medio de ecuaciones o por medio de reglas probabilísticas (Anderson, 2011). En este caso, el enfoque **determinista** genera un solo resultado, mientras que el modelo **estocástico** genera varios, los cuales parecen **seguir la tendencia** del resultado determinista de una forma 'ruidosa' (Figura 7.1-a).



**Figura 7.1.** a: Crecimiento bacteriano. b: Crecimiento bacteriano con parámetro de muerte. Negro: solución del sistema determinista. Verde, rojo y azul: soluciones del sistema estocástico (Anderson, 2011).

Una de las **ventajas** de los **modelos estocásticos**, es que sus resultados surgen como consecuencia de los **algoritmos, reglas y límites** impuestos al sistema, lo que permite encontrar procesos que no suceden en los modelos deterministas (Anderson, 2011). Si al modelo anterior se le añade un parámetro de **mortalidad**, el resultado determinista difiere significativamente de los resultados estocásticos, presentando incluso un resultado donde **desaparece** completamente la población bacteriana (Figura 7.1-b) (Anderson, 2011).

Debido a que en este proyecto el interés radica en la **formación** de **patrones** por medio de las **interacciones** entre bacterias y considerando que, empíricamente, una colonia bacteriana nunca crece de la misma forma, el modelo a realizar será **estocástico**.

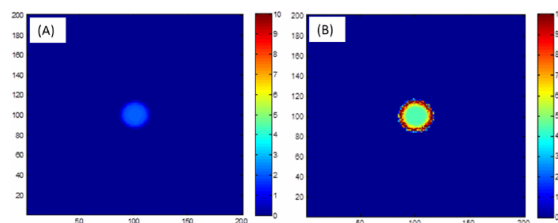
## 7.2. Primer modelo computacional del consorcio *Escherichia coli* - *Paenibacillus vortex*

En el 2017 se realizó el primer **modelo computacional** del **consorcio *E. coli* - *P. vortex***, donde se muestran algunas de las posibles estrategias de cooperación entre ambas especies para sobrevivir a condiciones hostiles (Book *et al.*, 2017).

El modelo permite describir el **crecimiento** bacteriano, su **densidad, movilidad**, tasa de **reproducción** y tasa de **mortalidad** (Book *et al.*, 2017). La densidad de **nutrientes** y

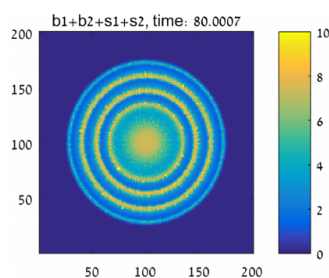
concentración del **antibiótico** se simularon considerando la **difusión, consumo** y respectiva **inactivación** por parte de las bacterias (Book *et al.*, 2017). Además, el modelo consideró que *P. vortex* presenta **dos fenotipos** (constructor y explorador) y para las simulaciones en consorcio se consideró un **inóculo homogéneo** y en **proporciones iguales** (1:1).

Las **primeras simulaciones** en **monocultivo** demostraron que ninguna de las dos especies puede crecer por separado en un medio con antibiótico; *P. vortex* por ser **susceptible** y *E. coli* por ser **incapaz de moverse** (Book *et al.*, 2017). En estas simulaciones *P. vortex* presenta una **disminución de la densidad celular** conforme se acerca al **borde**, mientras que *E. coli* **aumenta su densidad** al acercarse al **borde** (Figura 7.2) (Book *et al.*, 2017).



**Figura 7.2.** Simulaciones por especie (tiempo de crecimiento equivalente a 50 horas). (A) *P. vortex* muere como consecuencia de los antibióticos y la colonia no se expande. (B) *E. coli* no es capaz de expandirse pero sobrevive. (Book *et al.*, 2017).

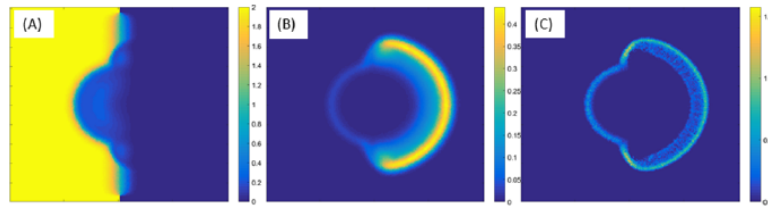
Para las **simulaciones** en **cocultivo** se registró crecimiento de **ambas** especies y un **patrón de anillos concéntricos** que representan **fluctuaciones** en la **densidad celular**, que a la vez coincide con la alternancia entre el fenotipo explorador y constructor (Figura 7.3) (Book *et al.*, 2017).



**Figura 7.3.** Simulación del consorcio *E. coli* - *P. vortex* en un ambiente con antibiótico. Se desarrollan anillos concéntricos (Book *et al.*, 2017).

Además, se realizó una simulación incluyendo un **gradiente brusco de antibiótico** donde sólo la mitad del espacio lo contenía. Aunque en la simulación anterior (Figura 7.3) se determinó que el consorcio es capaz de crecer en medios con antibiótico, al incluir un

**gradiente**, el **crecimiento** se registró solamente hacia la zona **sin antibiótico** (Figura 7.4) (Book *et al.*, 2017). Es importante mencionar que el modelo no incluyó en sus reglas la habilidad de *P. vortex* para depositar o trasladar *cargos* (Book *et al.*, 2017).



**Figura 7.4.** (A) El gradiente brusco de antibiótico (amarillo: con antibiótico; azul: sin antibiótico). (B) Crecimiento de *P. vortex*. (C) Crecimiento de *E. coli* después de 13 horas (Book *et al.*, 2017).

### 7.3. Enfoque de modelación del proyecto: *Modelo de Agentes Individuales*

Como se comentó anteriormente, el modelo a realizar deberá ser **estocástico**, y para desarrollarlo se hará uso de un enfoque de modelación conocido como **modelación de agentes individuales**.

Los **modelos de agentes individuales** (IBM sus siglas en inglés), son un tipo de modelo computacional que permiten **modelar** un **sistema** como una **colección** de **elementos autónomos**, llamados **agentes**, y las **interacciones** entre ellos (Bonabeau, 2002; DeAngelis *et al.*, 2014). Los IBM son un **subconjunto** de los llamados **Sistemas Complejos Adaptativos** (CAS), que engloban a **sistemas sociales** y **ecológicos**, conocidos por desarrollar fenómenos **difícilmente predecibles**, **complejos**, de comportamiento **no lineal** y en donde los resultados son más complejos que la suma de sus partes (Baggio, 2017).

Un **sistema** idealmente moldeable mediante un IBM debe tener un **comportamiento no lineal** en sus agentes individuales, **variaciones** a lo largo de la vida de los agentes, agentes con capacidad de **memoria**, **aprendizaje** o **adaptación**, y finalmente, interacciones **heterogéneas** (con el entorno y entre agentes) (Bonabeau, 2002; DeAngelis *et al.*, 2014; Railsback y Grimm, 2005).

Los IBM son modelos **iterativos**, es decir, cada agente recibe **información** del ambiente, la **procesa** y **reacciona** ante ella dependiendo de las **reglas** establecidas, repitiendo el ciclo

hasta llegar al límite impuesto o hasta llegar a un estado deseado (Baggio, 2017). La **dinámica** del sistema es creada gracias a las iteraciones, ya que permiten actuar con base en el **estado** actual del sistema y desencadenar diferentes **respuestas** (DeAngelis y Mooij, 2005).

Debido a que los IBM son el **acercamiento canónico** para modelar **fenómenos emergentes**, se comenzaron a utilizar para estudiar sistemas **biológicos** y así desarrollar teorías sobre el **comportamiento adaptativo** de los seres vivos en un contexto definido por su **ambiente** y **población**; una rama conocida como **Ecología de Agentes Individuales** (Bonabeau, 2002; Railsback y Grimm, 2005).

Este enfoque, al incluir tantos **parámetros** como se desee (variación intra e interespecífica, interacciones, comportamiento adaptativo), permite entender a los sistemas biológicos **sin simplificarlos** excesivamente (DeAngelis *et al.*, 2014; Railsback y Grimm, 2005). Las diferentes **especies** son representadas por medio de **parámetros distintos** utilizando el mismo **modelo** y permitiendo su **trazabilidad** (Baggio, 2017; DeAngelis *et al.*, 2014). Esta es una **ventaja** ante los enfoques de modelación **analíticos**, en los que la complejidad aumenta al grado de perder la trazabilidad de sus componentes (Baggio, 2017).

Para el **IBM** de este proyecto se deben considerar tres **características fundamentales** del consorcio al momento de realizar la abstracción del sistema y escritura del código:

- **Movimiento** de los dos tipos bacterianos a través del espacio.
- **Formación** de **patrones colectivos** como consecuencia de las características individuales.
- **Dinámica poblacional** (arrastre) y **explotación** entre especies (eliminación del antibiótico del medio).



Además, es importante considerar que el **IBM** debe ser **espacialmente explícito**, es decir, que dentro de los resultados se obtengan **imágenes** de lo que sucede. Los IBM espacialmente explícitos permiten observar cómo a partir del **movimiento individual** de los **agentes** se generan **patrones colectivos** (DeAngelis y Mooij, 2005).

Por lo tanto, el **modelo** a realizar será un **modelo de agentes individuales espacialmente explícito**; un acercamiento adecuado para modelar la dinámica emergente del consorcio bacteriano *Escherichia coli* - *Paenibacillus sp.* al crecer en medios con antibiótico.

## 8. METODOLOGÍA Y MATERIALES



### 8.1. Descripción biológica del sistema experimental

8.1.1. Se realizó una tabla con las características de las cepas utilizadas para los experimentos ([Tabla 1](#) y [Tabla 2](#)) y una cinética de crecimiento para cada cepa (ver [Resultados](#))..

Tabla 1. Características de las cepas <i>E. coli</i> utilizadas		
Especie	<i>Escherichia coli</i> (R) 	<i>Escherichia coli</i> (S) 
Clasificación taxonómica	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; <i>Escherichia</i> ; <i>E. coli</i> .	
Cepa	MG1655/pBGT-1	MG1655 mCherry
Tinción de Gram	Gram negativa	
Tamaño (longitud)	1-2 $\mu\text{m}$	
Temperatura óptima de crecimiento	37°C	
Resistente a ampicilina	Resistente hasta 8192 mg/l	No resistente
Plásmido	pBGT-1	Sin plásmido
Característica otorgada por el plásmido	Producción de betalactamasa TEM-1, fluorescencia	-
Número de copias del plásmido (tamaño)	~19 kb (pequeño)	-
Plásmido conjugativo	No	-
Fluorescencia	Verde	Roja <sup>1</sup> (mCherry en cromosoma)
Papel en el consorcio	<i>Cargo</i>	Desconocido

. R: resistente. S: susceptible. Datos recopilados de: San Millan *et al.*, 2016.

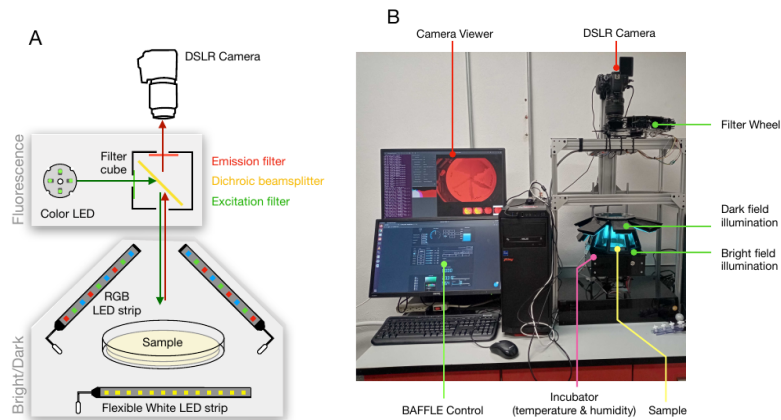
<sup>1</sup> Se ilustra con color magenta en este documento.

Tabla 2. Características de las cepas <i>Paenibacillus</i> utilizadas		
<b>Especie</b>	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> 	<i>Paenibacillus lautus</i> 
<b>Clasificación taxonómica</b>	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; <i>Paenibacillus</i> ; <i>P. dendritiformis</i> .	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; <i>Paenibacillus</i> ; <i>P. lautus</i>
<b>Cepa</b>	30A1	WT
<b>Tinción de Gram</b>	Gram positiva	
<b>Tamaño (longitud)</b>	4 a 17µm	2.25 a 4.5µm
<b>Temperatura óptima de crecimiento</b>	37°C	30°C - 37°C
<b>Fluorescencia</b>	Sin fluorescencia	
<b>Papel en el consorcio</b>	Transportador	
<b>Resistente a ampicilina</b>	No resistente	No resistente
Datos recopilados de: Batchelor, 1919; CLSI, 2015-a; CLSI, 2015-b; Ingham y Ben-Jacob, 2008; NCBI-TB, 2020; SSP y NRC; 1999; Zeigler, 2013.		

## 8.2. Descripción de las características y funcionamiento del dispositivo de captura de imágenes

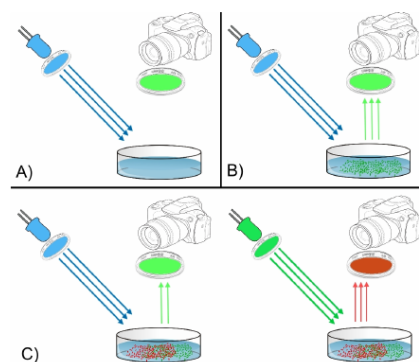
El **dispositivo de captura de imágenes**, nombrado **BAFFLE** (Bionic Apparatus for Fluorescent Light Estimation) (Tardío Pi, C. *et al.*, 2022), es un aparato creado en el Laboratorio de Biología Sintética y de Sistemas que contiene una **incubadora** individual para caja de Petri (100x15mm), un disco con distintos **filtros** de luz sobre la incubadora y una **cámara fotográfica** en la parte superior ([Figura 8.1](#)).

El **BAFFLE** permite tomar fotos en tiempo real o programar la **captura de imágenes** de la caja de Petri colocada en su interior cada cierto tiempo, para así obtener películas del crecimiento de las colonias (*timelapses*). La característica más importante del BAFFLE es la capacidad de **iluminar** una caja de Petri con cierta **longitud de onda** y al mismo tiempo utilizar un **filtro** adecuado para la captura de imágenes a color.



**Figura 8.1.** A: Diagrama esquemático del BAFFLE señalando los filtros de excitación y emisión, así como los campos claro y oscuro de la incubadora. B: Foto del BAFFLE donde se señalan sus partes (Tardío Pi, C. *et al.*, 2022).

El uso de distintas **longitudes de onda** irradiando a la caja Petri es útil cuando se tienen **proteínas fluorescentes** en las muestras, pues por un lado permite capturar imágenes del crecimiento de la colonia con fluorescencia, y por otro, permite diferenciar espacialmente a dos (o más) poblaciones bacterianas en un mismo cultivo ([Figura 8.2](#)).



**Figura 8.2.** Demostración del principio para la detección de bacterias marcadas con proteínas fluorescentes. A y B: la radiación de luz a una longitud de onda específica permite detectar el crecimiento de la bacteria que la produce. C: Esta metodología permite distinguir entre dos poblaciones bacterianas en un mismo cultivo.

Específicamente para la proteína **GFP** presente en la *E. coli* pBGT-1 utilizada en este estudio, se requiere una longitud de onda de **excitación** de **488 nm** para su emisión en **510 nm** (ThermoFisher, 2021). Por otro lado, **mCherry** requiere una longitud de onda de excitación de **587 nm** para emitir en **610 nm** (Shaner *et al.*, 2004).



Para la captura de imágenes con el BAFFLE se utilizaron los siguientes valores por parámetro:

Tabla 3. Parámetros para tomar fotos en el BAFFLE				
Luz	Canal	Apertura	Velocidad	ISO
Blanca	Campo claro	2.8	1/10	800
Azul	Fluorescencia verde	2.8	5	1600
Verde	Fluorescencia roja	3.2	3.2	1600

### 8.3. Evaluación de la distribución espacial y dinámica ecológica de las cepas en monocultivo en diferentes concentraciones de antibiótico

8.3.1. Se realizaron cajas LB agar con las concentraciones de ampicilina indicadas en la [Tabla 4](#) y se inoculó una gota de 10µl de *overnight* de cada cepa en el centro de las cajas. Se añadió 10% de arabinosa (stock 100,000 µg/ml) a todas las cajas para favorecer la fluorescencia de la proteína verde fluorescente como se indica en el apartado [2.2.1](#).

Tabla 4. Cajas a realizar para los experimentos en monocultivo						
Monocultivo	Concentraciones de ampicilina a realizar (µg/ml)					
<i>E. coli pBGT-1</i>	0	50	100	200	400	800
<i>E. coli cherry</i>	0	50	100	200	400	800
<i>P. dendritiformis</i>	0	50	100	200	400	800
<i>P. lautus</i>	0	50	100	200	400	800

8.3.2. Mediante la captura de imágenes con fluorescencia, se obtuvo la distribución espacial de las cepas cada 24h.

8.3.3. Se obtuvo el valor del área colonizada por cepa y el desplazamiento utilizando el programa ImageJ Fiji ([Anexo 24](#)).

8.3.4. Se observó al microscopio la morfología, fluorescencia y movilidad de cada cepa en monocultivo en las concentraciones de 0µg/ml, 200µg/ml y 800µg/ml de ampicilina. Los parámetros utilizados en

todas las imágenes y videos capturados por el microscopio se describen en la [Tabla 5](#). Las imágenes y videos obtenidos se editaron con el programa ImageJ como se menciona en el [Anexo 24](#).

Tabla 5. Parámetros para tomar fotos y videos en el microscopio Nikon Eclipse Ti-E			
Objetivo	Canal	Tiempo de exposición	Ganancia
100x	Campo claro (DIC)	100 ms	1.00
100x	Fluorescencia verde (GFPHQ)	200 ms	11.30
100x	Fluorescencia roja (Y-2E/C)	800 ms	46.00

## 8.4. Evaluación de los patrones resultantes y la dinámica ecológica de los diferentes consorcios en medios con distintas concentraciones de antibiótico

8.4.1. Se realizaron cajas LB agar con las concentraciones de ampicilina señaladas en la [Tabla 6](#) y se inoculó una gota de 10µl del respectivo consorcio<sup>2</sup>. Se añadió 10% de arabinosa (stock 100,000 µg/ml) a todas las cajas.

Tabla 6. Cajas a realizar para los experimentos en consorcio						
Consorcio	Concentraciones de ampicilina a realizar (µg/ml)					
<i>Paenibacillus sp.* : pBGT-1</i>	0	50	100	200	400	800
<i>Paenibacillus sp.*: cherry</i>	0	50	100	200	400	800
<i>Paenibacillus sp.* : pBGT-1 : cherry</i>	0	50	100	200	400	800

\*Por un lado se realizan los consorcios con *P. dendritiformis* y por otro los consorcios con *P. lautus*.

8.4.2. Mediante la captura de imágenes con fluorescencia, se obtuvo la distribución espacial de los consorcios cada 24h.

<sup>2</sup> Cada cepa creció en *overnights* separados. Los inóculos de consorcios se realizaron mezclando volúmenes iguales de cada *overnight* en un tubo eppendorf (800µl:800µl para consorcio de dos cepas, y 800µl:800µl:800µl para consorcio de tres cepas). De dichos tubos se tomaron 10µl y se colocaron en el centro de la caja como una gota.

- 8.4.3. Se obtuvo el valor del área colonizada por cepa en consorcio y el desplazamiento utilizando el programa ImageJ Fiji ([Anexo 24](#)).
- 8.4.4. Se observó al microscopio la generación de patrones de los distintos consorcios y el acarreo en las concentraciones de 0µg/ml, 200µg/ml y 800µg/ml de ampicilina. Las imágenes y videos obtenidos en el microscopio se editaron como se menciona en el [Anexo 24](#).

## 8.5. Evaluación de las diferencias entre los patrones macroscópicos e interacciones microscópicas de los consorcios y monocultivos en cada concentración

- 8.5.1. Se comparó el área de cada consorcio con los monocultivos de sus bacterias componentes.
- 8.5.2. Se comparó la ubicación final de los *cargos* en consorcio mediante las imágenes con fluorescencia con su ubicación final en monocultivos.

## 8.6. Postulación de un modelo computacional del consorcio bacteriano

Como se explica en el [apartado 7](#), el modelo postulado deberá ser un **modelo de agentes individuales**. De forma general, formular un **modelo** significa **abstraer** y **diseñar** el conjunto de **suposiciones** y **algoritmos** que representen al sistema de estudio (Railsback y Grimm, 2019).

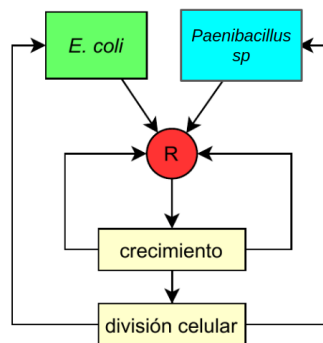
### 8.6.1. Definición del lenguaje de programación y *notebook*

El modelo se realizó en la plataforma **Google Colab** (*notebook*) utilizando el lenguaje de programación **Python**. Existen varias **ventajas** al utilizar este *notebook*, entre ellas que se guarda en línea y se puede editar por varias personas a la vez desde cualquier computadora. **Python** es un **lenguaje** de programación que puede ser usado con cualquier sistema operativo, además de ser **libre**, lo que le permite ser **utilizado** y **distribuido** por cualquier persona (Maruch y Maruch, 2006).

## 8.6.2. Abstracción del sistema

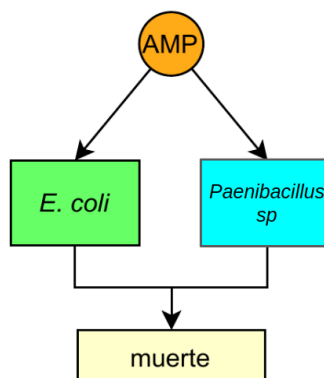
Antes de realizar el código y para entender perfectamente las **suposiciones** y **algoritmos** a modelar, se definieron las **interacciones** que cada especie lleva a cabo con su **entorno** por medio de la **abstracción** de los **procesos** ya reportados *in vitro*. El modelo realizado considera solamente **dos cepas** del consorcio (*cargo* resistente y transportador susceptible) y se basa en los datos reportados del consorcio *E. coli* - *P. vortex*.

Uno de estos procesos es el **uso** de los **recursos** del medio. Los **recursos (R)**, son utilizados por *E. coli* y *Paenibacillus sp.*, situación que les permite iniciar un proceso de **crecimiento**. El crecimiento les brinda dos opciones nuevas; seguir consumiendo recursos, o **dividirse** y generar una célula hija, lo que favorece que el ciclo se repita ([Figura 8.3](#)).



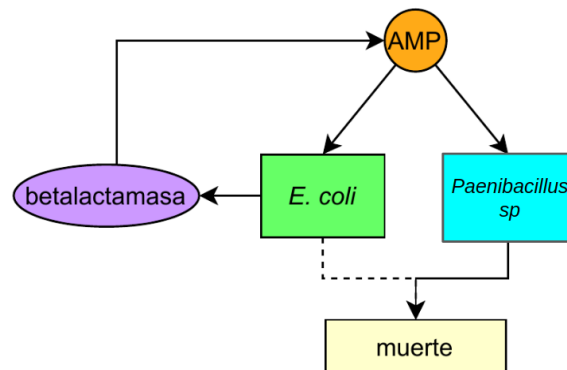
**Figura 8.3.** Diagrama de interacciones entre *E. coli*, *Paenibacillus sp.* y el recurso del medio (R).

Por otro lado, la presencia de **ampicilina** en el medio genera un **efecto contrario**. En estas condiciones, y sin considerar que *E. coli* presenta un mecanismo de resistencia, la ampicilina (**AMP**) actúa sobre ambas células, generando la **muerte** ([Figura 8.4](#)).



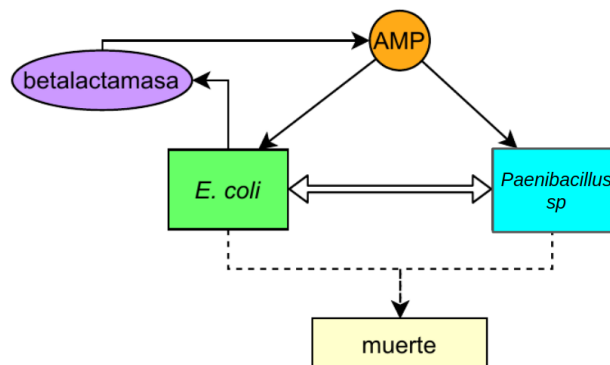
**Figura 8.4.** Diagrama de interacciones entre *E. coli*, *Paenibacillus sp.* y la ampicilina (AMP).

Sin embargo, en el diagrama se debe considerar que *E. coli* carga un **plásmido de resistencia**; *E. coli* produce la enzima **betalactamasa**, que actúa directamente sobre la ampicilina (**AMP**) del medio, modificando su camino hacia la **muerte**, que en la [Figura 8.4](#) se muestra como inevitable. En presencia de **betalactamasa** se sigue considerando una posible **mortalidad** en *E. coli*, sin embargo, se utiliza una **línea punteada** para explicar que este destino no es definitivo. La **tasa de mortalidad** de *E. coli* disminuye cuando es capaz de producir **betalactamasa** ([Figura 8.5](#)).



**Figura 8.5.** Diagrama de interacciones con producción de betalactamasa.

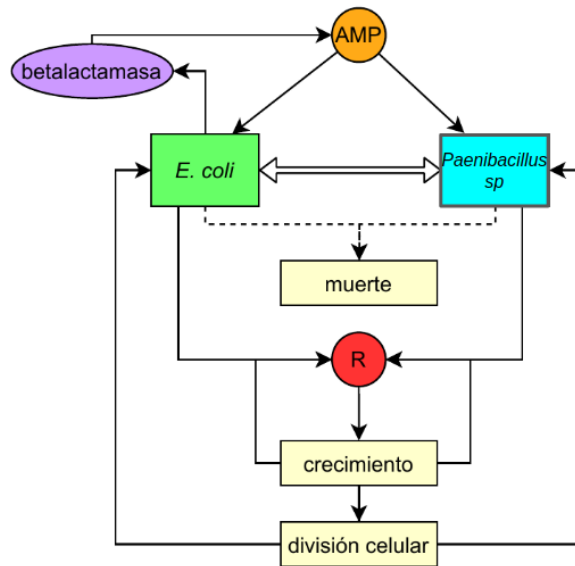
Una vez definidos los procesos en cada especie, se incluyeron las características de la **interacción** que emerge cuando *E. coli* y *Paenibacillus sp.* crecen en **cocultivo** y en presencia de ampicilina (**AMP**) ([Figura 8.6](#)).



**Figura 8.6.** Diagrama que incluye la interacción del consorcio *E. coli* - *Paenibacillus sp.*

La interacción en cocultivo (**consorcio**) se define por medio de una flecha bidireccional que representa dos procesos: el **acarreo** de *E. coli* por medio de *Paenibacillus sp.*, y la detoxificación del medio por *E. coli* ([Figura 8.6](#)). Cuando esta interacción sucede, el destino de muerte para *Paenibacillus sp.* deja de ser definitivo, razón por la cual se representa por medio de una **línea punteada** ([Figura 8.6](#)). *Paenibacillus sp.* disminuye su probabilidad de muerte en medios con ampicilina únicamente al crecer e interactuar con *E. coli*.

Por último, se fusionaron los diagramas anteriores para generar un único **diagrama de interacciones del sistema**, el cual permite entender e identificar las reglas e interacciones que deben formar parte del modelo computacional ([Figura 8.7](#)).



**Figura 8.7.** Diagrama general de interacciones del sistema.

### 8.6.3. Definición de la clase Bacteria y sus características

En nuestro **modelo de agentes individuales** cada célula bacteriana es un **agente**. Para esto se definió la clase '**Bacteria**', que permite la creación de **objetos** pertenecientes a dicha clase, la definición de sus **atributos** y las **funciones** que llevarán a cabo.

Dentro de la clase Bacteria, podemos identificar dos grandes **subgrupos** de agentes que representan el **tipo celular**, que en el caso de este estudio son dos: ***E. coli*** o ***Paenibacillus sp.*** A pesar de que comparten características por pertenecer a la clase Bacteria, cada tipo celular presenta algunas características propias. La [Tabla 7](#) muestra cuáles parámetros están presentes o ausentes en cada tipo celular y además cuáles se encuentran presentes en una magnitud relativamente mayor o menor a comparación del otro tipo celular, como la tasa de movilidad y la MIC.

Tabla 7. Parámetros de la Clase Bacteria		
Tipo celular	<i>E. coli</i>	<i>Paenibacillus sp.</i>
Tasa de conversión del recurso en ATP	✓	✓
Tasa de movilidad	✓ (menor)	✓ (mayor)
Mínima concentración inhibitoria (MIC)	✓ (mayor)	✓ (menor)
Tasa de producción de betalactamasa	✓	x
Cantidad de células iniciales	✓	✓

#### 8.6.4. Modelación del metabolismo individual y división celular

Con base en el [diagrama general de interacciones del sistema](#), y dada la complejidad de las redes metabólicas de los sistemas vivos, en el **modelo** se simplificaron las funciones metabólicas a dos: **consumo de nutrientes** y consecuente **crecimiento**.

Para el **crecimiento** bacteriano se consideró que  $R = (R_1, R_2, \dots, R_m(t))$  representa la **concentración** extracelular de  $m$  **sustancias abióticas** (ATP, antibióticos, entre otros), las cuales pueden cambiar en función de los procesos metabólicos de las células. Posteriormente se consideró a la **concentración extracelular** de la **sustancia** arbitraria  $i$  como  $R_i(t)$  y se definió la **tasa de absorción** de la sustancia  $i$  por la célula con la siguiente función:

$$u_i := u_i(r_i(t)) = \frac{\mu_i \cdot r_i}{r_i + K_i}$$

Donde  $\mu_i$  es la **tasa máxima** de **ingreso** del sustrato  $i$  a la bacteria y  $K_i$  la correspondiente **constante de saturación**. Es decir, hasta este punto se está considerando que existe una **concentración exterior** de sustancias abióticas, que es posible **absorber** dichas sustancias y que las células pueden alcanzar una **saturación**.

Si las sustancias abióticas están siendo absorbidas por las células, se consideró un **cambio** en la **concentración extracelular** del sustrato  $i$ , representado como:

$$R_i(t + 1) = R_i(t) - u_i^k(r_i(t)).$$

Por otro lado, al interior de la célula, si las **sustancias consumidas** contribuyen **energéticamente** (convirtiéndose en **ATP**), es posible modelar dicha contribución energética en una unidad de tiempo como:

$$ATP(t + 1) = ATP(t) + \sum_{i=1}^m c_i \cdot u_i(R_i(t))$$

Donde **ATP** es la cantidad total de energía que posee la célula, **c<sub>i</sub>** es la constante que representa la **tasa de conversión** del recurso **i** en **ATP**. Las células son capaces de acumular ATP hasta un límite impuesto, denominado **ATP<sub>max</sub>**. Al alcanzar dicho límite, se indicó a las células iniciar el proceso de **división celular**, donde se genera un nuevo objeto y la cantidad de ATP se reparte a mitades.

Finalmente, se incluyó un último proceso metabólico; la **muerte celular**. A diferencia del proceso metabólico anterior, la **muerte** se definió como un **evento probabilístico** influenciado por la presencia de **antibiótico** en el medio. En este caso, si el entorno está libre de antibiótico, la probabilidad de muerte es 0, pero en cambio, si hay **antibiótico** en el medio, la **probabilidad de muerte** cambia a **0.5** ([Tabla 8](#)).

Tabla 8. Funciones del metabolismo celular	
<b>Crecimiento</b>	Mediante el consumo de sustratos extracelulares (R) permite que la célula genere y acumule ATP. Exhorta a la célula a seguir consumiendo sustratos extracelulares hasta que alcanza el valor máximo de ATP intracelular. Una vez alcanzado este valor, se indica al objeto seguir la función de división celular.
<b>División</b>	Genera un nuevo objeto idéntico al tipo celular que alcanzó el valor máximo de ATP intracelular (división celular). La cantidad de ATP del objeto viejo se reparte por igual entre el objeto nuevo y el viejo.
<b>Muerte</b>	En presencia de antibiótico (AMP), la probabilidad de muerte para cualquier tipo celular se vuelve 0.5.

A pesar de que en el **diagrama** de la [Figura 8.4](#) se indica un camino inevitable a la **muerte** en presencia de **ampicilina**, el establecer la **probabilidad** de muerte como **0.5** es una aproximación mucho más **realista** del comportamiento bacteriano. Además, es importante considerar que los **diagramas** del [punto 8.6.2](#) son una **abstracción** muy **general** del sistema en donde este tipo de detalles no se consideran intencionalmente.

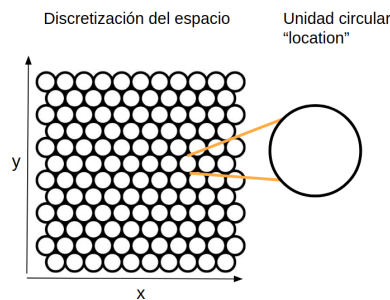


Por lo tanto, incluyendo detalles del **metabolismo celular**, las líneas continuas que dirigen al proceso de muerte en los diagramas del [punto 8.6.2](#), representan una **probabilidad de 0.5**, y las líneas punteadas representan una **disminución** en la probabilidad de 0.5. La modificación posterior de este parámetro es posible gracias a la adición de una **tasa de unión** entre la **betalactamasa** (producida por *E. coli*) y el antibiótico (**AMP**), que se encargará de la **inactivación** de este último.

### 8.6.5. Modelación del componente espacial

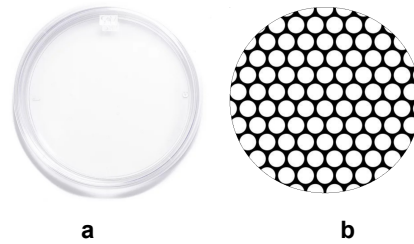
El interés del **modelo** fue **replicar** lo que sucede en experimentos *in vitro*, por lo que la modelación del **espacio** se pensó para replicar lo que se observaría en una **caja de Petri**. Para alcanzar esta meta, se consideró que el **espacio** es **bidimensional, homogéneo** y que está **discretizado** en **unidades** espaciales con **coordenadas  $x,y$** .

La **discretización** del espacio permitirá obtener **datos** de lo que sucede en cualquier momento de la simulación en un **espacio determinado**. Para esto fue necesario crear una nueva clase (**Clase Locations**), que al igual que la clase Bacteria, permitió la generación de sus respectivas unidades; cada **unidad espacial** se denomina **location** ([Figura 8.8](#)).



**Figura 8.8.** El espacio de la simulación está discretizado en unidades circulares con coordenadas específicas.

Los resultados **gráficos** de una **simulación** computacional se pueden **interpretar** de distintas formas dependiendo del **enfoque** del estudio. En este caso, los resultados gráficos que incluyan dicha **red de círculos**, representan lo que sucede en la **superficie** de una **caja de Petri** desde su vista **superior** ([Figura 8.9](#)).



**Figura 8.9.** La discretización del espacio en la simulación (b) corresponde a la vista superior de una caja de Petri (a).

Cada **location** es capaz de contener varios **parámetros**, como la cantidad de **células** que se encuentran en su área, la concentración del **recurso**, la concentración de **antibiótico** y la concentración de **betalactamasa** en su área. El cambio en cualquiera de estos **parámetros** se reflejó **visualmente** en cada **location** mediante el uso de una escala de colores (**colormaps**) que corresponden a un valor numérico.

Se utilizaron los **colormaps secuenciales**, que de forma general permiten asignar un solo color por parámetro que va **disminuyendo** en **intensidad** hacia un **extremo** y **aumentando** hacia el otro. La ventaja de los **colormaps secuenciales** es que permiten **identificar** un valor **máximo** y un valor **mínimo** mediante la saturación del color.

Dado que se estarán visualizando distintos **parámetros** de un solo **espacio** ([Tabla 9](#)), asignar un **color** que varía solamente en **saturación** para cada **parámetro**, permitió **diferenciar** los parámetros en **tiempo** y **espacio** sin generar **confusión** o **superposición** de colores (Hunter *et al.*, 2021).

El modelo permitió definir la **concentración inicial** del **recurso (R)**, **antibiótico (A)** y **betalactamasa (L)**, cuyo valor se repartirá **homogéneamente** en el **espacio**; es decir, todas las **locations** comenzaron con la **misma concentración** de las sustancias abióticas R, A y L.

Tabla 9. Parámetros de la Clase Locations	
	Cantidad de coordenadas 'x'
	Cantidad de coordenadas 'y'
Recurso (R)	Concentración inicial
	<i>Colormap</i>
	Tasa de difusión
Antibiótico (A)	Concentración inicial
	<i>Colormap</i>
	Tasa de difusión
Betalactamasa (L)	Concentración inicial
	<i>Colormap</i>
	Tasa de difusión

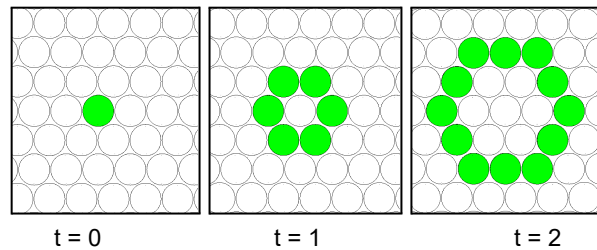
#### 8.6.6. Modelación de la dinámica poblacional de una metacomunidad

Hasta el momento se han definido las **generalidades** para la **simulación**: las **características** de cada **tipo celular**, sus características **metabólicas**, la presencia de **sustancias extracelulares** y la construcción del **espacio**. La siguiente tarea es **juntar** todos estos parámetros mediante un conjunto nuevo de **reglas** para generar la **dinámica** del sistema que es de interés para el proyecto: las **interacciones** entre especies y la **movilidad**.

Considerando que los **patrones** del consorcio *E. coli* - *P. vortex* son un **fenómeno emergente**, únicamente se determinaron las **reglas básicas** de **interacción** y **movilidad** a través del espacio con la intención de que, **consecuentemente**, suceda la formación de patrones.

En los **parámetros** de la [Tabla 7](#) se definió una **tasa** de **movilidad** relativa entre tipos celulares, sin embargo, esto no es suficiente para observar la **movilidad** en el espacio de la simulación. Para permitir el **movimiento explícito** de cada célula en la simulación, se indicó al modelo **cómo** se debe mover cada célula.

Para cada **célula** ubicada en una **location** específica, se permitió el **movimiento** a cualquiera de las **locations vecinas**, determinado por la **magnitud** del parámetro de **difusión y movilidad** (Figura 8.10).



**Figura 8.10.** Representación gráfica del movimiento permitido para los agentes individuales en diferentes tiempos (t=0, t=1 y t=2).

La definición del **movimiento** de esta forma es particularmente importante para **replicar** el **crecimiento** que se observa *in vitro*, donde hay una **expansión radial** desde el sitio de inoculación inicial.

El **evento** de **movimiento** bacteriano de una **location** a otra se expresó **visualmente** gracias al cambio de **color** en cada unidad espacial. Debido a que cada **tipo celular** está representado con un **color diferente** (*colormap*), cada **location** cambió su color dependiendo del tipo celular que migró a su área. Además, a mayor **densidad celular**, mayor **intensidad** del color, y viceversa.

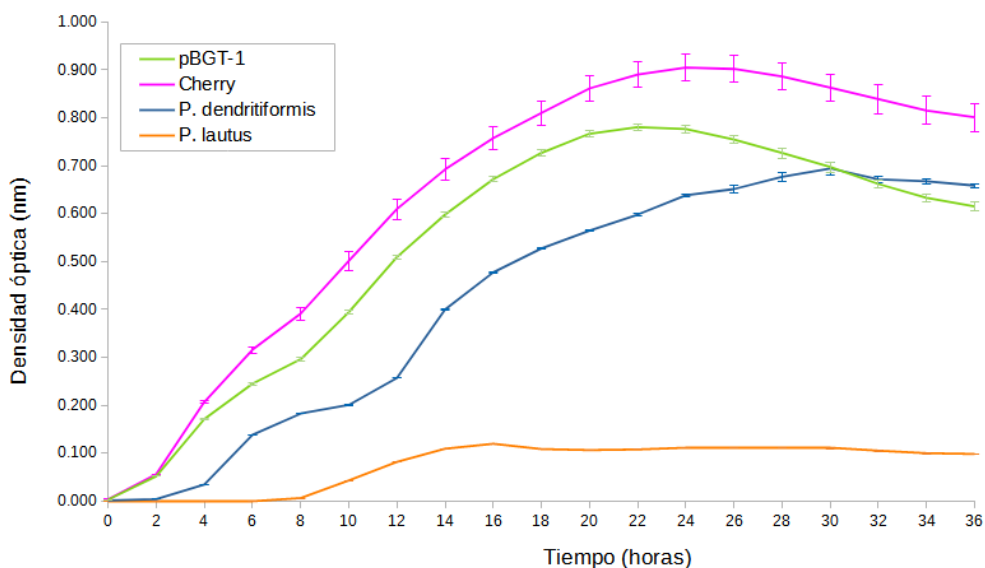
## 9. RESULTADOS

### 9.1. Caracterización del sistema experimental

#### 9.1.1. Cinéticas de crecimiento

Se realizó una **cinética de crecimiento** en una microplaca de 96 pozos con 200µl de medio LB líquido sin ampicilina por pozo. Cada pozo fue inoculado utilizando un replicador de 96 puntas a partir de otra microplaca con 200µl de *overnight* por pozo<sup>3</sup> de las respectivas cepas. Se utilizó el lector de placas BioTek ELx808IU a una temperatura de 37°C. Las lecturas se realizaron cada 15 minutos a 630 nm con 15 segundos de agitación previa a la lectura por un periodo de 36 horas.

Cada cepa tiene una **cinética de crecimiento** distinta, pues existen diferencias significativas entre todas ellas. La cepa con el mejor crecimiento es *E. coli cherry*, seguida por *E. coli pBGT-1*, presentando su fase exponencial a las 2 horas y la fase estacionaria a las 24 horas (Figura 9.1).



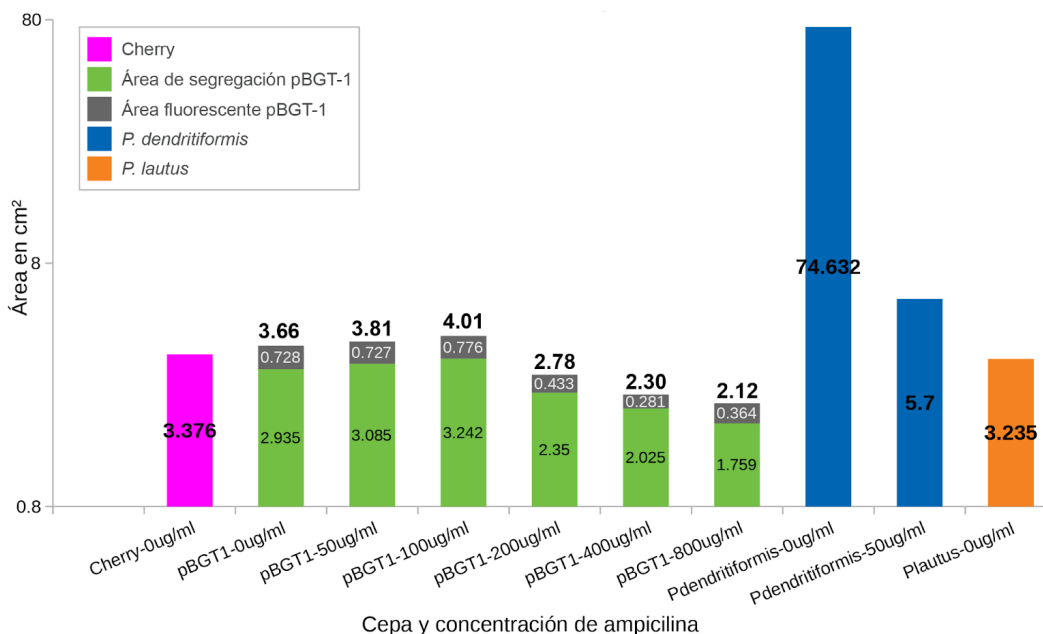
**Figura 9.1.** Cinética de crecimiento de *E. coli* pBGT-1 (verde), *E. coli* cherry (magenta), *P. dendritiformis* (azul) y *P. lautus* (naranja).

<sup>3</sup> Filas A-B para *E. coli* pBGT-1. Filas C-D para *E. coli* cherry. Filas E-F para *P. dendritiformis*. Filas G-H para *P. lautus*. Como control sin inóculo se tomó la columna 1.

Ambas cepas del género *Paenibacillus* muestran valores menores, siendo *P. lautus* la del menor crecimiento. La **densidad óptica** de *P. lautus* incluso en su fase exponencial es notablemente menor a la de las demás cepas y su fase **estacionaria** se alcanza a las 18 horas. Para *P. dendritiformis* la fase estacionaria se alcanza aproximadamente a las 30 horas.

## 9.2. Distribución espacial y dinámica en monocultivos

*E.coli* pBGT-1 logra crecer en todas las concentraciones de antibiótico con una **morfología irregular** de márgenes **lobulados**. Presenta un **área** de crecimiento ligeramente mayor en las concentraciones 0µg/ml, 50µg/ml y 100µg/ml y a la vez, se observa **segregación** del plásmido pues existen áreas sin fluorescencia (Figura 9.2). Desde los 200µg/ml, 400µg/ml y 800µg/ml de ampicilina el **área** de **segregación** se reduce a aproximadamente la mitad (comparada con el área de segregación de las concentraciones previas) y el tamaño de las colonias es menor (Figura 9.2). El registro fotográfico diario se encuentra en el Anexo 1 y las mediciones en el Anexo 2.

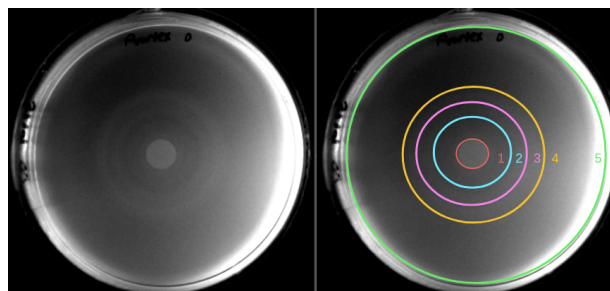


**Figura 9.2.** Área de crecimiento de las cepas en monocultivo a las 96h de incubación en diferentes concentraciones de ampicilina. Se señala a cada cepa con un color distinto y las áreas de segregación de *E. coli* pBGT-1 en gris. La cepa que alcanza la mayor área de colonización es *P. dendritiformis*. *E. coli* pBGT-1 logra crecer en todas las concentraciones de ampicilina.

**E. coli cherry**, susceptible a ampicilina, logra colonizar solamente el plato sin ampicilina con una morfología **circular** de margen **lobulado**. A partir de la concentración mínima de 50µg/ml no se observa crecimiento. El área alcanzada en 96h es parecida a la de pBGT-1 ([Figura 9.2](#)). El registro fotográfico diario se encuentra en el [Anexo 3](#) y las mediciones en el [Anexo 4](#).

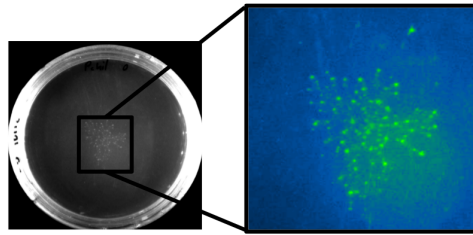
**P. dendritiformis**, susceptible a ampicilina, logra colonizar el plato en las concentraciones de 0µg/ml y 50µg/ml con una morfología **circular** de margen **ondulado** y con **anillos concéntricos**. En **0µg/ml** coloniza todo el plato a las **72h**, mientras que en el medio con 50µg/ml el crecimiento es notablemente menor ([Figura 9.2](#)). A partir de 100µg/ml la bacteria es inhibida completamente. El crecimiento de *P. dendritiformis* en 50µg/ml de ampicilina no se debe a contaminación con la cepa resistente pues no presenta fluorescencia verde ([Anexo 9](#)).

Se logró identificar la formación de cinco **anillos concéntricos** por parte de **P. dendritiformis** en medio sin ampicilina ([Figura 9.3](#)). El registro fotográfico diario se encuentra en el [Anexo 5](#) y las mediciones en el [Anexo 6](#).



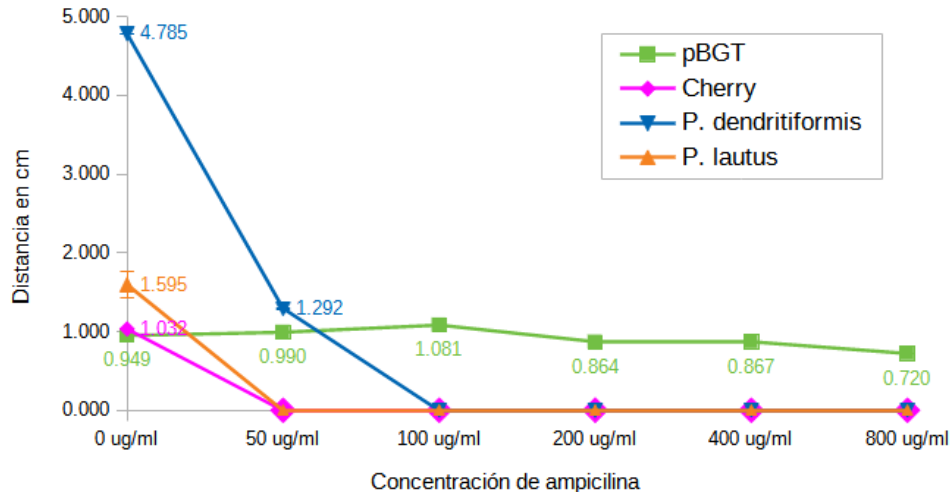
**Figura 9.3.** Anillos concéntricos de *P. dendritiformis* a las 96h de incubación en medio sin ampicilina. El anillo 1 corresponde al punto de inoculación.

**P. lautus** es capaz de crecer en el plato sin ampicilina con una morfología **rizoide** presentando **colonias dirigentes** en los extremos que asemejan el crecimiento descrito para *P. vortex* ([Figura 9.4](#)). En monocultivo, el área de crecimiento alcanzada es mucho menor a la de *P. dendritiformis* ([Figura 9.2](#)), sin embargo, es la segunda cepa con mayor **movilidad** desde el punto de inoculación ([Figura 9.5](#)). Muestra susceptibilidad desde los 50µg/ml de ampicilina. El registro fotográfico diario se encuentra en el [Anexo 7](#) y las mediciones en el [Anexo 8](#).



**Figura 9.4.** Ampliación del crecimiento rizoide de *P. lautus* en plato sin ampicilina. Imagen editada con ImageJ para su visualización.

Por otro lado, se realizaron las respectivas mediciones para definir la **dispersión** de cada cepa en monocultivo, entendida en este proyecto como la **capacidad** para **alejarse** del **punto de inoculación**. *P. dendritiformis* de nuevo lleva la delantera en cuanto a **movilidad**, seguida de *P. lautus*, que a pesar de tener una colonia con un área de colonización pequeña, su forma de crecimiento rizoide le permite alejarse suficientemente del punto de inoculación y ser catalogada como la segunda cepa con mayor movilidad del proyecto ([Figura 9.5](#)).

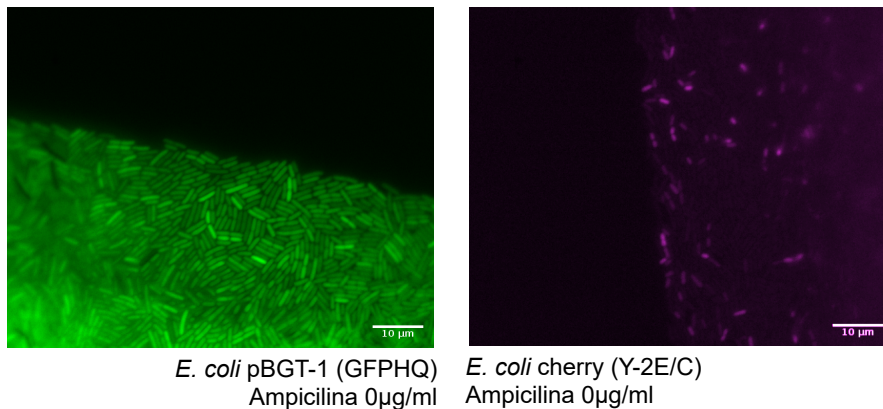


**Figura 9.5.** Distancia del punto de inoculación al borde de la colonia (dispersión) de las cepas en monocultivo a las 96h de incubación. No se detecta crecimiento de *E. coli* cherry ni de *P. lautus* a partir de los 50 $\mu$ g/ml de ampicilina, mientras que *P. dendritiformis* colapsa a los 100 $\mu$ g/ml de ampicilina. *E. coli* pBGT-1 logra expandirse en todas las concentraciones de ampicilina.

Para observar los patrones de crecimiento microscópico y evidenciar la diferencia de **tamaños** entre las cepas *Paenibacillus* y *E. coli* se tomó un pedazo de **agar** del extremo de las colonias en monocultivo y cuidadosamente se colocó sobre un cubreobjetos para su observación al microscopio. Se visualizó la **dinámica microscópica** en **100x** de los

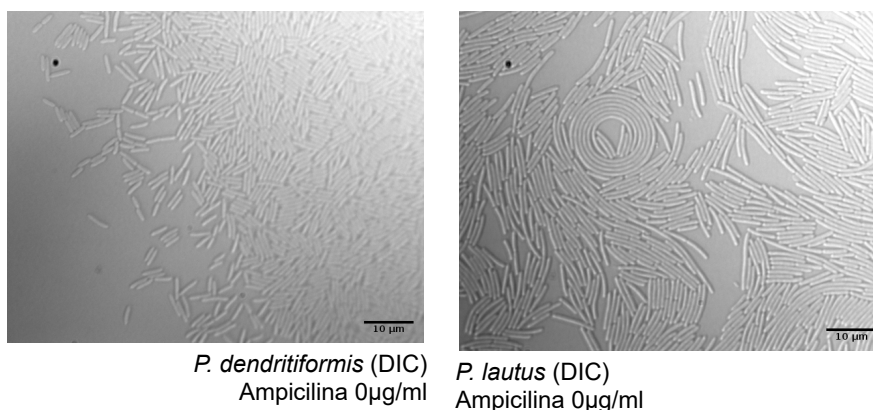


pedazos de agar utilizando el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E y los parámetros descritos en la [Tabla 5](#) ([Figura 9.6](#) y [Figura 9.7](#)).



**Figura 9.6.** Imágenes microscópicas en monocultivo (borde de la colonia) de las cepas *E. coli* (pBGT-1 y cherry) a una magnificación de 100x y con su respectivo canal de fluorescencia (GFPHQ y Y-2E/C).

En el crecimiento de ambas *E. coli* el frente de la colonia se encuentra **uniformemente tapizado** por células, con un borde bien delimitado y sin espacios huecos al interior. **No** se observa **movilidad** en tiempo real (imperceptible en el lapso de tiempo de la observación al microscopio). La intensidad de la **fluorescencia** tanto verde como roja es **variable**, encontrando células con mayor coloración que otras. La longitud promedio de las células para **pBGT-1** es de **3.1µm** y para **cherry** de **2.8µm** ([Figura 9.6](#)).



**Figura 9.7.** Imágenes microscópicas en monocultivo (borde de la colonia) de las cepas *Paenibacillus* a una magnificación de 100x en campo claro (DIC). Se observa difusión de las células en *P. dendritiformis* y formación de espirales con *P. lautus*.

Para las cepas *Paenibacillus* el crecimiento es significativamente diferente; ***P. dendritiformis*** muestra difusión de sus células en el borde de la colonia, que generalmente forman **enjambres** y en pocos casos se encuentran solas. Al interior sus células se encuentran distribuidas uniformemente. Se logró observar **movilidad** en tiempo real. Su longitud promedio es de **4.7µm** ([Figura 9.7](#)).

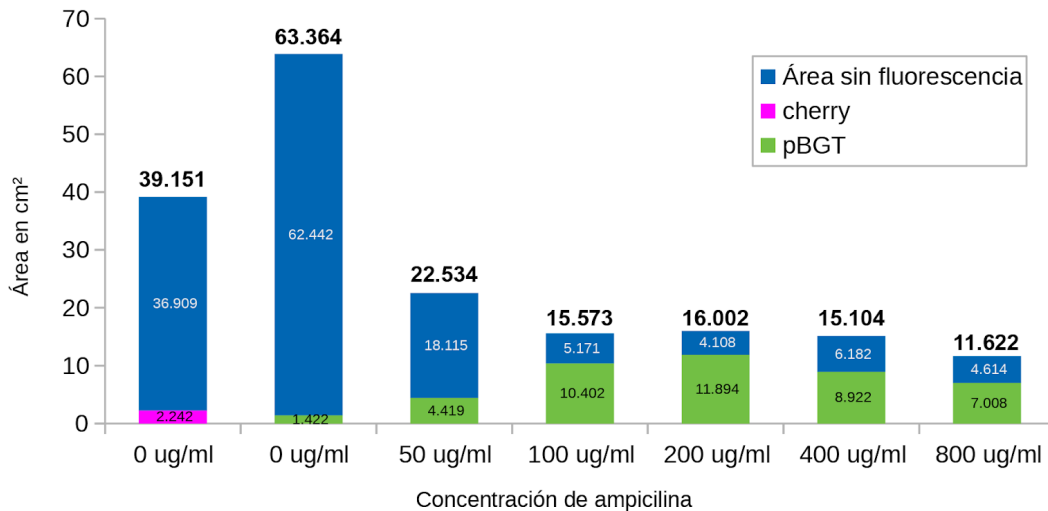
Para *P. lautus* se identificaron **espirales** con movilidad en tiempo real, formados por una o dos células **hiper filamentadas** cuyo movimiento giratorio modifica la dirección de las células vecinas. Se identificaron **enjambres** de células con una dirección de desplazamiento definida, chocando con otros enjambres y fusionándose. La longitud promedio de sus células es de **15µm**, aunque para las células hiper filamentadas se registró una longitud de hasta 60µm ([Figura 9.7](#)). Los videos de la dinámica microscópica de *P. dendritiformis* se encuentran en <https://youtu.be/t8aW30oBc2E> y los de *P. lautus* en <https://youtu.be/dRQB9qhqJHk> ([Anexo 22](#)).

### 9.3. Distribución espacial y dinámica ecológica en consorcios

#### 9.3.1. Consorcios de dos y tres elementos con *Paenibacillus dendritiformis*

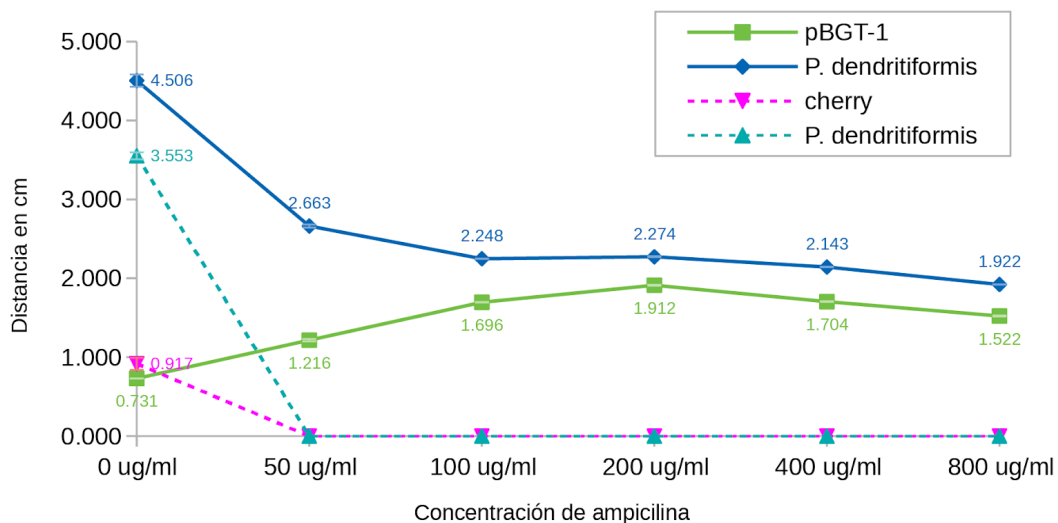
En los consorcios de dos elementos **sin** antibiótico (*P. dendritiformis:cherry* y *P. dendritiformis:pBGT-1*), las colonias se establecen con una **morfología** mayormente **circular**, presentando **lóbulos** al interior, a excepción de *P. dendritiformis:pBGT-1* (0µg/ml), donde la morfología es completamente **circular** y con **anillos concéntricos** sin fluorescencia ([Anexo 20](#)).

El consorcio *P. dendritiformis:cherry* no presenta crecimiento desde los **50µg/ml** de ampicilina. En el consorcio *P. dendritiformis:pBGT-1* el área de **pBGT-1** abarca más de la mitad de la colonia desde los 100µg/ml acompañado de una reducción del área total de la colonia ([Figura 9.8](#)). El registro fotográfico diario para *P. dendritiformis:pBGT-1* se encuentra en el [Anexo 10](#) y para *P. dendritiformis:cherry* en el [Anexo 11](#). Las mediciones se encuentran en el [Anexo 12](#) y la distribución espacial con fluorescencia en el [Anexo 20](#).



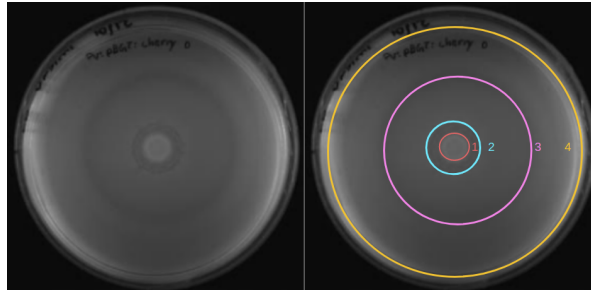
**Figura 9.8.** Áreas de crecimiento de los consorcios de dos elementos con *P. dendritiformis* a las 96h de incubación. Cada columna es un consorcio distinto. El consorcio *P. dendritiformis*:cherry se reporta solamente en la concentración de 0µg/ml de ampicilina puesto que no tiene crecimiento en concentraciones posteriores. En el consorcio *P. dendritiformis*:pBGT-1 el área de pBGT-1 abarca más de la mitad de la colonia desde los 100µg/ml de ampicilina.

Se realizaron las respectivas mediciones para determinar la **dispersión** de los consorcios: *P. dendritiformis* muestra una gran diferencia en su expansión respecto a los **cargos** cuando no hay antibiótico en el medio, sugiriendo que **no** existe **acarreo** bajo dichas condiciones (Figura 9.9). Sin embargo, desde los **50µg/ml**, la expansión de *P. dendritiformis* se reduce mientras que la de **pBGT-1** aumenta, mostrando un comportamiento paralelo y nunca rebasando la distancia máxima de *P. dendritiformis*, sugiriendo que existe acarreo (Figura 9.9).



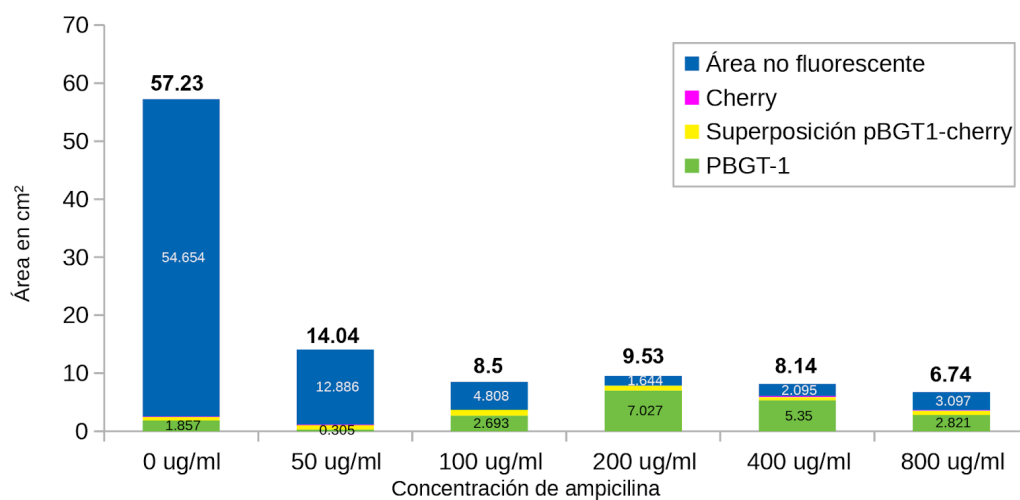
**Figura 9.9.** Distancia del punto de inoculación al borde de la colonia (dispersión) en los consorcios de dos elementos con *P. dendritiformis* a las 96h de incubación. El consorcio *P. dendritiformis*:pBGT-1 se indica con líneas continuas y el consorcio *P. dendritiformis*:cherry con líneas punteadas. A partir de los 100µg/ml se observa un comportamiento paralelo entre los componentes del consorcio *P. dendritiformis*:pBGT-1. Para pBGT-1 y cherry el borde de la colonia se determina en el punto donde termina la fluorescencia.

Para el **consorcio de tres elementos** (*P. dendritiformis*:pBGT-1:cherry) la morfología dominante en las colonias es **irregular**, con zonas **lobuladas** al interior, a excepción del consorcio en 0µg/ml, donde la colonia es circular y presenta **cuatro anillos concéntricos** sin fluorescencia ([Figura 9.10](#)). En 200µg/ml y 400µg/ml las colonias presentan una morfología **circular** ([Anexo 20](#)).



**Figura 9.10.** Anillos concéntricos de *P. dendritiformis*:pBGT-1 a las 96h de incubación en medio sin ampicilina. El anillo 1 corresponde al punto de inoculación.

Se obtuvieron las **áreas** de colonización de **pBGT-1** y **cherry** por separado pero también el área de **superposición** entre ellas y el área **no fluorescente** ([Figura 9.11](#)). El registro fotográfico diario se encuentra en el [Anexo 13](#) y las mediciones en el [Anexo 14](#).



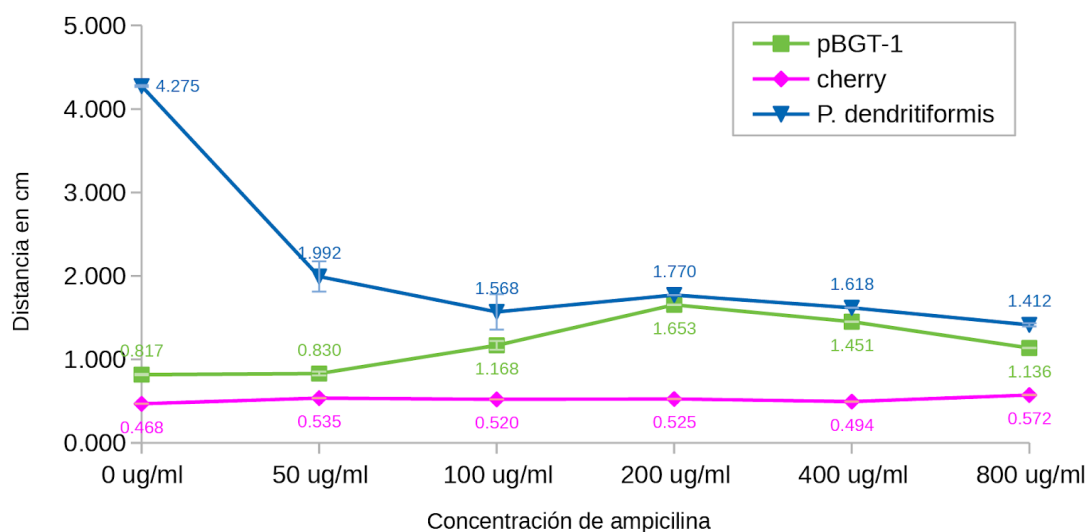
**Figura 9.11.** Áreas de crecimiento del consorcio de tres elementos con *P. dendritiformis* a las 96h de incubación. Cada columna es un consorcio distinto. La ampicilina reduce drásticamente el área total de la colonia desde los 50µg/ml. *E. coli* pBGT-1 abarca del 50% al 80% del área de la colonia desde los 100µg/ml. *E. coli* cherry se detecta en todos los tratamientos en superposición con *E. coli* pBGT-1.

A partir de los 50µg/ml de ampicilina, el **área** total de la colonia se reduce bruscamente y el área de **pBGT-1** va aumentando a la par del antibiótico, llegando a abarcar aproximadamente la **mitad** de la colonia en **100µg/ml** y **800µg/ml**, e incluso de un **70%** a

**80%** del área de la colonia en las concentraciones **200µg/ml** y **400µg/ml**. **Cherry** mantiene una mínima y casi imperceptible área exclusiva para su colonia; en todos los tratamientos se detecta en superposición con pBGT-1 ([Figura 9.11](#)).

La **dispersión** en el **consorcio** de **tres elementos** muestra una dinámica muy parecida a la que se registra para el consorcio de dos elementos, sugiriendo que **E. coli cherry** no es arrastrada bajo ninguna circunstancia. A pesar de esto, **cherry** logra crecer y mantenerse en el **centro** de la colonia en todas las concentraciones ([Figura 9.12](#)) ([Anexo 20](#)).

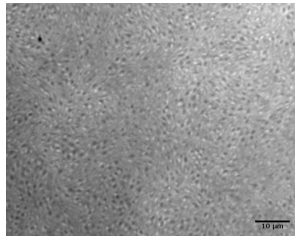
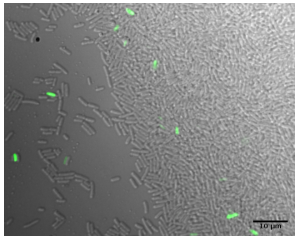
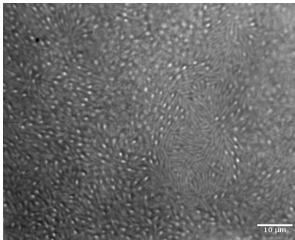
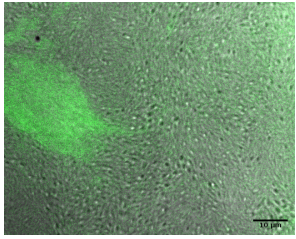
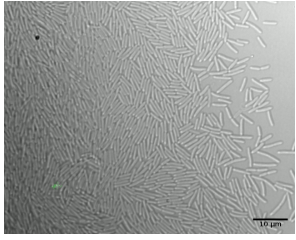
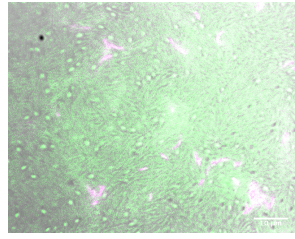
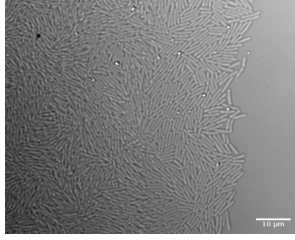
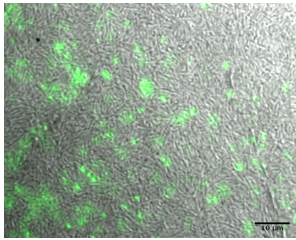
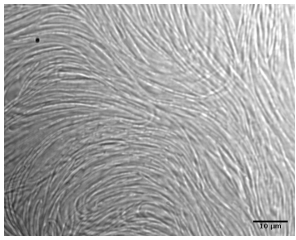
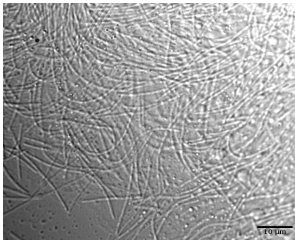
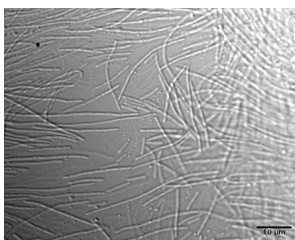
**P. dendritiformis** tiende a **reducir** su **expansión** conforme aumenta la concentración de **antibiótico**, mientras que con **pBGT-1** sucede lo contrario. Sin embargo, y al igual que en el consorcio de dos elementos, este **comportamiento inverso** parece llegar a un **equilibrio** donde las distancias entre **P. dendritiformis** y **pBGT-1** se mantienen paralelas y **P. dendritiformis** nunca es rebasada por pBGT-1 ([Figura 9.12](#)).



**Figura 9.12.** Distancia del punto de inoculación al borde de la colonia (dispersión) en los consorcios de tres elementos con **P. dendritiformis** a las 96h de incubación. Los puntos que coinciden verticalmente indican cocultivo. **E. coli** pBGT-1 muestra un comportamiento paralelo a las distancias de **P. dendritiformis**, lo que indica acarreo. No se observa ese comportamiento para **E. coli** cherry. Para pBGT-1 y cherry el borde de la colonia se determina en el punto donde termina la fluorescencia.

Se observó al **microscopio** la **interacción** y **formación** de **patrones** de todos los consorcios con **P. dendritiformis**. Las primeras observaciones, a partir de consorcios de **24h**, mostraron una colonización dominada por las cepas **E. coli** y ausencia de patrones de crecimiento o acarreo, por lo que las muestras se dejaron crecer por otras **48h** y posteriormente se observaron al microscopio ([Tabla 9](#)).

**Tabla 9. Imágenes de los consorcios con *P. dendritiformis* en diferentes concentraciones de ampicilina a una magnificación de 100x**

[Ampicilina]	<i>P. dendritiformis:cherry</i>	<i>P. dendritiformis:pBGT-1</i>	<i>P.dendritiformis:pBGT-1:cherry</i>
0µg/ml			
200µg/ml	sin datos	 	 
800µg/ml	sin datos	 	 

Se muestran las imágenes más representativas y de mejor calidad obtenidas por muestra. Aquellas en las que se logró detectar fluorescencia se muestran con su respectivo filtro rojo o verde, mientras que aquellas sin fluorescencia detectada se muestran en escala de grises.

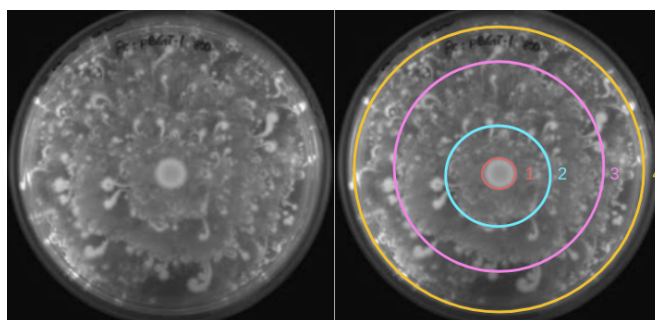
Se logró observar **movilidad** en **tiempo real** de los diferentes consorcios, la diferencia de tamaños entre los componentes, y se determinó que el *cargo* aumenta significativamente su movimiento individual al estar en cocultivo con *P. dendritiformis*. Los **videos** para los

**consorcios** de dos elementos se encuentran en <https://youtu.be/BDiCvdC-ukk> y los videos de los consorcios de tres elementos en [https://youtu.be/DZz\\_\\_3wwUto](https://youtu.be/DZz__3wwUto) ([Anexo 22](#)).

### 9.3.2. Consorcios de dos y tres elementos con *Paenibacillus lautus*

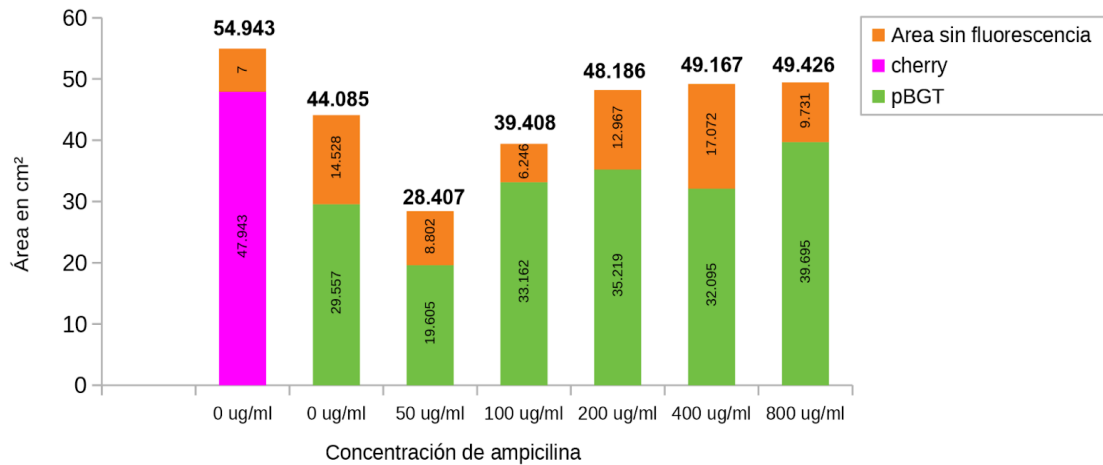
En el consorcio de dos elementos **sin** antibiótico *P. lautus:cherry*, las colonias presentan una morfología **rizoide** que se logra expandir uniformemente en toda la caja ([Anexo 21](#)). Se presenta una notable capacidad de acarreo por *P. lautus*, donde *E. coli* cherry abarca casi la totalidad de la colonia ([Figura 9.14](#)). *P. lautus:cherry* no presenta crecimiento desde los **50µg/ml** de ampicilina.

De igual forma, en el consorcio *P. lautus:pBGT-1* la morfología de las colonias es **rizoide**, con la diferencia de que a partir de los 200µg/ml se observan **anillos concéntricos** marcados por la presencia de pBGT-1 y una **expansión uniforme**, situación que no sucede en concentraciones menores donde la colonia abarca sólo una fracción de las cajas ([Figura 9.13](#)). El **acarreo** de pBGT-1 es evidente incluso en el medio sin antibiótico y muestra poca fluctuación entre la repartición de áreas; pBGT-1 ocupa entre el **70% y 80%** de la colonia total.



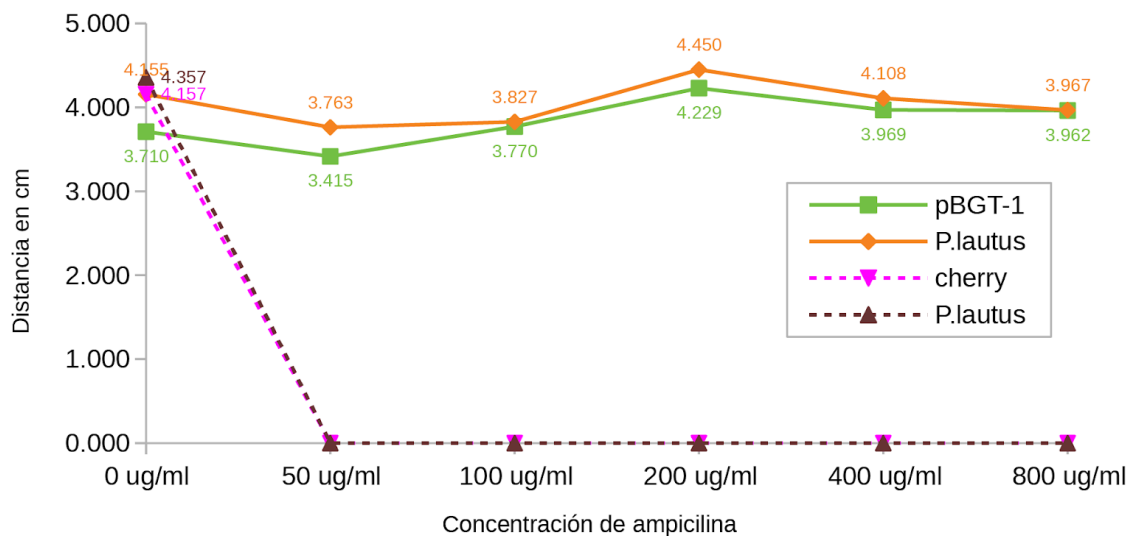
**Figura 9.13.** Anillos concéntricos de *P. lautus:pBGT-1* en 800µg/m de ampicilina a las 96h de incubación. El anillo 1 corresponde al punto de inoculación.

El registro fotográfico diario para *P. lautus:cherry* se encuentra en el [Anexo 15](#) y para *P. lautus:pBGT-1* en el [Anexo 16](#). Las mediciones se adjuntan en el [Anexo 17](#) y la distribución espacial con fluorescencia en el [Anexo 21](#).



**Figura 9.14.** Áreas de crecimiento de los consorcios de dos elementos con *P. lautus* a las 96h de incubación. Cada columna es un consorcio distinto. El consorcio *P. lautus*:cherry se reporta solamente en la concentración de 0µg/ml de ampicilina puesto que no tiene crecimiento en concentraciones posteriores. *E. coli* pBGT-1 se encuentra repartida en más del 70% del área de la colonia en todas las concentraciones.

Contrario a lo esperado, *P. lautus* muestra una alta capacidad de **acarreo** de **cargos** en medios **sin** antibiótico, lo que sugiere que la bacteria puede poseer un acarreo **pasivo**. Sin embargo, en el consorcio *P. lautus*:pBGT-1 desde los **50µg/ml** de **ampicilina**, la **distancia** entre **radios** de expansión se va igualando, sugiriendo que la cercanía entre células se vuelve cada vez más necesaria ([Figura 9.15](#)).



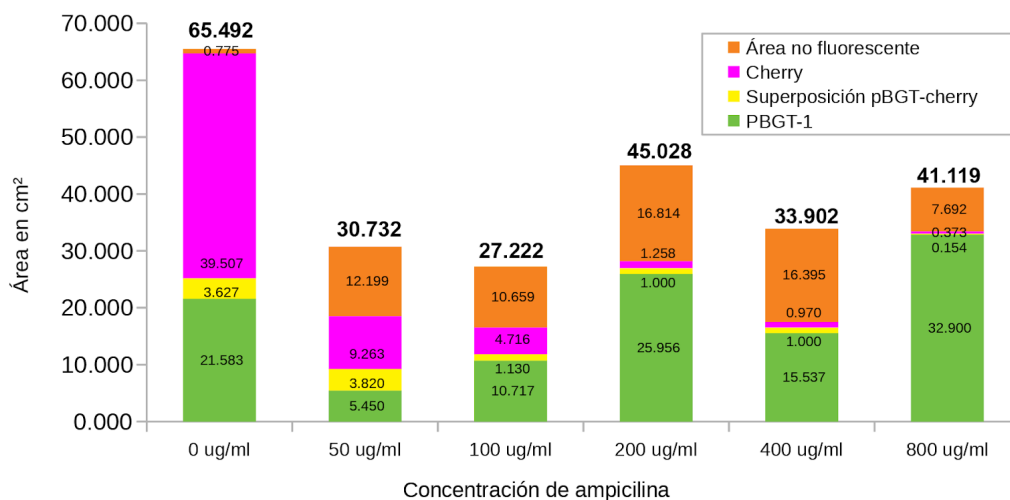
**Figura 9.15.** Distancia del punto de inoculación al borde de la colonia (dispersión) en los consorcios de dos elementos con *P. lautus* a las 96h de incubación. El consorcio *P. lautus*:pBGT-1 se indica con líneas continuas y el consorcio *P. lautus*:cherry con líneas punteadas. Para pBGT-1 y cherry el borde de la colonia se determina en el punto donde termina la fluorescencia.

El **consorcio** de **tres elementos** (*P. lautus*:pBGT-1:cherry) en 0µg/ml presenta una morfología **rizoide** uniforme en toda la caja. La aparición de **anillos** se da desde los 50µg/ml marcados por la **presencia** de **pBGT-1**. La distribución de **cherry** no parece formar



parte de los anillos concéntricos, sino que se desarrolla independientemente ([Anexo 23](#)).

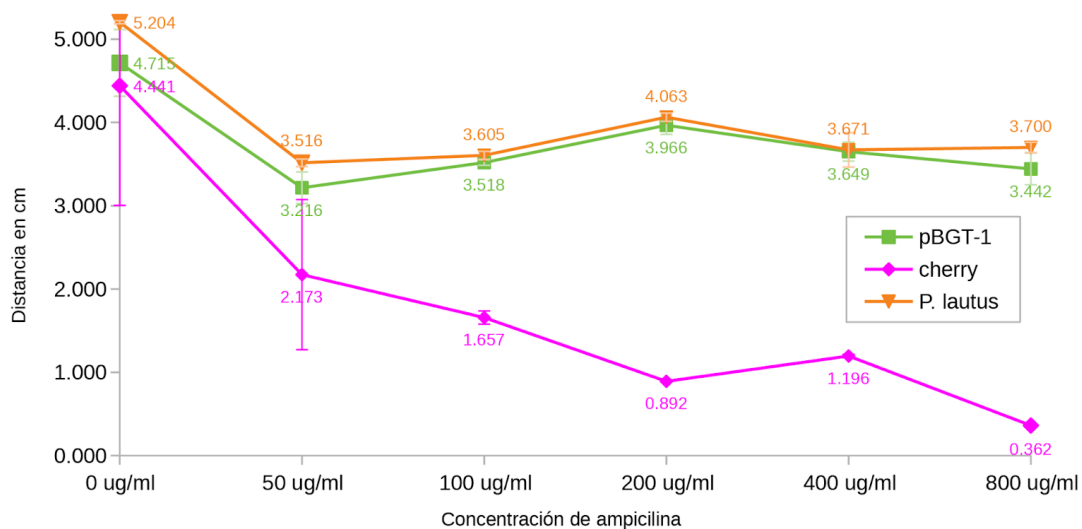
Se obtuvieron las **áreas** de colonización de **pBGT-1** y **cherry** por separado pero también el área de **superposición** entre ellas y el área **no fluorescente** ([Figura 9.16](#)). La superposición de áreas se da mayoritariamente en el punto de inoculación. El registro fotográfico completo se encuentra en el [Anexo 18](#) y las mediciones en el [Anexo 19](#).



**Figura 9.16.** Áreas de crecimiento del consorcio de tres elementos con *P. lautus* a las 96h de incubación. Cada columna es un consorcio distinto. El área de *E. coli* cherry y el área de superposición se van reduciendo conforme la concentración de ampicilina aumenta, mientras que el área de pBGT-1 aumenta hasta ocupar un máximo del 80% de la colonia.

En este caso se observa una **reducción** significativa de dos **áreas (Cherry y superpuesta)** conforme la concentración de antibiótico aumenta. Por otro lado, el **área** exclusiva de **pBGT-1** ocupa aproximadamente un **20%** de la colonia en **50µg/ml** y llega a un máximo de **80%** en la concentración más alta de antibiótico.

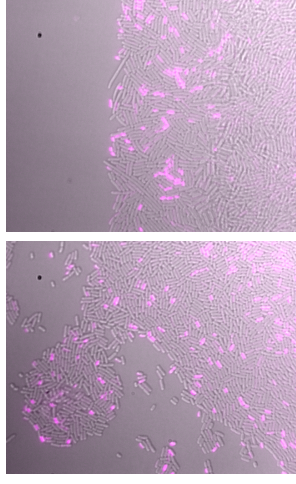
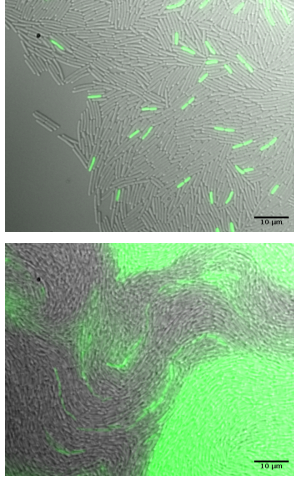
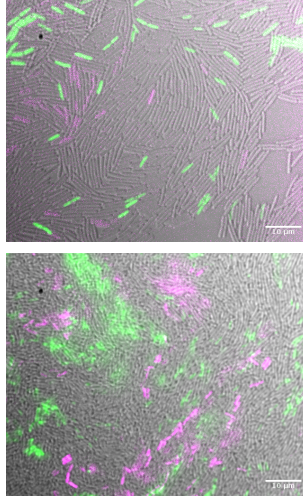
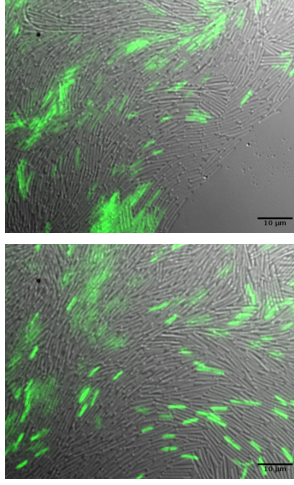
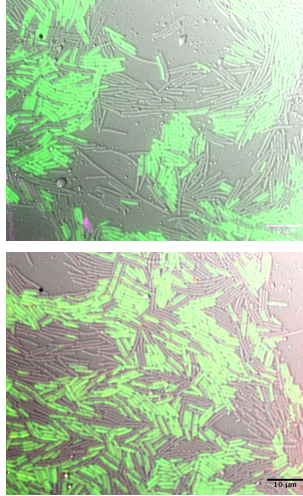
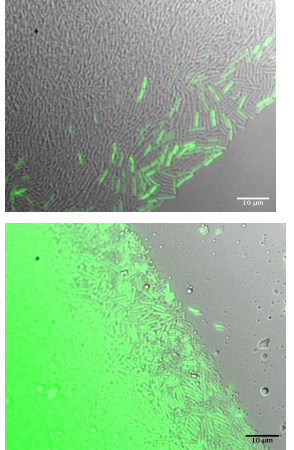
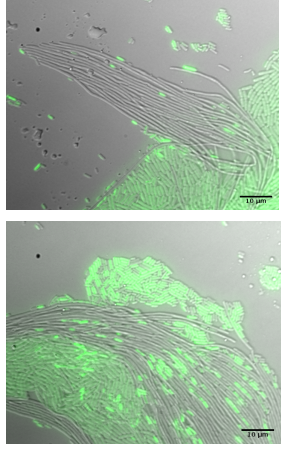
La **dispersión** por cepa en el **consorcio de tres elementos** muestra un comportamiento drástico para *E. coli* **cherry**, cuya expansión se reduce conforme aumenta el antibiótico. Ante la concentración más alta de antibiótico (**800µg/ml**), permanece recluida al centro de la colonia ([Anexo 23](#)). Por otro lado, *P. lautus* y **pBGT-1** muestran una dinámica parecida a la observada en su consorcio de dos elementos; pBGT-1 es acarreada en todas las concentraciones ([Figura 9.17](#)).



**Figura 9.17.** Distancia del punto de inoculación al borde de la colonia (dispersión) en los consorcios de tres elementos con *P. lautus* a las 96h de incubación. Los puntos que coinciden verticalmente indican cocultivo. El acarreo de los dos *cargos* observado en 0 $\mu$ g/ml se afecta en el momento en que se añade ampicilina al medio, favoreciendo únicamente el acarreo de pBGT-1. Para pBGT-1 y cherry el borde de la colonia se determina en el punto donde termina la fluorescencia.

Se observó al **microscopio** la **interacción** y **formación** de **patrones** de todos los consorcios con *P. lautus*. Las zonas de mayor interés para la observación microscópica fueron los **bordes**, pues se esperaba observar acarreo en dichas zonas, sin embargo, también se obtuvieron imágenes en zonas internas de la colonia donde se observó una distribución espacial única para pBGT-1 ([Tabla 10](#)).

**Tabla 10. Imágenes de los consorcios *P. lautus* en diferentes concentraciones de ampicilina a una magnificación de 100x**

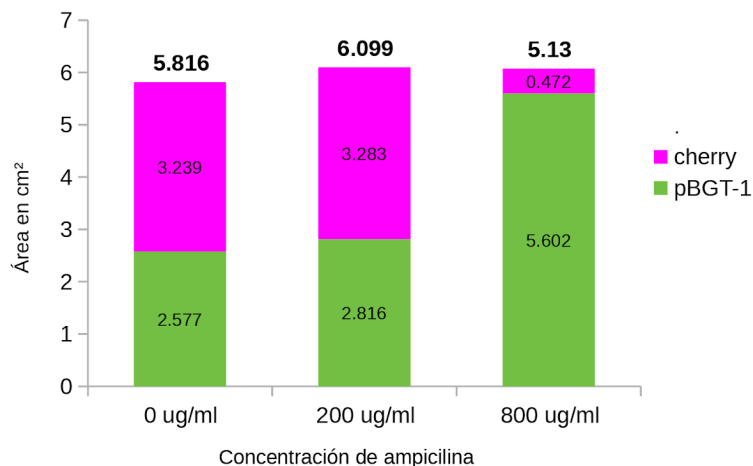
[Ampicilina]	<i>P. lautus:cherry</i>	<i>P. lautus:pBGT-1</i>	<i>P. lautus:pBGT-1:cherry</i>
0µg/ml			
200µg/ml	sin datos		
800µg/ml	sin datos		

Se muestran las imágenes más representativas y de mejor calidad obtenidas por muestra. Aquellas en las que se logró detectar fluorescencia se muestran con su respectivo filtro rojo o verde, mientras que aquellas sin fluorescencia detectada se muestran en escala de grises. Conforme se aumenta la concentración de antibiótico se deja de detectar a cherry y el borde de la colonia aparece dominado por pBGT-1 y *P. lautus*.

Se logró observar **movilidad** en **tiempo real** de los diferentes consorcios. Los **videos** para los consorcios de dos elementos con *P. lautus* se encuentran en <https://youtu.be/LtMVliUgN2k>, y los videos de los consorcios de tres elementos en <https://youtu.be/xhACIJeadzs> (Anexo 22).

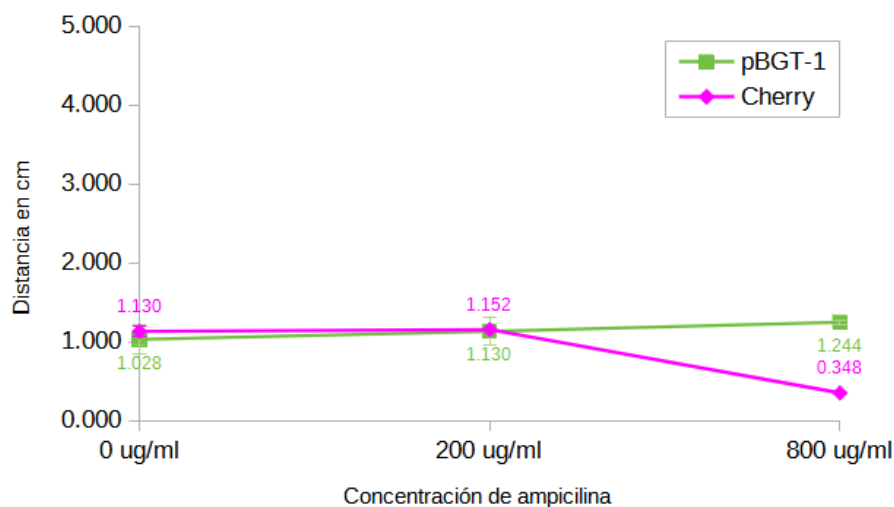
Por último, se realizó un **control** con ambos **cargos** en consorcio (**pBGT-1:cherry**) en 0µg/ml, 200µg/ml y 800µg/ml de **ampicilina** y se registró su área de colonización y movilidad como en los casos anteriores. La **morfología** de la colonia en consorcio es **irregular** y presentan **segregación**; las áreas de cada cepa están bien definidas sólo observando traslape de áreas en el centro de la colonia (Anexo 23).

En 800µg/ml **cherry** queda completamente recluida al **centro** de la colonia, a diferencia de lo que sucede en las otras concentraciones donde parecen ocupar aproximadamente la mitad de la colonia (Figura 9.18). **pBGT-1** incrementa bruscamente su área de colonización en **800µg/ml**, pues en 0µg/ml y 200µg/ml ocupa la mitad de la colonia sin observarse un incremento paulatino (Figura 9.18).



**Figura 9.18.** Áreas de crecimiento del consorcio **pBGT-1:cherry** a las 96h de incubación. Cada columna indica un consorcio distinto.

La capacidad de ambas cepas para alejarse del punto de inoculación es reducida y parecida en las concentraciones menores, mientras que en 800µg/ml de ampicilina **pBGT-1** supera a **cherry** en su capacidad de **dispersión**, sin mostrar algún tipo de **acarreo** (Figura 9.19).



**Figura 9.19.** Distancia del punto de inoculación al borde de la colonia (dispersión) en el consorcio **pBGT-1:cherry** a las 96h de incubación. Los puntos que coinciden verticalmente indican cocultivo. En todas las concentraciones ambas cepas son capaces de crecer. En 800µg/ml *E. coli* cherry queda recluida al centro de la colonia.

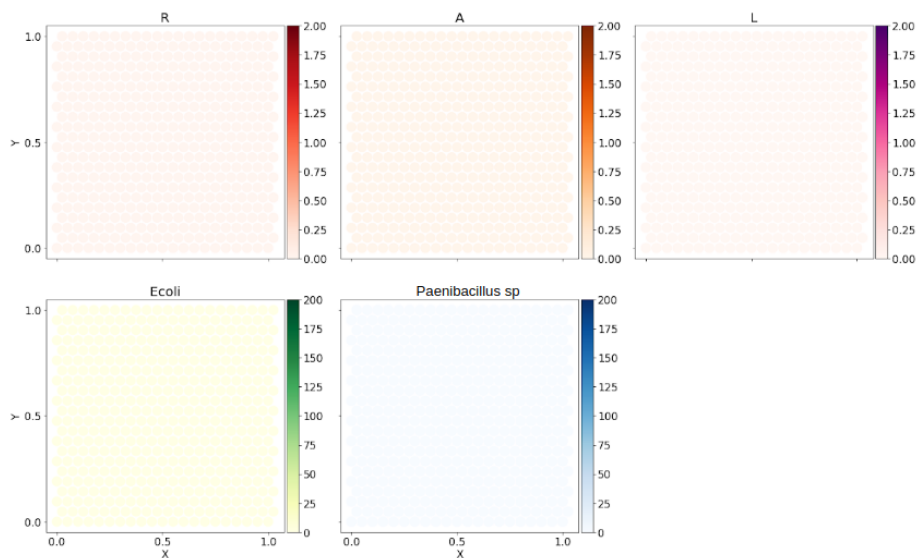
Todas las mediciones de distancias y áreas se realizaron utilizando el programa **ImageJ Fiji** versión 2017 disponible en <https://imagej.net/software/fiji/downloads>. En el [Anexo 24](#) se encuentra la metodología utilizada para editar las fotos y realizar las mediciones.

## 9.4. Resultados del modelo computacional

### 9.4.1. Lectura cualitativa de las simulaciones

Todas las **simulaciones** se desarrollaron en un **área cuadrada** de **21x22 locations**, que simula ser la superficie de una **caja de Petri**. A la derecha del área se ubica una **escala** que corresponde a los valores arrojados por la simulación. Al conjunto de área cuadrada con su respectiva escala se le llamará '**mapa**'.

Con cada simulación se obtienen **cinco** mapas, cada uno representando un parámetro distinto de la misma área: mapa de **recurso** (rojo), **antibiótico** (naranja), **betalactamasa** (rosa), ***E. coli*** (verde) y ***Paenibacillus sp.*** (azul) ([Figura 9.20](#)).



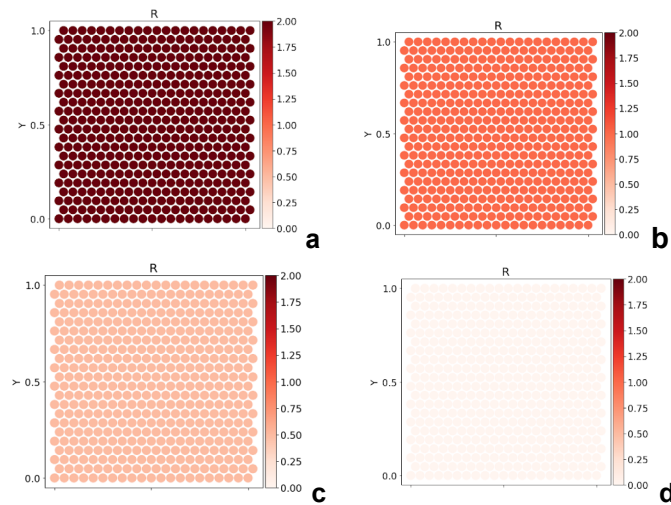
**Figura 9.20.** Cinco mapas de distintos parámetros se obtienen por simulación. Los cinco mapas corresponden a la misma área. R: recurso (rojo). A: antibiótico (naranja). L: betalactamasa (rosa). *E. coli* (verde) y *Paenibacillus sp.* (azul).

El modelo permite obtener una **imagen** de cada mapa para cada **tiempo** de la **simulación**, por lo que al final se puede generar un **timelapse** por simulación.

#### 9.4.2. Simulación de las sustancias abióticas

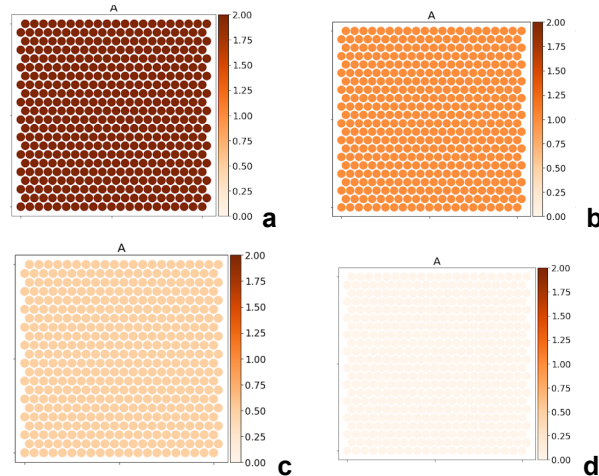
Se realizó un control para confirmar que el programa es capaz de representar distintas **concentraciones** de las **sustancias abióticas** en el medio, y de repartir dicha concentración **homogéneamente** en todas las **locations**. Este control es indispensable, pues antes de realizar la simulación con las bacterias, se debe corroborar que el modelo replique correctamente las características de un medio de cultivo *in vitro* donde, inicialmente, los **recursos** están repartidos **homogéneamente**.

Se realizaron **cuatro** simulaciones con los valores de recurso **2**, **1.5**, **1** y **0**, que corresponden a su concentración ([Figura 9.21](#)). Es importante mencionar que el modelo no considera **unidades** en los valores de concentración; los valores se establecen **arbitrariamente**.



**Figura 9.21.** Simulaciones con distinta concentración de recurso. Concentraciones: 2(a), 1.5(b), 1(c), 0(d). La intensidad del color se relaciona con su concentración en el medio.

Se realizó el mismo experimento para corroborar la correcta representación de **ampicilina** en la simulación, utilizando las mismas **concentraciones** que en el recurso: **2, 1.5, 1 y 0** ([Figura 9.22](#)). En ambos casos, el programa representa **correctamente** las distintas **concentraciones** de **sustancias abióticas** y las reparte **homogéneamente** en todas las **locations**.



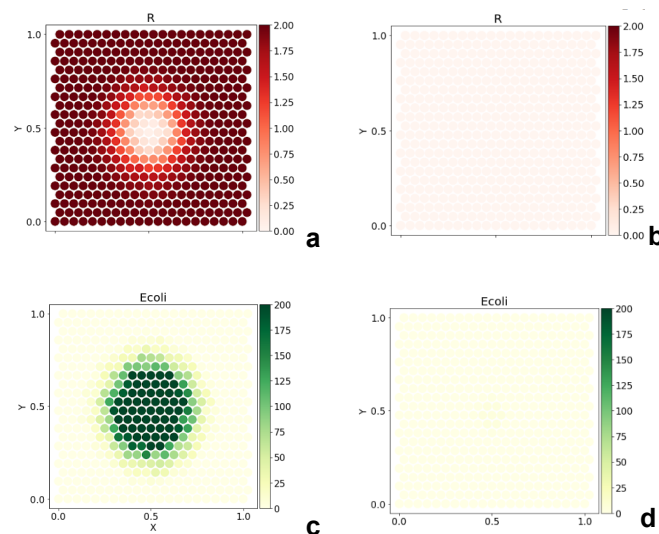
**Figura 9.22.** Simulaciones con distinta concentración de recurso. Concentraciones: 2(a), 1.5(b), 1(c), 0(d). La intensidad del color se relaciona con su concentración en el medio.

La última sustancia abiótica, la **betalactamasa**, al ser producida solamente en **presencia** de ***E. coli***, no se puede representar en el medio mediante la **asignación** de un valor de **concentración**, pues esta depende de la medida en que sea **producida** por ***E. coli***. Por otro lado, tampoco puede representarse distribuida homogéneamente en el medio, pues depende de la ubicación de ***E. coli***. Cabe recordar que en el modelo se representó únicamente a la ***E. coli*** productora de betalactamasa.

### 9.4.3. Uso del recurso y crecimiento de *E. coli* y *Paenibacillus sp.*

Se realizó una simulación en **monocultivo** con valores arbitrarios de inóculo y sin ampicilina para verificar si el **recurso** era utilizado por los componentes bióticos del sistema. Ambas bacterias se consideraron **metabólicamente** iguales, por lo que su **tasa de conversión del recurso en ATP** se estableció en un valor de **0.05**.

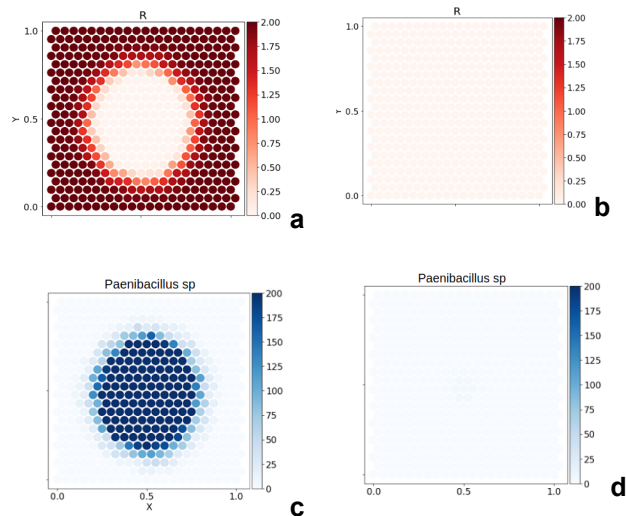
Tanto en *E. coli* (Figura 9.23) como en *Paenibacillus sp.* (Figura 9.24) se observa que la **presencia del recurso** permite su **supervivencia y crecimiento** en el medio, pues en su ausencia, a pesar de que se ‘inocula’ el espacio, no se observa crecimiento celular.



**Figura 9.23.** Consumo del recurso (R) y su relación con el crecimiento de *E. coli*. Crecimiento con recurso de *E. coli* (c). Crecimiento sin recurso de *E. coli* (d). El mapa (a) muestra el consumo de recurso por *E. coli*, puesto que el área donde se observa disminución de la concentración de recurso coincide con el área de crecimiento (c). Las simulaciones sin recurso no presentan crecimiento (b y d).

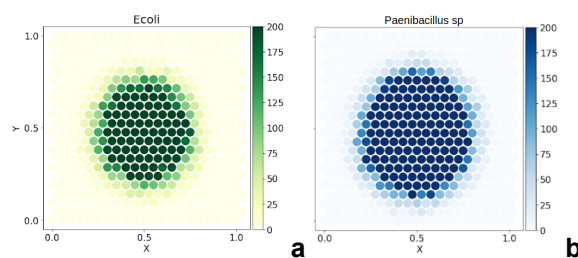
Además, en ambos casos la **presencia de bacterias** genera un cambio en el mapa de **recurso**, pues al estar siendo **consumido**, disminuye su **concentración**, lo que se presenta como una pérdida de la coloración original (Figura 9.23 y 9.24).





**Figura 9.24.** Consumo del recurso (R) y su relación con el crecimiento de un inóculo de *Paenibacillus sp.* Crecimiento con recurso (c). Crecimiento sin recurso (d). El mapa (a) muestra el consumo de recurso por *Paenibacillus sp.*, puesto que el área donde se observa disminución de la concentración de recurso coincide con el área de crecimiento (c). Las simulaciones sin recurso no presentan crecimiento (b y d).

Posteriormente, para establecer una **diferencia** en la **movilidad** de ambas bacterias, se realizaron **simulaciones** en **monocultivo** con diferentes valores arbitrarios para  $V_{max}$  (parámetro de **movilidad**) con un tiempo  $t = 20$ . Se utilizaron valores de  $V_{max}$  para *E. coli* de **0.01** y **0.001**, mientras que para *Paenibacillus sp.* solamente se utilizó una  $V_{max}$  de **0.1**, pues de esta forma se generaría una **diferencia relativa en movilidad** (Figura 9.25). Se optó por seguir las simulaciones con valores  $V_{max}$  para *E. coli* = **0.01** y *Paenibacillus sp.* = **0.1**.

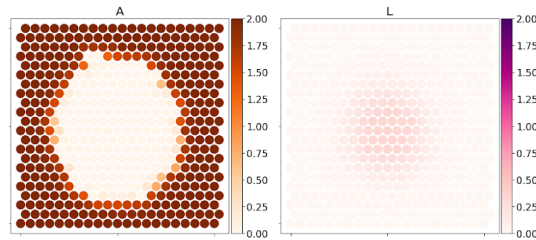


**Figura 9.25.** Comparación del crecimiento en monocultivo de *E. coli* y *Paenibacillus sp* con diferentes valores de  $V_{max}$ . *E. coli*: 0.01 (a) y *P. vortex*: 0.1 (b). La diferencia de velocidad por un orden de magnitud permite que *Paenibacillus sp* genere una colonia de mayor tamaño.

#### 9.4.4. Producción de betalactamasa y antibiótico

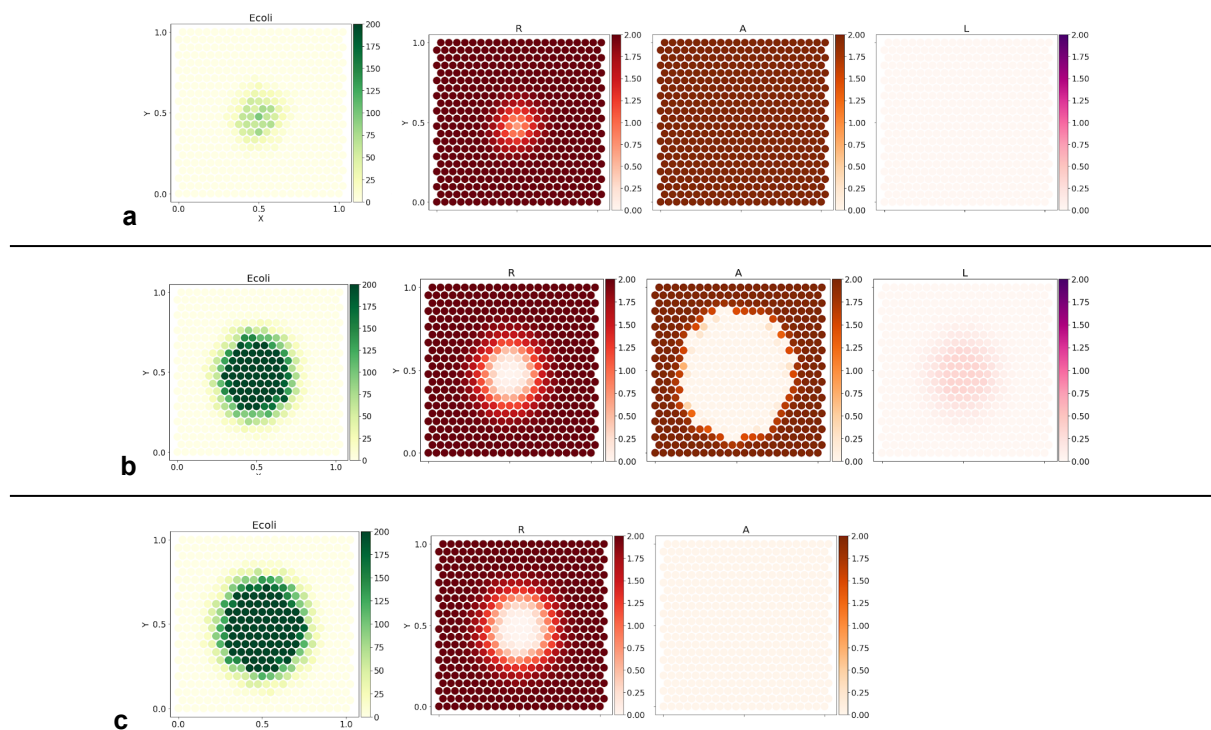
Se realizaron **simulaciones** considerando la producción de **betalactamasa**, en donde se definió su **tasa de difusión**, la tasa a la que es **producida** por *E. coli*, la visualización de su eficacia **detoxificando** el antibiótico y la **MIC** de cada especie.

Después de realizar varias simulaciones con valores arbitrarios, se optó por un valor de **difusión** de **0.05** y una **producción** de **5**, valores con los que se confirma su eficacia para eliminar al antibiótico del medio ([Figura 9.26](#)). Para *E. coli* la MIC se estableció en **1** y para *Paenibacillus sp.* en **0.01**.



**Figura 9.26.** Betalactamasa (L) producida por *E. coli* actuando sobre el antibiótico (A). Se observa la disminución drástica de la concentración de antibiótico (A) en relación al área ocupada por la betalactamasa (L).

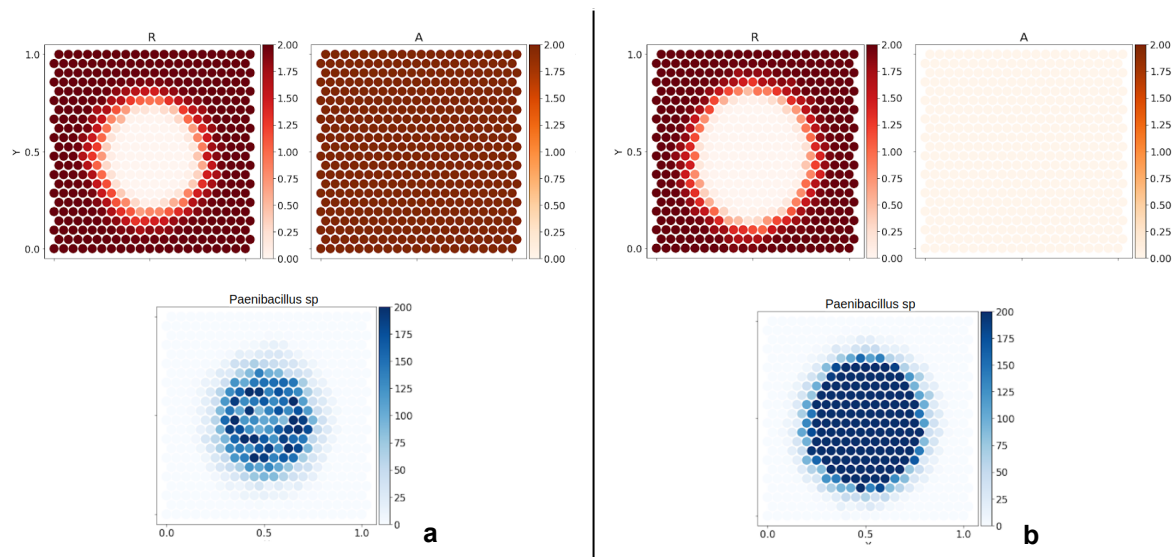
Posteriormente, para verificar que la enzima permite la **supervivencia** de *E. coli*, se evaluó el efecto del **antibiótico** sobre esta especie en **monocultivo**, eliminando su capacidad para producir **betalactamasa**. Por otro lado, se realizó una simulación **con** producción de **betalactamasa** y su comparación con el crecimiento de *E. coli* en medios sin antibiótico ([Figura 9.27](#)).



**Figura 9.27.** R: recurso. A: antibiótico. L: betalactamasa. *E. coli* en monocultivo creciendo en antibiótico sin producción de betalactamasa (a) y con producción de betalactamasa (b). *E. coli* creciendo en medio sin antibiótico (c). Se observa el efecto negativo del antibiótico sobre el crecimiento de *E. coli* cuando no se le permite producir betalactamasa (a), así como su efecto positivo cuando es capaz de producirla (b). La colonia sin antibiótico (c) presenta un tamaño ligeramente mayor a comparación de la colonia generada en medio con antibiótico y betalactamasa (b).

*E. coli*, al no ser capaz de producir **betalactamasa**, no es capaz de establecer una colonia con una densidad celular alta (Figura 9.27-a), sin embargo, cuando es capaz de producirla, puede generar una **colonia** casi tan **densa** como la que genera en medios sin antibiótico (Figura 9.27-b y c).

Por otro lado, se realizaron las respectivas simulaciones en **monocultivo** para *Paenibacillus sp.*, evaluando su **crecimiento** en **presencia** y **ausencia** de antibiótico, considerando que es incapaz de producir betalactamasa (Figura 9.28).



**Figura 9.28.** R: recurso. A: antibiótico. *Paenibacillus sp* en monocultivo creciendo en presencia de antibiótico (a) y en ausencia de antibiótico (b). Se observa la formación de una colonia densa cuando crece sin antibiótico (b) y la afectación en el crecimiento al desarrollarse en el medio con antibiótico (a).

Al comparar el **crecimiento** de *Paenibacillus sp.* en medios con **antibiótico**, se observa que éste no es degradado de ninguna forma y mantiene su **concentración** inicial hasta el final de la simulación. En el medio con **antibiótico**, *Paenibacillus sp.* es capaz de **crecer** y **expandirse** (Figura 9.28-a), sin embargo, su **densidad** celular es menor a la reportada cuando crece sin antibiótico (Figura 9.28-b).

Todos los **parámetros** del **espacio** establecidos en este apartado y en el anterior, conservan sus valores en las simulaciones siguientes. La siguiente tabla muestra el resumen de los **valores numéricos** para la clase **Locations** establecidos hasta el momento:

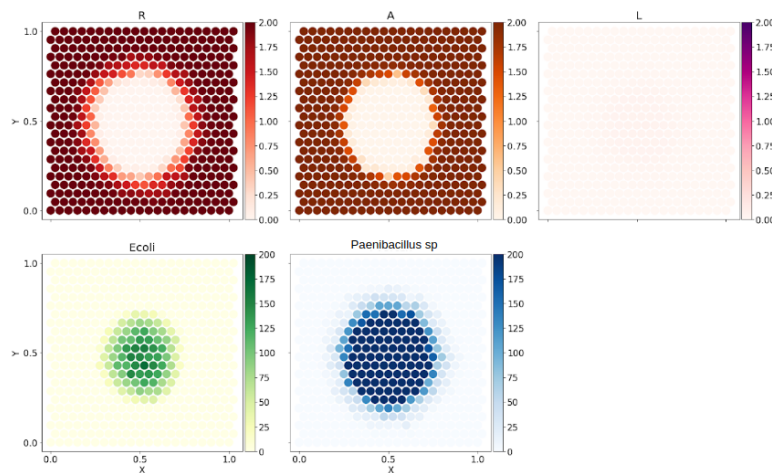
Tabla 11. Valores de los parámetros de la Clase Locations		
	Cantidad de coordenadas 'x'	21
	Cantidad de coordenadas 'y'	22
Recurso (R)	Concentración inicial	2.0
	<i>Colormap</i>	Reds
	Tasa de difusión	0.01
Antibiótico (A)	Concentración inicial	2.0
	<i>Colormap</i>	Oranges
	Tasa de difusión	0.01
Betalactamasa (L)	Concentración inicial	0.0
	<i>Colormap</i>	RdPu
	Tasa de difusión	0.05

De igual forma, los **parámetros** establecidos hasta el momento para cada **especie**, con base en lo establecido en este apartado y el anterior, se muestran en la siguiente tabla:

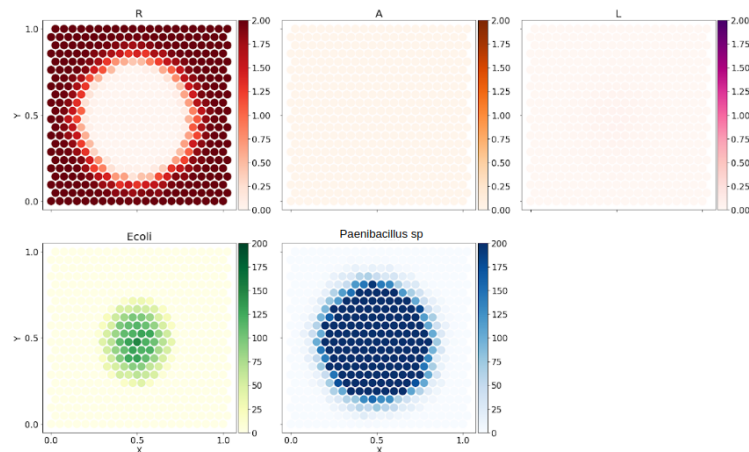
Tabla 12. Valores de los parámetros de la Clase Bacteria		
Tipo celular	<i>E. coli</i>	<i>Paenibacillus sp.</i>
Tasa de conversión del recurso en ATP	0.05	0.05
Tasa de movilidad	0.01	0.1
Mínima concentración inhibitoria	1	0.01
Tasa de producción de betalactamasa	5	0.0
Tipo de <i>colormap</i>	YIGn	Blues
Cantidad de células iniciales	100	100

### 9.4.5. Simulaciones en consorcio con medios homogéneos

Para las simulaciones en **consorcio**, se realizó un **inóculo** inicial de proporciones iguales (1:1), con **200** células totales, de las cuales **100** corresponden a *E. coli* y **100** a *Paenibacillus sp.*, tal como se realiza experimentalmente en Finkelshtein *et al.* (2015). A menos que se indique lo contrario, las simulaciones están hechas con un tiempo **t = 20**. Permitiendo la producción de **betalactamasa** por *E. coli* e iniciando con el **inóculo** mencionado anteriormente, se realizaron simulaciones en medios **con antibiótico** (Figura 9.29) y **sin antibiótico** (Figura 9.30). En **consorcio**, *E. coli* detoxifica el medio y permite que *Paenibacillus sp.* genere colonias tan **densas** como las que produce en medios sin antibiótico.

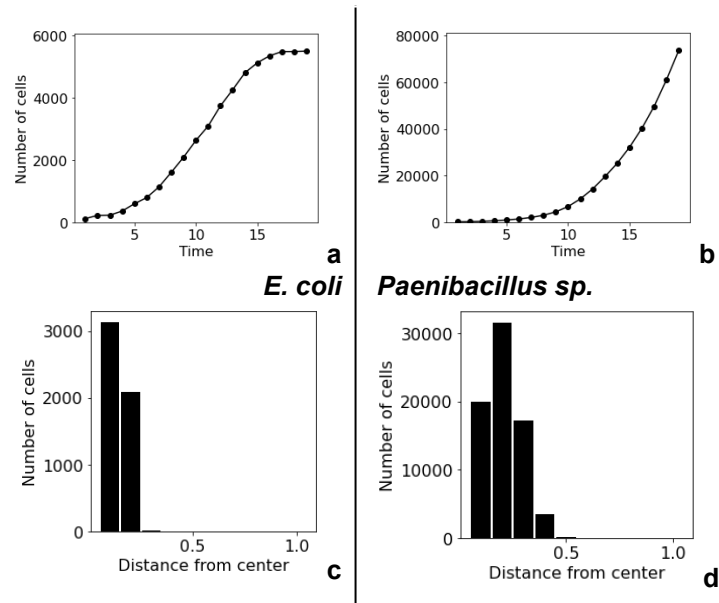


**Figura 9.29.** Consorcio 1:1 en medio con antibiótico. Ambas bacterias son capaces de establecer una colonia. El área de colonización de *Paenibacillus sp.* coincide con el área detoxificada por la betalactamasa (A).



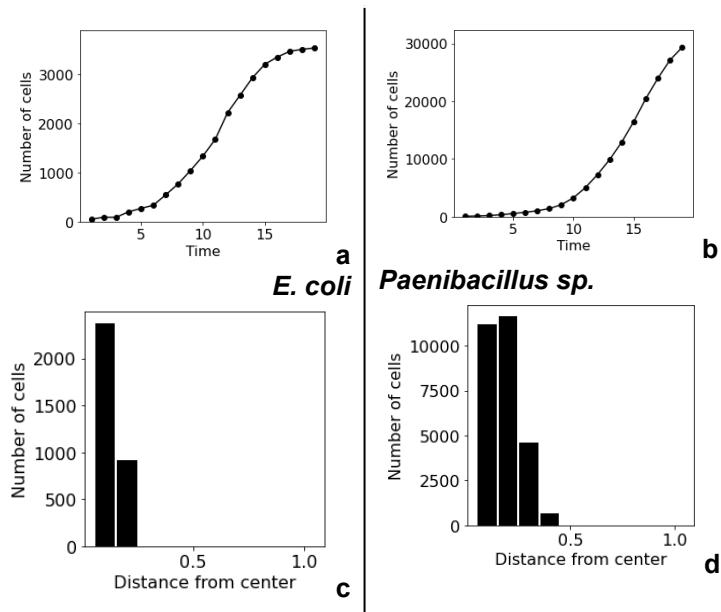
**Figura 9.30.** Consorcio 1:1 en medio sin antibiótico. Ambas bacterias son capaces de establecer una colonia. *Paenibacillus sp.* rebasa el crecimiento de *E. coli*.

De cada una de las **simulaciones** anteriores, se obtienen a la par **dos gráficas** más por cada tipo celular; una relativa a la **densidad celular** respecto al **tiempo** (comparable a una cinética de crecimiento) y otra relativa a la **distancia** recorrida desde el punto de inoculación al borde de la colonia (movilidad o perfil radial). Se obtuvieron las respectivas gráficas para los consorcios **sin antibiótico** ([Figura 9.31](#)) y **con antibiótico** ([Figura 9.32](#)).



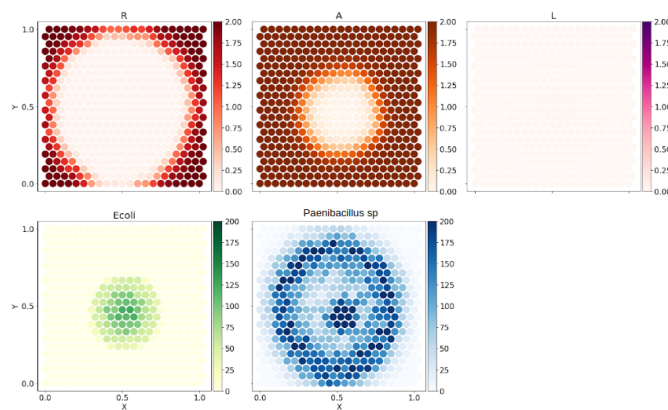
**Figura 9.31.** Cinéticas de crecimiento (a y b) y perfil radial (c y d) del consorcio en medio sin antibiótico. *E. coli*: a y c. *Paenibacillus sp.*: b y d. *Paenibacillus sp.* presenta mayores distancias recorridas desde el punto de inoculación al borde de la colonia (movilidad) (d).

En ambos casos *E. coli* muestra un **comportamiento similar** en su **cinética de crecimiento**, llegando a la fase **exponencial**, pero rápidamente **estancando** su crecimiento. Por otro lado, *Paenibacillus sp.* muestra un crecimiento **exponencial** en medios sin antibiótico, a comparación de lo que sucede en medios con **antibiótico**, donde comienza a **decrecer** a pesar de estar en **cocultivo**. Para ambas bacterias su **densidad celular** es **menor** en ambientes con **antibiótico**.



**Figura 9.32.** Cinéticas de crecimiento (a y b) y perfil radial (c y d) del consorcio en medio con antibiótico. *E. coli*: a y c. *Paenibacillus sp.*: b y d. *Paenibacillus sp.* sigue presentando mayores distancias recorridas desde el punto de inoculación al borde de la colonia (movilidad) a pesar de desarrollarse en medio con antibiótico (d).

Para observar la **dinámica del consorcio** en presencia de **antibiótico** con mayor **detalle**, se realizaron **simulaciones** de diferente **duración**, extendiendo la simulación hasta los **tiempos 30, 40 y 50** ([Figura 9.33](#), [9.34](#) y [9.35](#)).



**Figura 9.33.** Consorcio 1:1 en medio con antibiótico.  $t = 30$ .

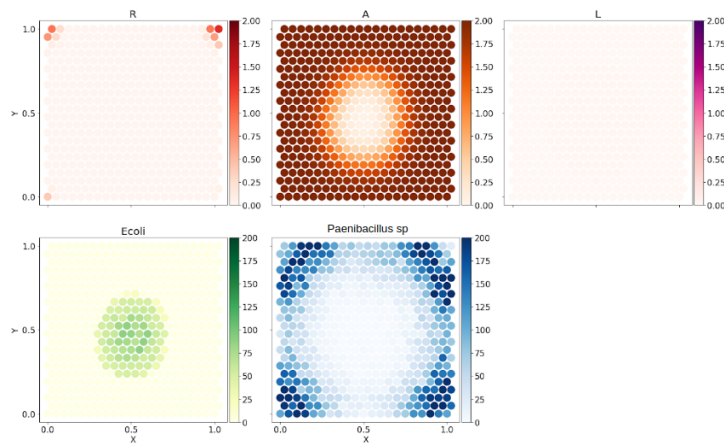


Figura 9.34. Consorcio 1:1 en medio con antibiótico.  $t = 40$ .

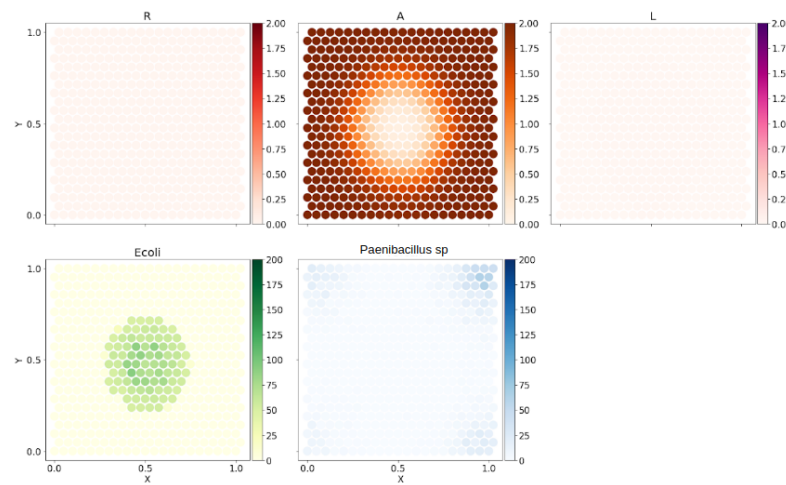
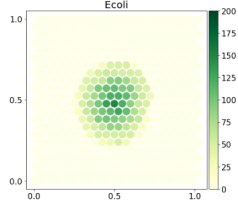
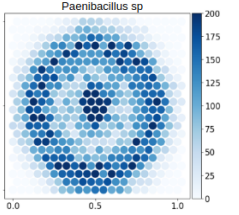
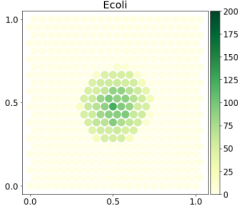
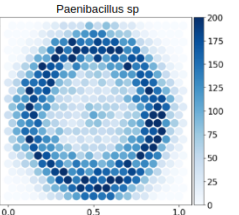
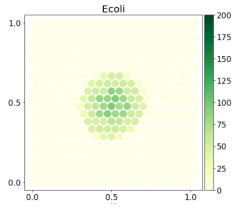
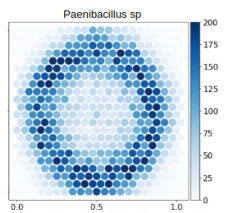
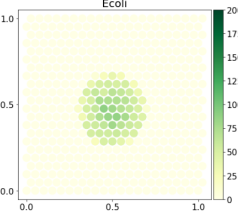
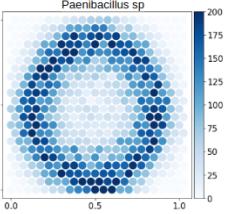
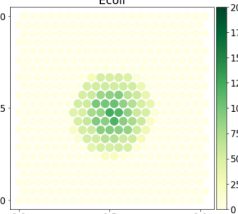
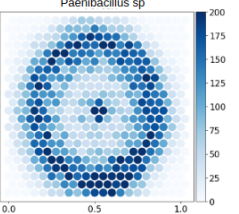
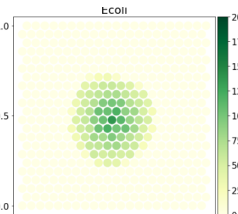
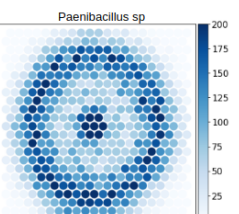


Figura 9.35. Consorcio 1:1 en medio con antibiótico.  $t = 50$ .

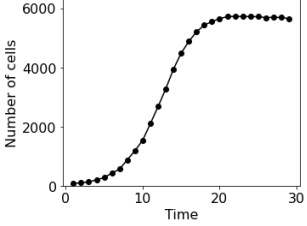
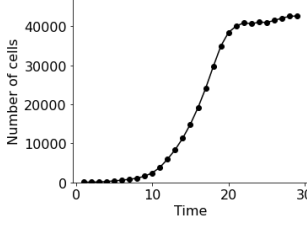
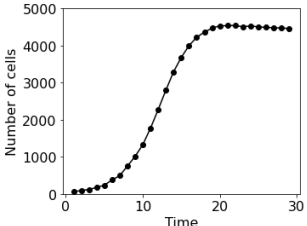
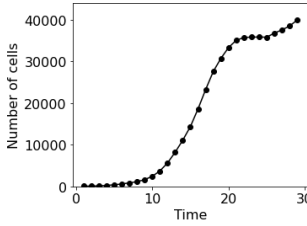
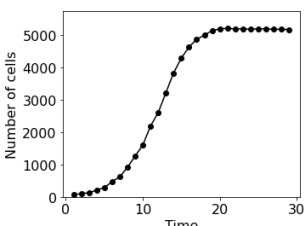
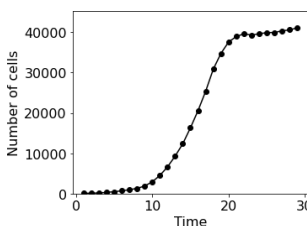
Con base en las simulaciones anteriores se logró definir un límite para la simulación en el  $t=50$ , donde la población de *Paenibacillus sp.* desaparece. Debido a que se detectó en el  $t=30$  la formación de **anillos concéntricos** se decidió continuar las siguientes **simulaciones** con esa **duración**. Se realizaron **seis repeticiones** más para observar la formación de **patrones** ([Tabla 13](#)).



**Tabla 13. Seis repeticiones de la simulación en consorcio 1:1 con antibiótico en un  $t = 30$**

Repetición	<i>E. coli</i>	<i>Paenibacillus sp.</i>
1		
2		
3		
4		
5		
6		

En todas las simulaciones de la [Tabla 13](#) se observa la **permanencia** de *E. coli* al **centro** del **consorcio**, mientras que *Paenibacillus sp.* genera una **ola expansiva** en forma de **anillo**. En algunas ocasiones, como en las **repeticiones 1, 5 y 6**, *Paenibacillus sp.* a pesar de generar una ola expansiva, mantiene células en el **centro**, junto a *E. coli*. A continuación se muestran las **cinéticas de crecimiento** de las repeticiones **1, 5 y 6**:

Tabla 14. Cinéticas de crecimiento de las simulaciones 1, 5 y 6 de la Tabla 13.		
Repetición	<i>E. coli</i>	<i>Paenibacillus sp.</i>
1		
5		
6		

Las **cinéticas** de crecimiento de *E. coli* en un **t=30** presentan el mismo comportamiento que su crecimiento en **t=20**; llegan a un punto en donde ya no aumenta la población. Por otro lado, *Paenibacillus sp.* cambia su **comportamiento** en el lapso de **t=20** a **t=30**, mostrando un **crecimiento** en su densidad celular, que puede estar relacionada con la **onda expansiva**.

Finalmente, se compararon los **perfiles radiales** de ambas especies en **consorcio 1:1** y con **antibiótico** en el medio. En los tres casos se muestra que *Paenibacillus sp.* tiene una población mucho más **dispersa** que *E. coli* (Tabla 15).

Tabla 15. Perfiles radiales de las simulaciones 1, 5 y 6 de la Tabla 13.		
Repetición	<i>E. coli</i>	<i>Paenibacillus sp.</i>
1		
5		
6		

El video con todas las simulaciones se encuentra en [https://youtu.be/pK5Yq-mx\\_oA](https://youtu.be/pK5Yq-mx_oA).

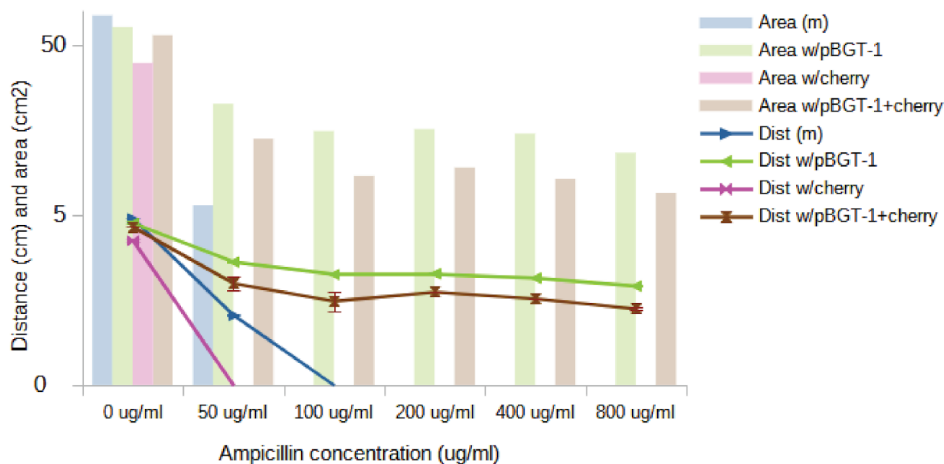
## 10. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Experimentos *in vitro*

#### 10.1. Patrones macroscópicos y dinámica ecológica

##### 10.1.1. Consorcios con *P. dendritiformis*

Para *P. dendritiformis* todos los consorcios reducen su movilidad y áreas en 0µg/ml de ampicilina (comparado con su valor más alto en monocultivo), siendo el cocultivo con **cherry** el que registra los valores menores. Sin embargo, desde los 50µg/ml de ampicilina, el beneficio de desarrollarse en cocultivo es evidente, pues *P. dendritiformis* es capaz de crecer en todas las concentraciones de ampicilina. El consorcio que le permite a *P. dendritiformis* establecer una colonia más grande es el **cocultivo con pBGT-1** (Figura 10.1).



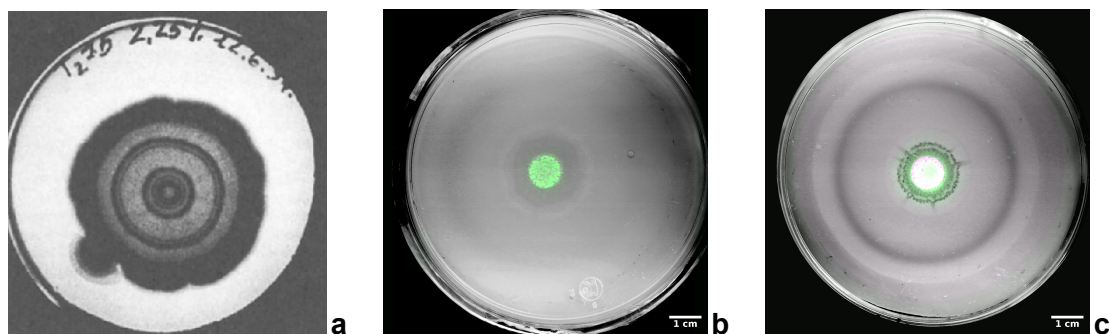
**Figura 10.1.** Comparación de las áreas de colonización y distancias del punto de inoculación al borde de la colonia (dispersión) de todos los tratamientos para *P. dendritiformis*. Monocultivo (m), consorcio con pBGT-1, consorcio con cherry y consorcio de tres elementos (pBGT-1+cherry). El consorcio que le confiere los valores más altos es el cocultivo con pBGT-1.

Por otro lado, el **consorcio de tres elementos** presenta valores menores para área y movilidad, y aunque sigue siendo beneficioso para *P. dendritiformis*, la disminución en ambos parámetros puede deberse al aumento de la proporción de células no móviles por la presencia de **cherry**. En el consorcio de tres elementos dos terceras partes del inóculo inicial contiene células no móviles (pBGT-1 y cherry), lo que podría estar entorpeciendo la expansión de *P. dendritiformis*. Por otro lado, la presencia de **cherry** aumenta la proporción de células susceptibles, lo que puede estar propiciando una interacción de **competencia** con *P. dendritiformis* por el **espacio** sin antibiótico (Figura 10.1).

*P. dendritiformis* muestra una **morfología** contraria a la esperada en todos los tratamientos, pues no se detectaron ramas ni estructuras fractales a nivel macroscópico. Esto puede deberse a que los experimentos se realizaron en cajas con **medio rico** (LB), pues el mismo fenómeno se observa cuando *P. dendritiformis* crece en altas concentraciones de **peptona** (rico en nutrientes) y se le conoce como “**colonia compacta**” (Figura 10.2) (Golding *et al.*, 2001). El crecimiento como **colonia compacta** de *P. dendritiformis* está presente en todas las cajas a pesar de desarrollarse en cocultivo con otras cepas, lo que sugiere que la disponibilidad de nutrientes no es afectada negativamente por el aumento de la biodiversidad.

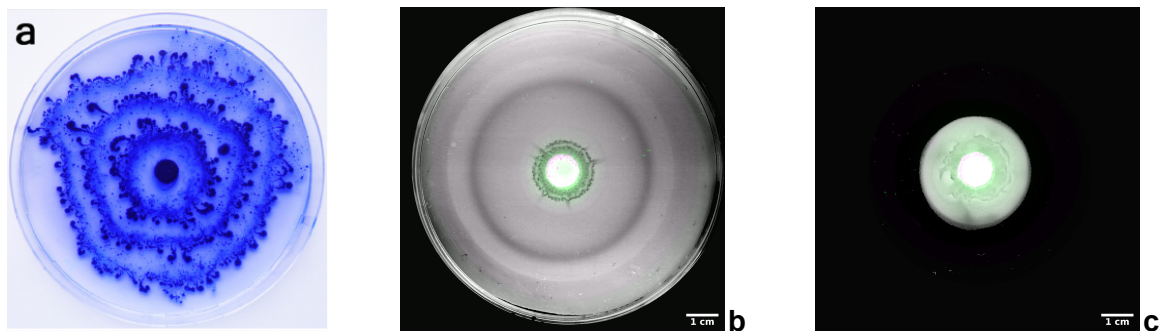
A nivel microscópico, para los consorcios con *P. dendritiformis* se logró observar un **movimiento colectivo** y **ondulado** de las colonias en las zonas más **densas**, sin embargo, fue difícil detectar a las células **cargo** (pBGT-1 y cherry) en todas las muestras observadas al microscopio y particularmente difíciles de detectar en las zonas de interés para el proyecto: los **bordes** de la colonia.

Por otro lado, la presencia de **anillos concéntricos** en *P. dendritiformis* está reportada como consecuencia de crecer en altas concentraciones de **agar** (Golding *et al.*, 2001), sin embargo, todos los tratamientos tienen la misma concentración de agar (1.5%) y los **anillos concéntricos** se observaron solamente en **seis** cajas, tres de ellas sin antibiótico (monocultivo, *P. dendritiformis*:pBGT-1 y *P. dendritiformis*:pBGT-1:cherry) y las tres restantes en 200µg/ml, 400µg/ml y 800µg/ml de ampicilina en el consorcio de tres elementos (*P. dendritiformis*:pBGT-1:cherry) (Figura 10.2).



**Figura 10.2.** Colonia compacta con anillos concéntricos de *P. dendritiformis* crecida en 15 g/l de peptona y 2.25% de agar (a) (Golding *et al.*, 2001). Consorcio *P. dendritiformis*:pBGT-1 en 0µg/ml de ampicilina en medio LB con 1.5% de agar (b) y consorcio *P. dendritiformis*:pBGT-1:cherry en 0µg/ml de ampicilina en medio LB con 1.5% de agar (este estudio). En todos los casos se puede observar la formación de anillos concéntricos. La distribución de pBGT-1 se muestra en verde y la de cherry en magenta, la superposición de *cargos* se muestra en blanco.

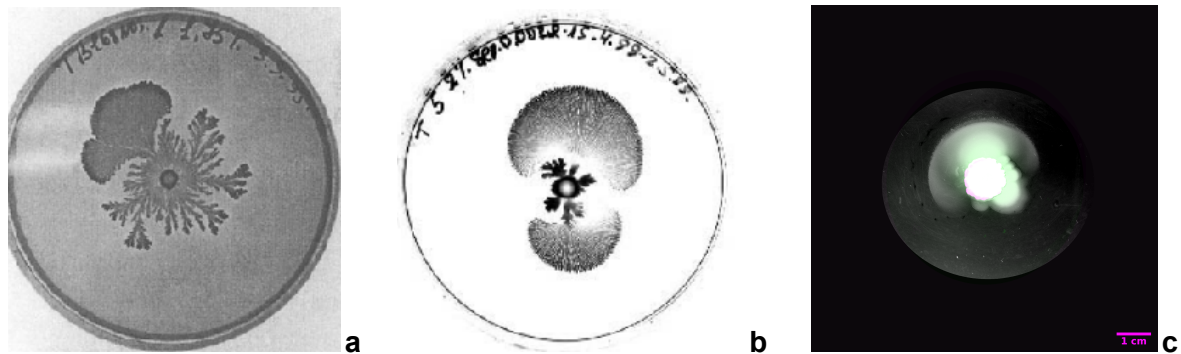
La presencia de **anillos** en los diferentes tratamientos **no** se puede relacionar al mismo proceso que sucede en el consorcio *E. coli* - *P. vortex* ([punto 3.3.1](#)), pues los anillos se detectaron en las cajas sin antibiótico. Además, la **fluorescencia** de pBGT-1 **no** coincide con el contorno de los anillos, lo que asegura ser una dinámica distinta a la del consorcio *E. coli* - *P. vortex* ([Figura 10.3](#)). El área de expansión de pBGT-1 aparece difuminada hacia el exterior en los tratamientos con antibiótico presentando una morfología distinta a la generada en monocultivo y en consorcio con cherry, lo que sugiere que *P. dendritiformis* es el factor que moldea la morfología de pBGT-1 mediante un **acarreo selectivo**.



**Figura 10.3.** Anillos concéntricos del consorcio *E. coli* - *P. vortex* con 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina (a) (Finkelshtein *et al.*, 2015). Consorcio *P. dendritiformis*:pBGT-1:cherry en 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina (b) y en 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina (c) (este estudio). Los anillos de los consorcios en este estudio no presentan la misma densidad celular que los de Finkelshtein *et al.* (2015). La distribución de pBGT-1 se muestra en verde y la de cherry en magenta, la superposición de *cargos* se muestra en blanco.

Los **lóbulos** detectados en la mayoría de los consorcios de *P. dendritiformis* son un fenómeno ya reportado para la bacteria, ocasionado por células **morfológicamente** distintas con una dinámica de **crecimiento** diferente (Golding *et al.*, 2001). Estas células generan un sector distinto del resto de la colonia marcado por una forma de **abanico** ([Figura 10.4](#)) (Golding *et al.*, 2001).

Este cambio morfológico para *P. dendritiformis* se ha descrito como un mecanismo de **supervivencia** ante un **estrés**, puesto que el cambio corresponde a la **elongación** de sus células (Golding *et al.*, 2001). Las estructuras abanico se pueden observar en todos los consorcios desde los 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina, por lo que se puede relacionar directamente a la presencia de **antibiótico** ([Figura 10.4](#)).



**Figura 10.4.** Sectores emergentes con forma de abanico en *P. dendritiformis* crecida en 1g/l de peptona y 1.75% de agar (a) (Golding *et al.*, 2001). Sectores de abanico en *Bacillus subtilis* en 5g/l peptona, 2% agar y cotrimoxazol (b) (Golding y Ben-Jacob, 2001). Sectores de abanico presentes en el consorcio *P. dendritiformis*:pBGT-1:cherry con 100µg/ml de ampicilina en LB con 1.5% de agar (c) (este estudio). La distribución de pBGT-1 se muestra en verde y la de cherry en magenta, la superposición de *cargos* se muestra en blanco.

Esta situación se confirma con las imágenes microscópicas, donde se observan **células hiper elongadas** de *P. dendritiformis*, así como **esporas** en el **borde** de la colonia; dos **estrategias** bacterianas para sobrevivir a condiciones hostiles. Al ser *P. dendritiformis* productora de **surfactante**, la **betalactamasa** se encuentra potencialmente **disuelta** en un medio que podría facilitar su **difusión** y los sectores con forma de abanico pueden estar reflejando las zonas del agar donde la **betalactamasa** excretada ha disminuido la **concentración** de **ampicilina**, llegando a una concentración donde *P. dendritiformis* utiliza sus mecanismos de **tolerancia** a antibióticos.

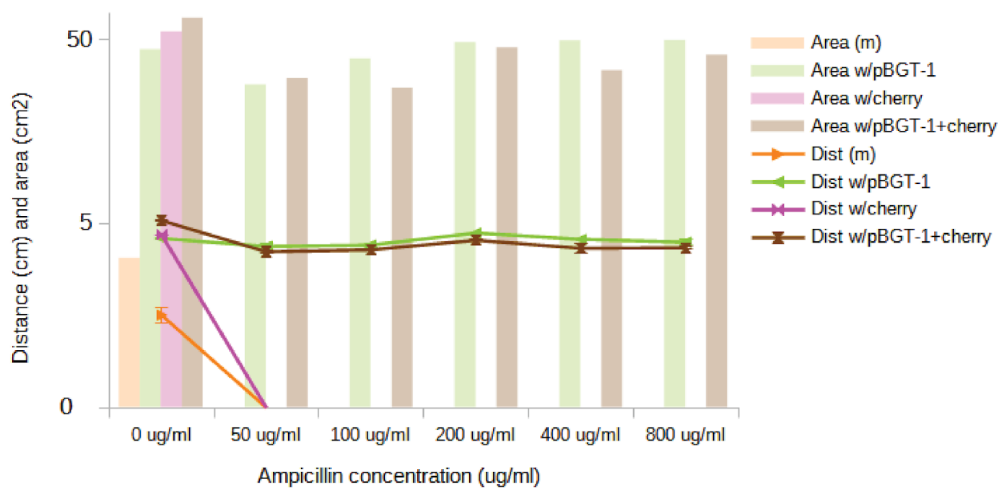
A pesar de que el tamaño total de la colonia se reduce en presencia de antibiótico, *P. dendritiformis* parece tener la ventaja en todos los tratamientos, incluidos aquellos con antibiótico, pues mantiene la delantera en el borde de la colonia, lo que le permite ser la primera bacteria en llegar a zonas no colonizadas y asegura su supervivencia mediante la **esporulación** y **elongación** de sus células.

### 10.1.2. Consorcios con *P. lautus*

Para *P. lautus* todos los **consorcios** le confieren una **ventaja** en área de colonización y dispersión (Figura 10.5). Esto puede ser explicado considerando una serie de hechos: primero, *P. lautus* es la bacteria con el **crecimiento** más **lento**, posiblemente debido a la gran **longitud** que alcanzan sus células; segundo, *P. lautus* se expande mediante **swarming**, movimiento que requiere de la generación de **enjambres** para poder desplazarse y dependiente de la densidad celular (Sharma y Anand, 2002); y tercero, ambas

cepas de *E. coli* tienen una **velocidad de reproducción** mayor, lo que estaría aumentando la **densidad** celular y posterior formación de **enjambres** en el *swarming* de *P. lautus*.

Por lo tanto, *P. lautus* podría estar censando el **exceso de población** (debido a la presencia de *E. coli*) y hacer el cambio fenotípico de **cocos** a **bacilos flagelados** para migrar a zonas con una densidad celular menor, mientras en su camino acarrea diferentes *cargos*. En conjunto, la presencia de las cepas *E. coli* estaría **activando el swarming** de *P. lautus* en medios con y sin antibiótico.



**Figura 10.5.** Comparación de las áreas de colonización y distancias del punto de inoculación al borde de la colonia (dispersión) de todos los tratamientos para *P. lautus*. Monocultivo (m), consorcio con pBGT-1, consorcio con cherry y consorcio de tres elementos (pBGT-1+cherry). Todos los consorcios le confieren a *P. lautus* mayores valores a comparación de su alcance en monocultivo.

Para *P. lautus* los valores de **dispersión** entre el consorcio con **pBGT-1** y el consorcio de **tres elementos** son muy parecidos, sugiriendo existe una mayor robustez ante cepas **cheaters** (Figura 10.5). El antibiótico selecciona por aquellos enjambres que contienen *E. coli* pBGT-1 pues aquellos con cherry son cada vez menos frecuentes conforme aumenta la concentración de ampicilina.

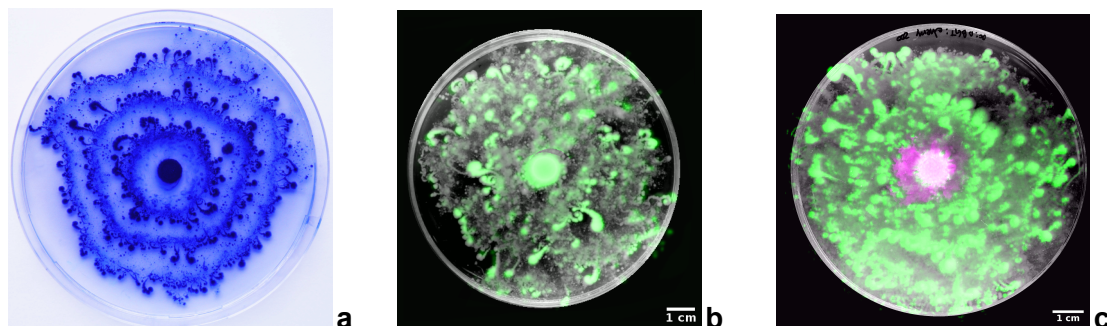
A diferencia de la cepa *P. lautus* utilizada en Finkelshtein *et al.* (2015), la cepa utilizada en este estudio resultó ser **altamente eficiente** para el **acarreo** de otras bacterias, detectando acarreo en tiempo real a nivel microscópico. Las células de pBGT-1 quedan atrapadas en los **enjambres** o entre las **células hiperfilamentadas** de *P. lautus*. Esta habilidad de acarreo no resulta sorprendente si se observa el **árbol filogenético** del género *Paenibacillus*, identificando a *P. lautus* como la segunda especie más cercana a *P. vortex* (Figura 2.6).



Se identificaron **anillos concéntricos** en los consorcios de dos y tres elementos. Se observó que conforme **aumenta** la **concentración** de antibiótico, **aumenta** a la par la **cantidad** de **anillos** concéntricos; es decir, que el antibiótico **detiene y moldea** el **patrón** de crecimiento en los consorcios con *P. lautus* ([Figura 10.6](#)).

Los **contornos** de los **anillos** coinciden perfectamente con la **fluorescencia** de **pBGT-1**, que no es el caso para cherry en los consorcios de tres elementos; **cherry** desarrolla un área de crecimiento **irregular** en todas las concentraciones, lo que indica que el **patrón** de **anillos concéntricos** sucede como una **relación** íntima entre **pBGT-1** y *P. lautus* a pesar de coexistir con cherry ([Anexo 21](#)).

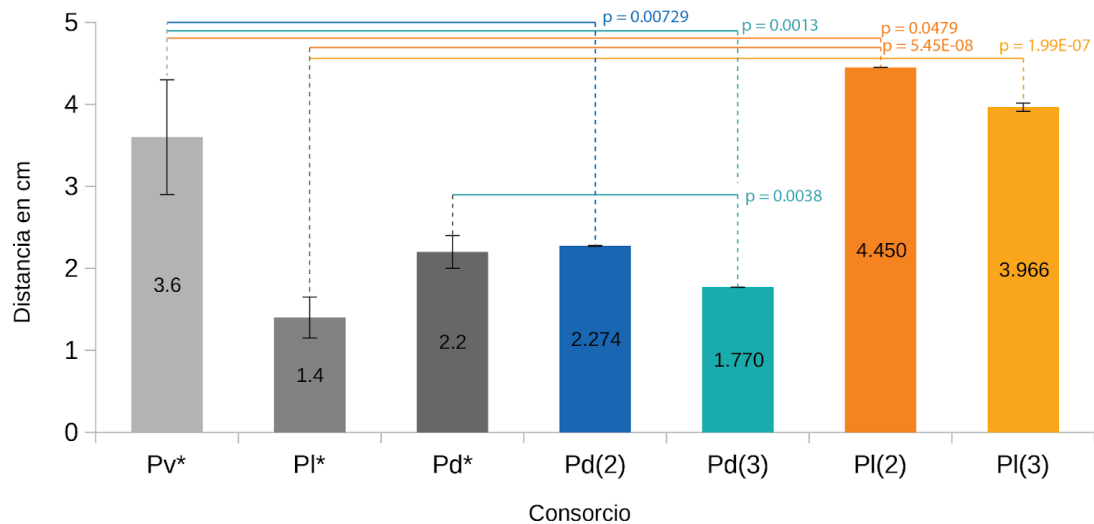
Tal como se observa en los experimentos de Finkelshtein, a nivel microscópico los consorcios con *P. lautus* también presentan un **borde** de la colonia **mixto** pero dominado en su mayoría por las células de *P. lautus*. Esta distribución espacial puede estar representando el mismo proceso que sucede en el consorcio *P. vortex*:*E. coli*: *P. lautus* invade nuevos territorios detoxificados sin el **cargo**, para posteriormente generar nuevas olas expansivas con acarreo, una interacción denominada **mutualismo por conveniencia** (Finkelshtein *et al.*, 2015).



**Figura 10.6.** Anillos concéntricos del consorcio *E. coli* - *P. vortex* con 200µg/ml de ampicilina (a) (Finkelshtein *et al.*, 2015). Consorcio *P. lautus*:pBGT-1 en 200µg/ml de ampicilina (b), y consorcio *P. lautus*:pBGT-1:cherry en 200µg/ml de ampicilina (c) (este estudio). La distribución de pBGT-1 se muestra en verde y la de cherry en magenta, la superposición de *cargos* se muestra en blanco.

Finalmente, se comparan los radios de **dispersión** registrados en este estudio con los radios de dispersión publicados por Finkelshtein *et al.* (2015) mediante una prueba estadística **T de Student** ( $\alpha = 0.05$ ) ([Figura 10.7](#)). Los consorcios con *P. lautus* realizados en este proyecto (PI2 y PI3) muestran valores mayores a los registrados por el estudio de

2015 (PI\*), y superando los valores de *P. vortex* (Pv\*) se encuentra únicamente el consorcio *P. lautus*:pBGT-1 (PI2) (Figura 10.7).



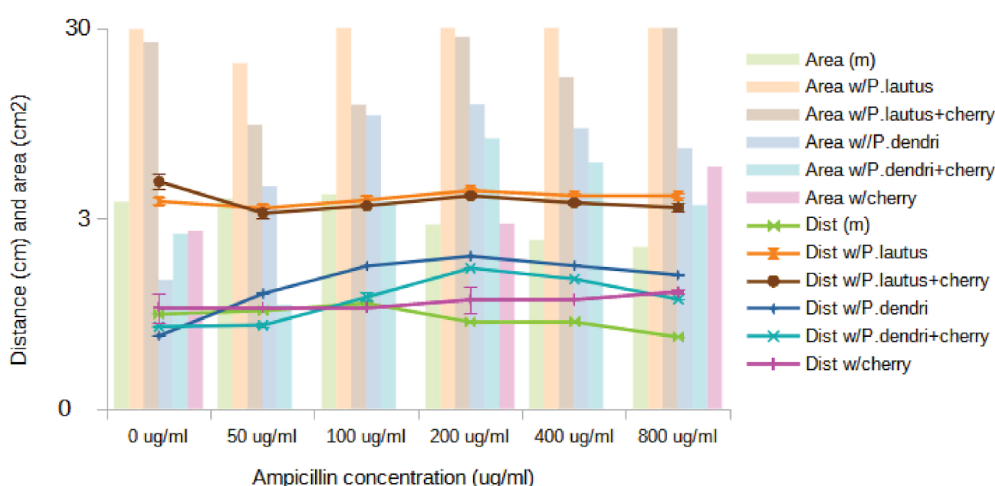
**Figura 10.7.** Comparación de la dispersión de los consorcios evaluados por Finkelshtein *et al.* (2015) con diferentes especies de *Paenibacillus* en cocultivo con una *E. coli* resistente y creciendo en 200µg/ml de ampicilina. (\*Los consorcios estudiados por Finkelshtein *et al.* se indican con barras grises y un asterisco al lado de las siglas). Pv\*: *P. vortex* con *E. coli*; PI\*: *P. lautus* con *E. coli*; Pd\*: *P. dendritiformis* con *E. coli*. Consorcios estudiados en este proyecto creciendo en 200µg/ml de ampicilina: Pd(2): *P. dendritiformis*:pBGT-1. Pd(3): *P. dendritiformis*:pBGT-1:cherry. PI(2): *P. lautus*:pBGT-1. PI(3): *P. lautus*:pBGT-1:cherry. Se señala con una línea el valor *p* para las comparaciones estadísticamente significativas.

La **dispersión** del consorcio de dos elementos con *P. dendritiformis* (Pd2) en este proyecto no tiene diferencias significativas con el presentado por Finkelshtein *et al.* (Pd\*) (Figura 10.7). Sin embargo, el consorcio de tres elementos con *P. dendritiformis* (Pd3) presenta un valor menor tanto para el consorcio con *P. dendritiformis* (Pd\*) como para *P. vortex* (Pv\*).

La cepa *P. lautus* utilizada en este proyecto tiene casi la misma **capacidad de dispersión y acarreo** que la cepa *P. vortex* utilizada por Finkelshtein, además de presentar patrones de crecimiento extremadamente parecidos. Los resultados obtenidos en este proyecto permiten determinar que *P. lautus* tiene una capacidad de dispersión y acarreo **elevadas**, a pesar de que en Finkelshtein *et al.* (2015) se cataloga como una especie con capacidad de acarreo **limitada** y sin formación de patrones.

## 10.2. Área y movilidad de las bacterias cargo

Para *E. coli* pBGT-1, a pesar de ser capaz de sobrevivir en todas las concentraciones de ampicilina, todos los consorcios con las cepas *Paenibacillus* le confieren un aumento en su **área** de colonización y **movilidad**, lo que consideramos una **ventaja**, pues incrementa la disponibilidad de recursos a su alrededor y consecuentemente el tamaño de su población (Figura 10.8).



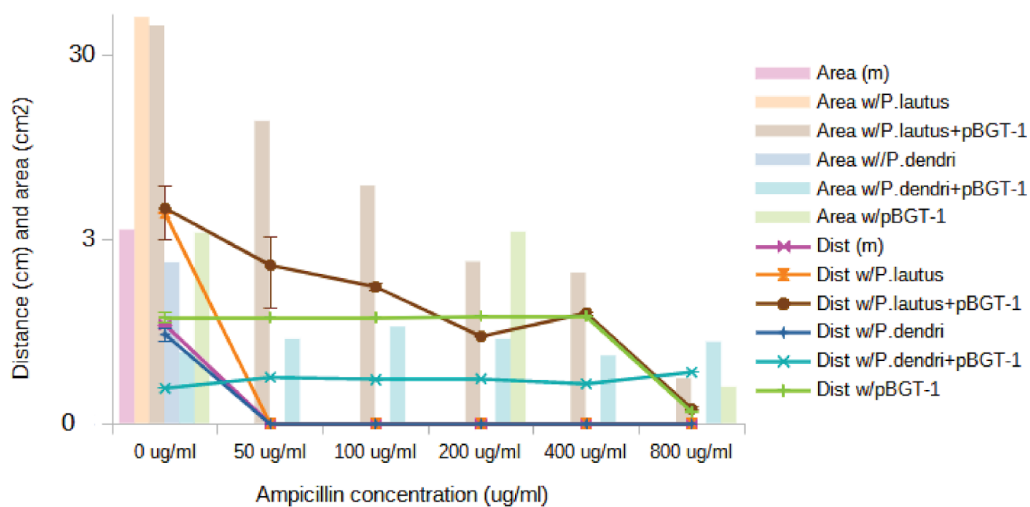
**Figura 10.8.** Comparación de las áreas de colonización y distancias del punto de inoculación al borde de la colonia (dispersión) de todos los tratamientos para *E. coli* pBGT-1. Monocultivo (m), consorcio de dos elementos con *P. lautus*, consorcio de tres elementos con *P. lautus*, consorcio de dos elementos con *P. dendritiformis*, consorcio de tres elementos con *P. dendritiformis* y consorcio con *cherry*.

El consorcio que mayor **ventaja** le confiere a pBGT-1, tanto en área de colonización como en movilidad, es el cocultivo con *P. lautus*, seguido del consorcio *P. lautus*:pBGT-1:*cherry*. Los **cocultivos** con *P. lautus* acarrean a pBGT-1 más allá de las distancias que pBGT-1 puede recorrer en monocultivo en todas las concentraciones de ampicilina y le confieren una **dispersión efectiva**.

Para los **cocultivos** con *P. dendritiformis* no sucede lo mismo, pues en 0µg/ml de ampicilina, para ambos consorcios (dos y tres elementos) pBGT-1 tiene valores de área y movilidad menores a los registrados para su monocultivo (Figura 10.8). Sin embargo, es a partir de los 100µg/ml de ampicilina que se refleja una ventaja de dispersión para pBGT-1 al desarrollarse en consorcio con *P. dendritiformis*, pues se vuelve indispensable para detoxificar el hábitat.

Si bien ambos consorcios aumentan la movilidad y área de expansión para pBGT-1, depende de las **características** del componente **transportador** el beneficio final para pBGT-1.

Para ***E. coli cherry*** ambos consorcios con ***P. dendritiformis*** le generan un área de crecimiento y movilidad **menores** a las alcanzadas en **monocultivo**, lo que puede estar indicando una interacción de **competencia**. A pesar de no ser activamente acarreada bajo ninguna circunstancia, para **cherry** cualquier crecimiento en los medios con **antibiótico** es ganancia, pues en monocultivo no es capaz de establecerse en dichas condiciones ([Figura 10.9](#)).



**Figura 10.9.** Comparación de las áreas de colonización y distancias del punto de inoculación al borde de la colonia (dispersión) de todos los tratamientos para ***E. coli cherry***. Monocultivo (m), consorcio de dos elementos con *P. lautus*, consorcio de tres elementos con *P. lautus*, consorcio de dos elementos con *P. dendritiformis*, consorcio de tres elementos con *P. dendritiformis* y consorcio con pBGT-1.

El cocultivo con ***P. lautus*** con dos y tres elementos es el que mayor ventaja le confiere a **cherry**. Ambos consorcios le permiten tener valores mayores para área a comparación de su valor en monocultivo. Sin embargo, en el **consorcio de tres elementos** su área se va reduciendo y a partir de los 200µg/ml de ampicilina, alcanza valores inferiores a los obtenidos en monocultivo. A pesar de esta situación, sus valores de área siguen siendo ventajosos pues en monocultivo no es capaz de establecer una colonia en esas concentraciones de ampicilina ([Figura 10.9](#)).

A pesar de quedar **rezagada** al **centro** de la colonia conforme aumenta el **antibiótico**, **cherry** se detecta en todas las concentraciones, lo que indica que **sobrevive** gracias a la producción de **betalactamasa** por pBGT-1. Para **cherry** es beneficioso estar en el consorcio

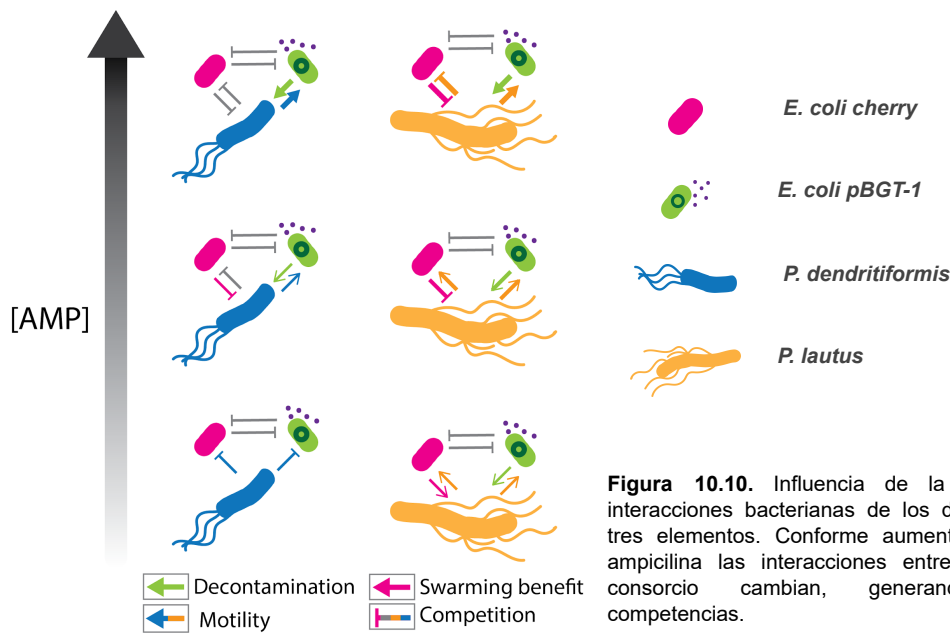
hasta los 400µg/ml de ampicilina, donde todavía tiene un área de colonización en la que puede mantenerse **latente** e incluso generar un **mecanismo** de **resistencia** al antibiótico, ya que la descontaminación con betalactamasa genera un **gradiente** de antibiótico en el medio. Sin embargo, a los 800µg/ml cherry queda completamente rezagada al centro, donde estaría destinada a morir por la falta de recursos (**dispersión inefectiva**).

La **supervivencia** de **cherry** en concentraciones de antibiótico en donde no puede crecer sola, aunado a la reducción de dispersión y área total en todos los consorcios de tres elementos permite catalogarla como una cepa **cheater**, pues hace uso del espacio detoxificado por la betalactamasa generando un efecto negativo sobre la comunidad; la reducción en área y dispersión.

**PBGT-1** y **cherry** tienen un **crecimiento** más **rápido** que ambas *Paenibacillus*, sin embargo, esta capacidad **no** les aseguró **colonizar** la caja de Petri ni **anular** el **crecimiento** de *P. dendritiformis* o *P. lautus* por **competencia**. Esta situación no se observó posiblemente por la mínima capacidad de dispersión de los *cargos* y la alta capacidad de **dispersión** de las *Paenibacillus*, que lograron establecer colonias en territorios disponibles a pesar de tener una menor densidad celular.

Finalmente, se resumen los cambios en las **interacciones** bacterianas de los consorcios de tres elementos conforme aumenta la concentración de ampicilina. El consorcio con *P. dendritiformis* inicia con interacciones negativas entre todas las cepas para finalmente generar una interacción mutualista con pBGT-1, excluyendo a cherry ([Figura 10.10](#)).

Su inicio con interacciones **negativas** se debe a la rápida expansión de *P. dendritiformis*, que rodea a los *cargos*, privándolos de recursos y espacio. Sin embargo, conforme aumenta la **ampicilina**, la interacción de competencia entre pBGT-1 y *P. dendritiformis* se modifica para convertirse en un **mutualismo facultativo** donde se intercambia detoxificación por movilidad. Esta interacción se vuelve más intensa conforme aumenta la concentración de ampicilina ([Figura 10.10](#)).



**Figura 10.10.** Influencia de la ampicilina sobre las interacciones bacterianas de los diferentes consorcios de tres elementos. Conforme aumenta la concentración de ampicilina las interacciones entre los componentes del consorcio cambian, generando mutualismos y competencias.

Por otro lado, los consorcios con *P. lautus* inician con interacciones **beneficiosas** entre los *cargos* y la bacteria transportadora, para finalizar con una interacción negativa con cherry y una interacción positiva cada vez más intensa con pBGT-1 (Figura 10.10). Como se describe previamente, el **swarming** de *P. lautus* se favorece cuando se desarrolla con los *cargos*, permitiendo que las tres especies alcancen valores de **dispersión** y **área** mayores a los generados en monocultivo.

Sin embargo, conforme aumenta la concentración de **ampicilina**, el acarreo de cherry comienza a ser negativo para *P. lautus*, hasta que en las concentraciones más altas se convierte en una desventaja mutua, y prospera únicamente el **mutualismo facultativo** con pBGT-1 (Figura 10.10).

Aquellos **mutualismos facultativos** seleccionados por la ampicilina podrían llegar a convertirse en obligados si la presión de antibiótico persiste por suficiente tiempo.

## Experimentos in silico

### 10.3. Funcionalidad del modelo computacional

Es importante mencionar que el modelo se realizó durante el tiempo de confinamiento por la pandemia, basado únicamente en algunos experimentos preliminares y en aquellos

publicados para el consorcio *E. coli* - *P. vortex*. Todas las simulaciones se realizaron antes de obtener los resultados experimentales presentados en este documento. La **comparación** de los resultados *in silico* con los resultados *in vitro* **no** se realizará en este proyecto pero se considera como trabajo a futuro. En este apartado se describe únicamente la **funcionalidad** del modelo para simular un sistema bacteriano de resistencia-motilidad que puede ser usado posteriormente para describir detalladamente al consorcio *E. coli* - *Paenibacillus sp.*

El modelo representa correctamente las generalidades de las **sustancias abióticas**. La modificación de los parámetros se refleja gráficamente y en tiempo real durante cada simulación. Las generalidades de cada **especie** bacteriana y las generalidades de su **interacción** en consorcio se logran visualizar. En la mayoría de las simulaciones se representa **correctamente** la interacción entre los agentes y su entorno. Son capaces de moverse y reproducirse, pueden consumir el recurso, son susceptibles al antibiótico y *E. coli* es capaz de producir betalactamasa.

El modelo es capaz de generar **fenómenos emergentes**, tales como los **anillos concéntricos**. Dicho resultado no está programado en el código, sino que es el resultado de la simulación de los diferentes parámetros al mismo tiempo. Por lo tanto el modelo confirma su naturaleza **estocástica**, generando anillos diferentes en cada simulación y acercándose a lo que sucede en sistemas bacterianos naturales.

Además, el modelo arroja **datos** comparables con datos experimentales, como las gráficas de **densidad celular** respecto al tiempo y la gráfica de **distancia** del centro al borde de la colonia (**dispersión**). Ambos tipos de datos se pueden obtener de los experimentos *in vitro* y compararse con los datos del modelo para ajustar algunos parámetros y que el modelo represente cada vez con mayor fidelidad al sistema natural.

Una vez realizadas las bases del modelo, a futuro será necesario adaptar los parámetros para que representen a los consorcios con *P. dendritiformis* y *P. lautus*, pues cada cepa presenta particularidades en su **dispersión** y **acarreo**. Si los resultados de la simulación corresponden a los que se encuentran en el mundo real, y el proceso mediante el cual los agentes interactúan con su ambiente corresponde al del mundo real, entonces se puede **validar** la representación, es decir, que el sistema de estudio está **correctamente capturado** por el **modelo**.

## 11. CONCLUSIONES

El proyecto permitió estudiar la **dinámica ecológica** del consorcio **resistencia-motilidad** *Escherichia coli* - *Paenibacillus sp.* con variables nuevas, como lo son el *cargo E. coli* con un plásmido de resistencia multicopia y el *cargo E. coli* susceptible en cinco diferentes concentraciones de ampicilina. Los consorcios con *P. dendritiformis* y *P. lautus* se establecieron exitosamente, permitiendo la supervivencia de cepas susceptibles y colonización en medios con ampicilina gracias a diferentes interacciones interespecíficas.

Se logró definir que la **concentración** de **antibiótico** en los consorcios influencia las **interacciones** entre las bacterias, convirtiéndose en el **principal factor** para determinar los **patrones** finales, el **área** de colonización, el tipo de **dispersión** y la **estructura** de la **comunidad**, por lo que la hipótesis puede ser confirmada. La concentración de ampicilina **selecciona** por ciertas **interacciones**, pues aquellas detectadas en medios sin antibiótico no prosperan en las concentraciones más elevadas de ampicilina. Además, es importante notar que dichas **interacciones** son dependientes de las condiciones ambientales, y por lo tanto, **cambiantes**.

El proyecto permite identificar a otro factor determinante para la estructura espacial de la comunidad: el **tipo** de **crecimiento** de la cepa **transportadora** y su **capacidad** para **sobrevivir** a cierta concentración de **antibiótico**. Si el componente transportador tiene **mecanismos** para **sobrevivir** al medio con **antibiótico**, como *P. dendritiformis* (esporulación, elongación), la interacción con especies resistentes puede facilitar el uso de dichos mecanismos sin que esto implique acarreo del *cargo* a dicha zona. Es decir, es posible aprovechar la presencia de la cepa resistente sólo para colocarse en los gradientes de antibiótico donde la bacteria hace uso de sus mecanismos de **tolerancia**.

La **interacción** entre *P. dendritiformis* y pBGT-1 es **robusta**, pues desde la mínima concentración de ampicilina cherry no es acarreada. Por otro lado, debido a la alta capacidad de acarreo de *P. lautus*, el consorcio es **susceptible** a invasión por **cheaters** en concentraciones bajas de ampicilina, aunque posteriormente suceda una segregación espacial.



El proyecto reafirma la **importancia** de estudiar la supervivencia bacteriana a **antibióticos** desde un enfoque de **comunidades**, donde las interacciones entre distintas especies generan fenómenos emergentes con una implicación directa en la eficacia de los antibióticos. Por otro lado, el proyecto genera aportaciones generales sobre la **ecología** de **comunidades** bacterianas, que en la naturaleza conviven con microorganismos productores de antibióticos. Por otro lado, es cada vez más frecuente el interés por estudiar la resistencia a antibióticos en los tratamientos médicos considerando la **diversidad** bacteriana como un factor determinante.

Por último, el **modelo computacional** realizado es una **base** para posteriores estudios del consorcio resistencia-motilidad con *Paenibacillus sp.*, pero también para estudiar otros consorcios bacterianos (y en última instancia **comunidades** bacterianas), pues es posible modificar los **parámetros** para replicar las dinámicas de sistemas vivos. Específicamente, este modelo podrá ser utilizado para estudiar la **dinámica** de **consorcios** o **comunidades** bacterianas con características específicas en presencia de **antibióticos**. A futuro se desea **validar** completamente el modelo mediante la comparación con los resultados experimentales.

## 12. GLOSARIO

<b>Antibiótico</b>	Sustancia natural o sintética que inhibe el crecimiento de las bacterias acabando con su vida o evitando su reproducción (Nature, 2020).
<b>Antibiótico bactericida</b>	Antibiótico que produce la muerte de las bacterias (Paredes y Roca, 2004).
<b>Antibiótico bacteriostático</b>	Antibiótico no letal que inhibe el crecimiento bacteriano (Brauner <i>et al.</i> , 2016; Paredes y Roca, 2004).
<b>Antibiótico betalactámico</b>	Antibióticos bactericidas que presentan en su estructura química una amida cíclica de cuatro miembros, llamada anillo betalactámico (2-azetidionona) (Fisher <i>et al.</i> , 2005).
<b>Biopelícula</b>	Consortio bacteriano adherido a una superficie y embebido en una matriz autosecretada de polisacáridos, proteínas y DNA (Hoiby <i>et al.</i> , 2010).
<b>Betalactamasas</b>	Familia de enzimas capaces de hidrolizar compuestos químicos que contienen un anillo betalactámico (Bush, 2018).
<b>Cargo</b>	Cargamento; agente trasladado por el otro agente del consorcio.
<b>Cheater</b>	Individuos no cooperativos de una comunidad bacteriana que se benefician de la producción de un bien público sin generar un bien público a cambio (Dunny <i>et al.</i> , 2008; Smith y Schuster, 2019).
<b>Comunidad microbiana</b>	Colección de microorganismos en la cual coexisten diferentes fenotipos y/o genotipos (Vega y Gore, 2014).
<b>Consortio bacteriano</b>	Asociación de dos o más bacterias (cultivadas o en unión natural), que se comportan como unidad y presentan una interacción simbiótica-mutualista, mediada por una interdependencia metabólica en donde ninguno de los componentes es dominante (Kull, 2010; Madigan <i>et al.</i> 2015; Popa, 2004).
<b>Cross-feeding</b>	Utilización de un producto metabólico de una bacteria para la nutrición de otra (Smith, et al., 2019).
<b>Dispersión</b>	Movimiento de los organismos a través del espacio y tiempo (Custer <i>et al.</i> , 2022).
<b>Fitness</b>	Éxito reproductivo de un organismo que refleja qué tan bien está adaptado a su ambiente (Hermsen y Hwa, 2010; Sedeer el-Showk, 2014).
<b>Heterogeneidad espacial</b>	Variabilidad espacio-temporal en las condiciones ambientales (Shade <i>et al.</i> , 2008).
<b>MDK</b>	Siglas en inglés: Minimum Duration for Killing. Duración mínima para la muerte. Es el tiempo necesario de exposición al antibiótico para llevar a una población de microorganismos a la muerte (Brauner <i>et al.</i> , 2016; Vijay <i>et al.</i> , 2021).
<b>MIC</b>	Siglas en inglés: Minimal Inhibitory Concentration. Concentración mínima inhibitoria. Es la concentración mínima necesaria de una sustancia para inhibir completamente el crecimiento de un microorganismo (Brauner <i>et al.</i> , 2016; Madigan <i>et al.</i> , 2015).

<b>Modelación</b>	Representación de un sistema que consiste en abstraer sus características fundamentales mediante suposiciones y algoritmos, para un propósito específico (Baggio, 2017; Railsback y Grimm, 2019).
<b>Modelo computacional</b>	Abstracción que representa un sistema real mediante el uso de la computación para explorar distintas hipótesis, suposiciones y parámetros mediante simulaciones (Baggio, 2017; NIH, 2020; Railsback y Grimm, 2005, 2019)
<b>Modelo de agentes individuales (IBM)</b>	Siglas en inglés: Individual Based Model. Es un tipo de modelo computacional que permite modelar un sistema como una colección de elementos autónomos, llamados agentes, y las interacciones entre ellos (Bonabeau, 2002; Deangelis <i>et al.</i> , 2014).
<b>Notebook</b>	Entorno interactivo donde se escribe código de programación. Además de permitir la escritura también permite su ejecución (Colab, 2020).
<b>PBP</b>	Siglas en inglés: Penicillin Binding Protein. Proteína de unión a la penicilina o proteína fijadora de penicilina. Transpeptidasa bacteriana inhibida por la penicilina (Katzung <i>et al.</i> , 2012; Spratt, 1983).
<b>Plásmido</b>	Elementos genéticos extracromosomales transferibles horizontalmente y capaces de autorreplicación (Bush, 2018; Carattoli, 2013).
<b>Proceso determinista</b>	Proceso cuyo futuro puede determinarse completamente al conocer su estado actual y pasado. (Anderson, 2011).
<b>Proceso estocástico</b>	Proceso azaroso que evoluciona en el tiempo y cuyo resultado final no se puede determinar sólo conociendo los parámetros iniciales (Anderson, 2011).
<b>Resistencia a antibióticos</b>	Habilidad heredable de los microorganismos que les permite aumentar su MIC ante una clase específica de antibióticos. La MIC de una cepa resistente es mayor a la de la cepa ancestral (Brauner <i>et al.</i> , 2016).
<b>Sistema Complejo Adaptativo (CAS)</b>	Siglas en inglés: Complex Adaptive Systems. Sistema cuyos elementos interactúan en forma interdependiente, de forma no lineal, difícilmente predecibles, con autoorganización y estructuras emergentes, con cadenas de retroalimentación e imposibles de analizar si se desglosan a sus partes (subcomponentes) (Baggio, 2017).
<b>Swarming</b>	Movimiento colectivo coordinado de bacterias alineadas por su eje longitudinal sobre una superficie sólida (Ben-Jacob <i>et al.</i> , 1998, 2016; Harshey, 2003; Turner <i>et al.</i> , 2010; Zeigler, 2013).
<b>Tolerancia a antibióticos</b>	Habilidad de los microorganismos que les permite sobrevivir a una exposición pasajera de antibióticos sin modificar su MIC, pero aumentando su <u>MDK</u> . No es un mecanismo específico para una clase de antibióticos; puede ser un mecanismo eficaz ante distintos tipos de antibióticos. La tolerancia sólo se estudia en antibióticos bactericidas, dado que se espera que todas las bacterias sobrevivan a una exposición pasajera de <u>antibióticos bacteriostáticos</u> (Brauner <i>et al.</i> , 2016).

### 13. ANEXOS

Anexo 1 <sup>4</sup> . Monocultivo <i>E. coli</i> pBGT-1						
Horas incubación \ [AMP]	0µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
0						
24						
48						
72						
96						

Anexo 2. Medidas del crecimiento de <i>E. coli</i> pBGT-1 (96h)				
[AMP]	Área total	Área fluorescente	Área de segregación	Radio promedio*
0µg/ml	3.66 cm <sup>2</sup>	2.93 cm <sup>2</sup>	0.72 cm <sup>2</sup>	0.94 cm
50µg/ml	3.81 cm <sup>2</sup>	3.08 cm <sup>2</sup>	0.72 cm <sup>2</sup>	0.99 cm
100µg/ml	4.01 cm <sup>2</sup>	3.24 cm <sup>2</sup>	0.77 cm <sup>2</sup>	1.08 cm
200µg/ml	2.78 cm <sup>2</sup>	2.35 cm <sup>2</sup>	0.43 cm <sup>2</sup>	0.86 cm
400µg/ml	2.30 cm <sup>2</sup>	2.02 cm <sup>2</sup>	0.28 cm <sup>2</sup>	0.86 cm
800µg/ml	2.12 cm <sup>2</sup>	1.75 cm <sup>2</sup>	0.36 cm <sup>2</sup>	0.72 cm

\*Debido a la morfología irregular de la colonia el radio se promedió a partir de cuatro medidas diferentes.

<sup>4</sup> Anexos 1, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 15, 16 y 18 presentan imágenes en negativo.

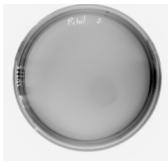
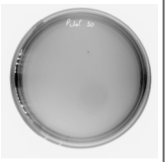
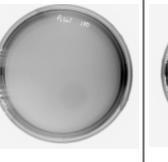
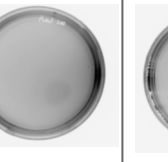
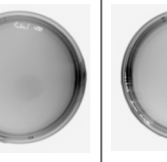

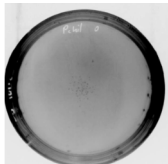
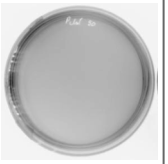
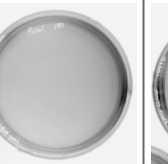
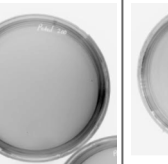



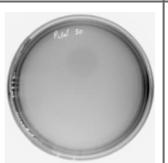
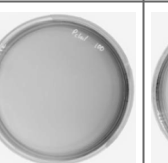
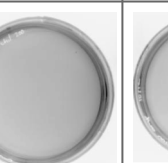
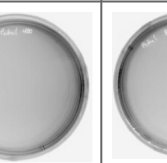


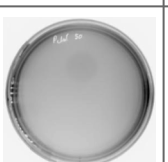
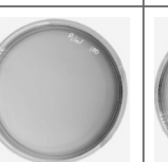
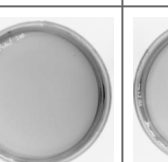
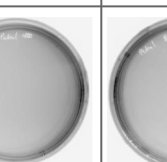



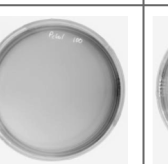

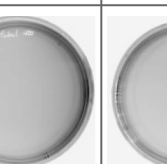

<b>Anexo 3. Monocultivo <i>E. coli</i> cherry</b>						
Horas incubación \ [AMP]	0µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
0						
24						
48						
72						
96						

<b>Anexo 4. Medidas del crecimiento de <i>E. coli</i> cherry (96h)</b>		
[AMP]	Área total de colonia	Radio promedio*
0µg/ml	3.37 cm <sup>2</sup>	1.03 cm
El crecimiento a partir de 50µg/ml es nulo, por lo que no se considera en esta tabla. *El radio se promedió a partir de cuatro medidas diferentes.		

<b>Anexo 5. Monocultivo <i>P. dendritiformis</i></b>						
Horas incubación \ [AMP]	0µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
0						
24						
48						
72						
96						

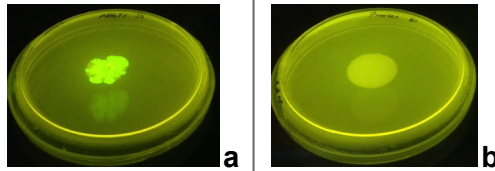
<b>Anexo 6. Medidas del crecimiento de <i>P. dendritiformis</i> (96h)</b>								
				Distancia del punto de inoculación al anillo				
[AMP]	Área total	Área círculo interior	Radio promedio*	Anillo 1	Anillo 2	Anillo 3	Anillo 4	Anillo 5
0µg/ml	74.63 cm <sup>2</sup>	0.94 cm <sup>2</sup>	4.78 cm	0.54 cm	1.36 cm	2.01 cm	2.46 cm	4.78 cm
50µg/ml	5.7 cm <sup>2</sup>	-	1.29 cm	-	-	-	-	-

El crecimiento a partir de 100µg/ml es nulo, por lo que dicha concentración y posteriores no se consideran. \*El radio se promedió a partir de cuatro medidas diferentes.

<b>Anexo 7. Monocultivo <i>P. lautus</i></b>						
Horas incubación \ [AMP]	0µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
0						
24						
48						
72						
96						

<b>Anexo 8. Medidas del crecimiento de <i>P. lautus</i> (96h)</b>		
Concentración de AMP	Área total de colonia	Radio promedio*
0µg/ml	3.235 cm <sup>2</sup>	1.59 cm
El crecimiento a partir de 50µg/ml es nulo, por lo que dicha concentración y posteriores no se consideran. *El radio se promedió a partir de cuatro medidas diferentes.		

**Anexo 9. Comparación con fluorescencia del crecimiento entre *E. coli* pBGT-1 y *P. dendritiformis***



*E. coli* pBGT-1 fluoresce en verde en medio con ampicilina (a) y *P. dendritiformis* crece en 50µg/ml de ampicilina sin fluorescencia (b).

**Anexo 10. Consorcio de dos elementos *P. dendritiformis* : *E. coli* pBGT-1**

Horas incubación \ [AMP]	0µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
0						
24						
48						
72						
96						



<b>Anexo 11. Consorcio de dos elementos <i>P. dendritiformis</i> : <i>E. coli</i> cherry.</b>						
Horas incubación \ [AMP]	0µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
0						
24						
48						
72						
96						

<b>Anexo 12. Medidas del crecimiento del consorcio de dos elementos con <i>P. dendritiformis</i> (96h)</b>					
<i>P. dendritiformis</i> : <i>E. coli</i> pBGT-1					
[AMP]	Área total	Área f <sup>†</sup>	Área sin f <sup>†</sup>	Radio prom* total	Radio prom* f <sup>†</sup>
0µg/ml	63.864 cm <sup>2</sup>	1.422 cm <sup>2</sup>	62.442 cm <sup>2</sup>	4.506 cm	0.731 cm
50µg/ml	22.534 cm <sup>2</sup>	4.419 cm <sup>2</sup>	18.115 cm <sup>2</sup>	2.663 cm	1.215 cm
100µg/ml	15.573 cm <sup>2</sup>	10.402 cm <sup>2</sup>	5.171 cm <sup>2</sup>	2.247 cm	1.696 cm
200µg/ml	16.002 cm <sup>2</sup>	11.894 cm <sup>2</sup>	4.108 cm <sup>2</sup>	2.273 cm	1.911 cm
400µg/ml	15.104 cm <sup>2</sup>	8.922 cm <sup>2</sup>	6.182 cm <sup>2</sup>	2.142 cm	1.703 cm
800µg/ml	11.622 cm <sup>2</sup>	7.008 cm <sup>2</sup>	4.614 cm <sup>2</sup>	1.921 cm	1.522 cm
<i>P. dendritiformis</i> : <i>E. coli</i> cherry					
0µg/ml	39.151 cm <sup>2</sup>	2.242 cm <sup>2</sup>	36.909 cm <sup>2</sup>	3.55325 cm	0.917 cm

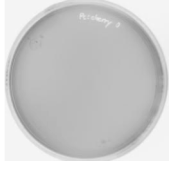

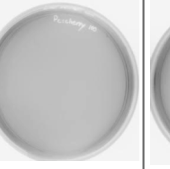
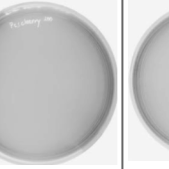
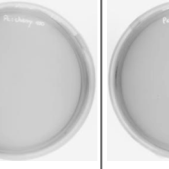

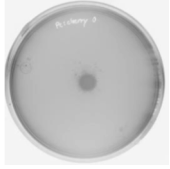

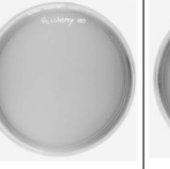
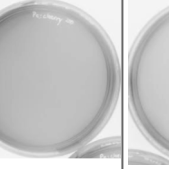
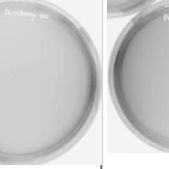

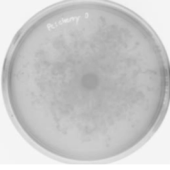

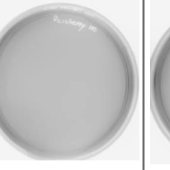
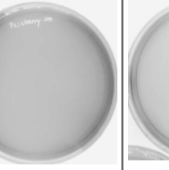
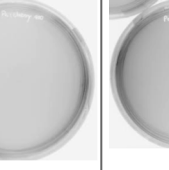

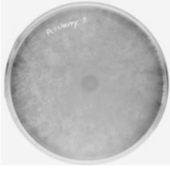

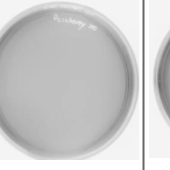
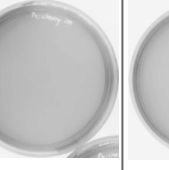
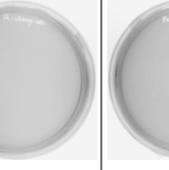

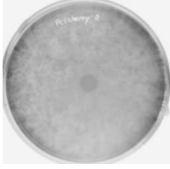

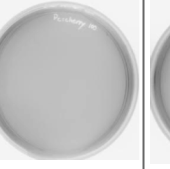
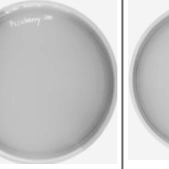
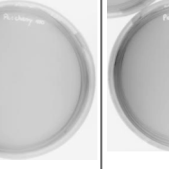

\*Prom: promedio. Debido a la morfología irregular de la colonia el radio se promedió a partir de cuatro medidas diferentes.  
<sup>†</sup>La letra f hace referencia a "fluorescente/fluorescencia".

<b>Anexo 13. Consorcio de tres elementos <i>P. dendritiformis</i> : pBGT-1 : cherry</b>						
Horas incubación \ [AMP]	0µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
0						
24						
48						
72						
96						

<b>Anexo 14. Medidas del crecimiento del consorcio de tres elementos con <i>P. dendritiformis</i> (96h)</b>							
<i>P. dendritiformis</i> : pBGT-1 : cherry							
[AMP]	Área total	Área f <sup>+</sup> verde	Área f <sup>+</sup> roja	Área sin f <sup>+</sup>	Radio prom* total	Radio prom* f <sup>+</sup> verde	Radio prom* f <sup>+</sup> rojo
0µg/ml	57.237 cm <sup>2</sup>	2.483 cm <sup>2</sup>	0.726 cm <sup>2</sup>	54.654 cm <sup>2</sup>	4.274 cm	0.816 cm	0.467 cm
50µg/ml	14.049 cm <sup>2</sup>	1.055 cm <sup>2</sup>	0.858 cm <sup>2</sup>	12.886 cm <sup>2</sup>	1.992 cm	0.829 cm	0.535 cm
100µg/ml	8.504 cm <sup>2</sup>	3.693 cm <sup>2</sup>	1.003 cm <sup>2</sup>	4.808 cm <sup>2</sup>	1.568 cm	1.167 cm	0.520 cm
200µg/ml	9.53 cm <sup>2</sup>	7.886 cm <sup>2</sup>	0.859 cm <sup>2</sup>	1.644 cm <sup>2</sup>	1.769 cm	1.653 cm	0.525 cm
400µg/ml	8.143 cm <sup>2</sup>	5.892 cm <sup>2</sup>	0.698 cm <sup>2</sup>	2.095 cm <sup>2</sup>	1.617 cm	1.450 cm	0.493 cm
800µg/ml	6.748 cm <sup>2</sup>	3.521 cm <sup>2</sup>	0.83 cm <sup>2</sup>	3.097 cm <sup>2</sup>	1.412 cm	1.135 cm	0.572 cm

\*Prom: promedio. Debido a la morfología irregular de la colonia el radio se promedió a partir de cuatro medidas diferentes.  
 †La letra f hace referencia a "fluorescente/fluorescencia".

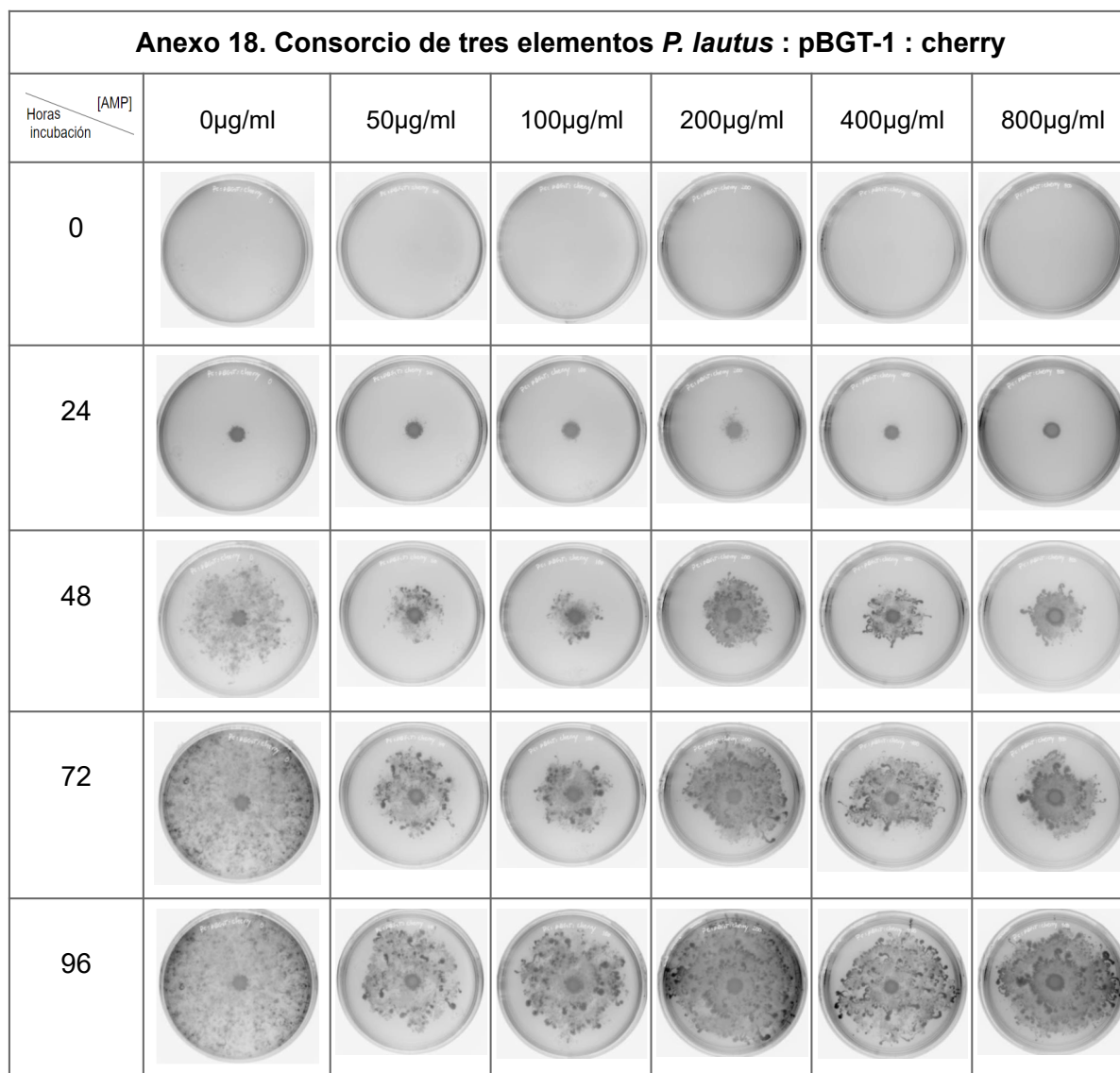
**Anexo 15. Consorcio de dos elementos *P. lautus* : *E. coli* cherry.**

Horas incubación \ [AMP]	0µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
0						
24						
48						
72						
96						

<b>Anexo 16. Consorcio de dos elementos <i>P. lautus</i> : <i>E. coli</i> pBGT-1.</b>						
Horas incubación \ [AMP]	0µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	200µg/ml	400µg/ml	800µg/ml
0						
24						
48						
72						
96						

<b>Anexo 17. Medidas del crecimiento del consorcio de dos elementos con <i>P. lautus</i> (96h)</b>					
<b><i>P. lautus</i> : <i>E. coli</i> pBGT-1</b>					
[AMP]	Área total	Área f <sup>†</sup>	Área sin f <sup>†</sup>	Radio prom* total	Radio prom* f <sup>†</sup>
0µg/ml	44.085 cm <sup>2</sup>	29.557 cm <sup>2</sup>	14.528 cm <sup>2</sup>	4.154 cm	3.709 cm
50µg/ml	28.407 cm <sup>2</sup>	19.605 cm <sup>2</sup>	8.802 cm <sup>2</sup>	3.762 cm	3.415 cm
100µg/ml	39.408 cm <sup>2</sup>	33.162 cm <sup>2</sup>	6.246 cm <sup>2</sup>	3.827 cm	3.77 cm
200µg/ml	48.186 cm <sup>2</sup>	35.219 cm <sup>2</sup>	12.967 cm <sup>2</sup>	4.449 cm	4.229 cm
400µg/ml	49.167 cm <sup>2</sup>	32.095 cm <sup>2</sup>	17.072 cm <sup>2</sup>	4.107 cm	3.969 cm
800µg/ml	49.426 cm <sup>2</sup>	39.695 cm <sup>2</sup>	9.731 cm <sup>2</sup>	3.966 cm	3.962 cm
<b><i>P. lautus</i> : <i>E. coli</i> cherry</b>					
0µg/ml	54.943 cm <sup>2</sup>	47.943 cm <sup>2</sup>	7 cm <sup>2</sup>	4.357 cm	4.15725 cm

\*Debido a la morfología irregular de la colonia el radio se promedió a partir de cuatro medidas diferentes. †La letra f hace referencia a "fluorescente/fluorescencia".



**Anexo 19. Medidas del crecimiento del consorcio de tres elementos con *P. lautus* (96h)**

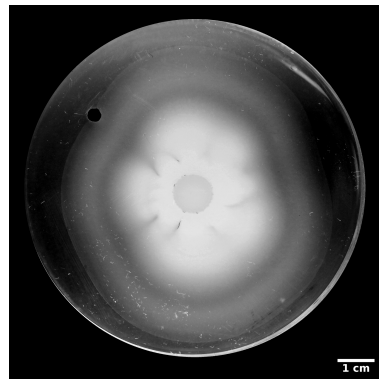
*P. lautus* : pBGT-1 : cherry

[AMP]	Área total	Área f <sup>t</sup> verde	Área f <sup>t</sup> roja	Área sin f <sup>t</sup>	Radio prom* total	Radio prom* f <sup>t</sup> verde	Radio prom* f <sup>t</sup> rojo
0µg/ml	65.492 cm <sup>2</sup>	25.21 cm <sup>2</sup>	43.134 cm <sup>2</sup>	0.775 cm <sup>2</sup>	5.204 cm	4.715 cm	4.441 cm
50µg/ml	30.732 cm <sup>2</sup>	9.27 cm <sup>2</sup>	13.083 cm <sup>2</sup>	12.199 cm <sup>2</sup>	3.516 cm	3.216 cm	2.173 cm
100µg/ml	27.222 cm <sup>2</sup>	11.847 cm <sup>2</sup>	5.846 cm <sup>2</sup>	10.659 cm <sup>2</sup>	3.605 cm	3.518 cm	1.657 cm
200µg/ml	45.028 cm <sup>2</sup>	26.956 cm <sup>2</sup>	2.258 cm <sup>2</sup>	16.814 cm <sup>2</sup>	4.063 cm	3.966 cm	0.892 cm
400µg/ml	33.902 cm <sup>2</sup>	16.537 cm <sup>2</sup>	1.97 cm <sup>2</sup>	16.395 cm <sup>2</sup>	3.671 cm	3.649 cm	1.196 cm
800µg/ml	41.119 cm <sup>2</sup>	23.054 cm <sup>2</sup>	0.527 cm <sup>2</sup>	7.692 cm <sup>2</sup>	3.700 cm	3.442 cm	0.362 cm

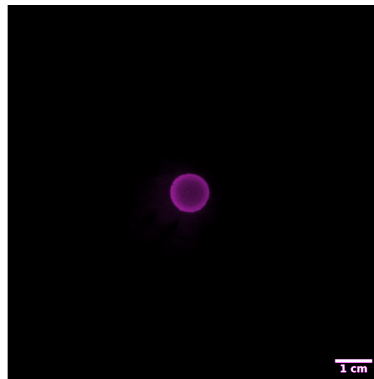
\*Debido a la morfología irregular de la colonia el radio se promedió a partir de cuatro medidas diferentes. †La letra f hace referencia a "fluorescente/fluorescencia".

**Anexo 20. Distribución espacial (96h) de las cepas en consorcios de dos y tres elementos (*P. dendritiformis*)**

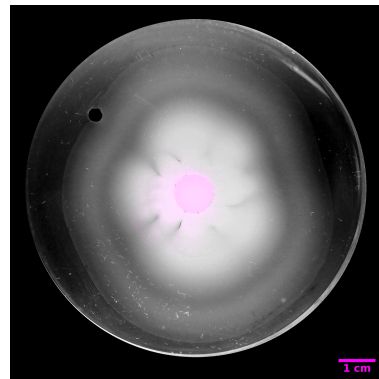
*Consortrios de dos elementos con P. dendritiformis*



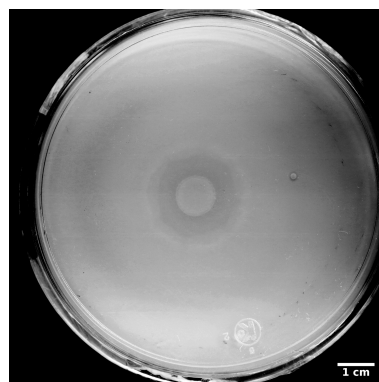
*P. dendritiformis:cherry* [0µg/ml]



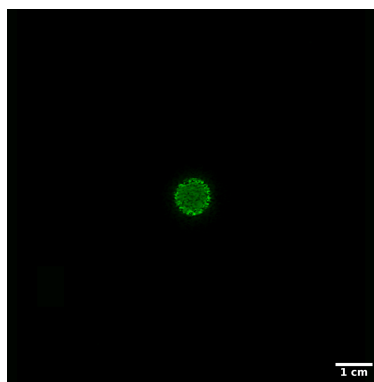
cherry [0µg/ml]



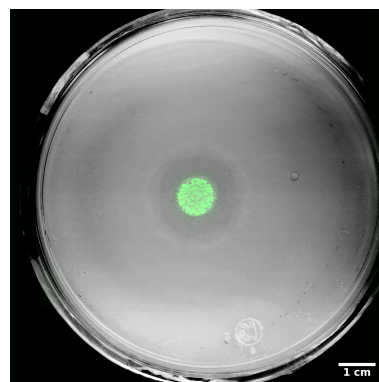
consorcio con fluorescencia [0µg/ml]



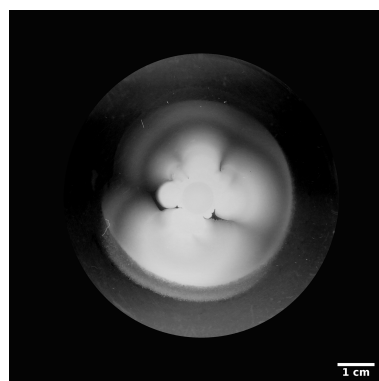
*P. dendritiformis:pBGT-1* [0µg/ml]



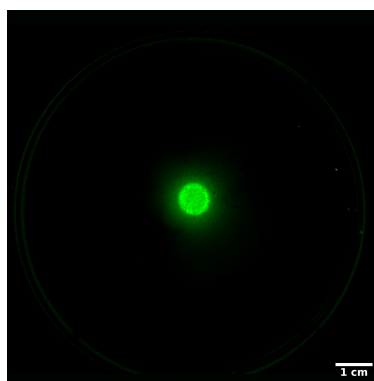
pBGT-1 [0µg/ml]



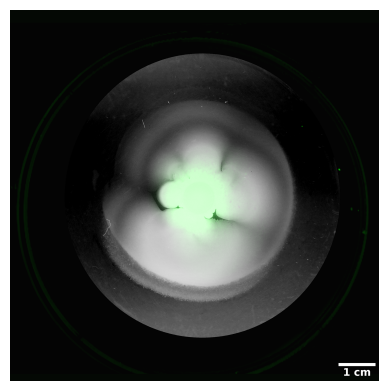
consorcio con fluorescencia [0µg/ml]



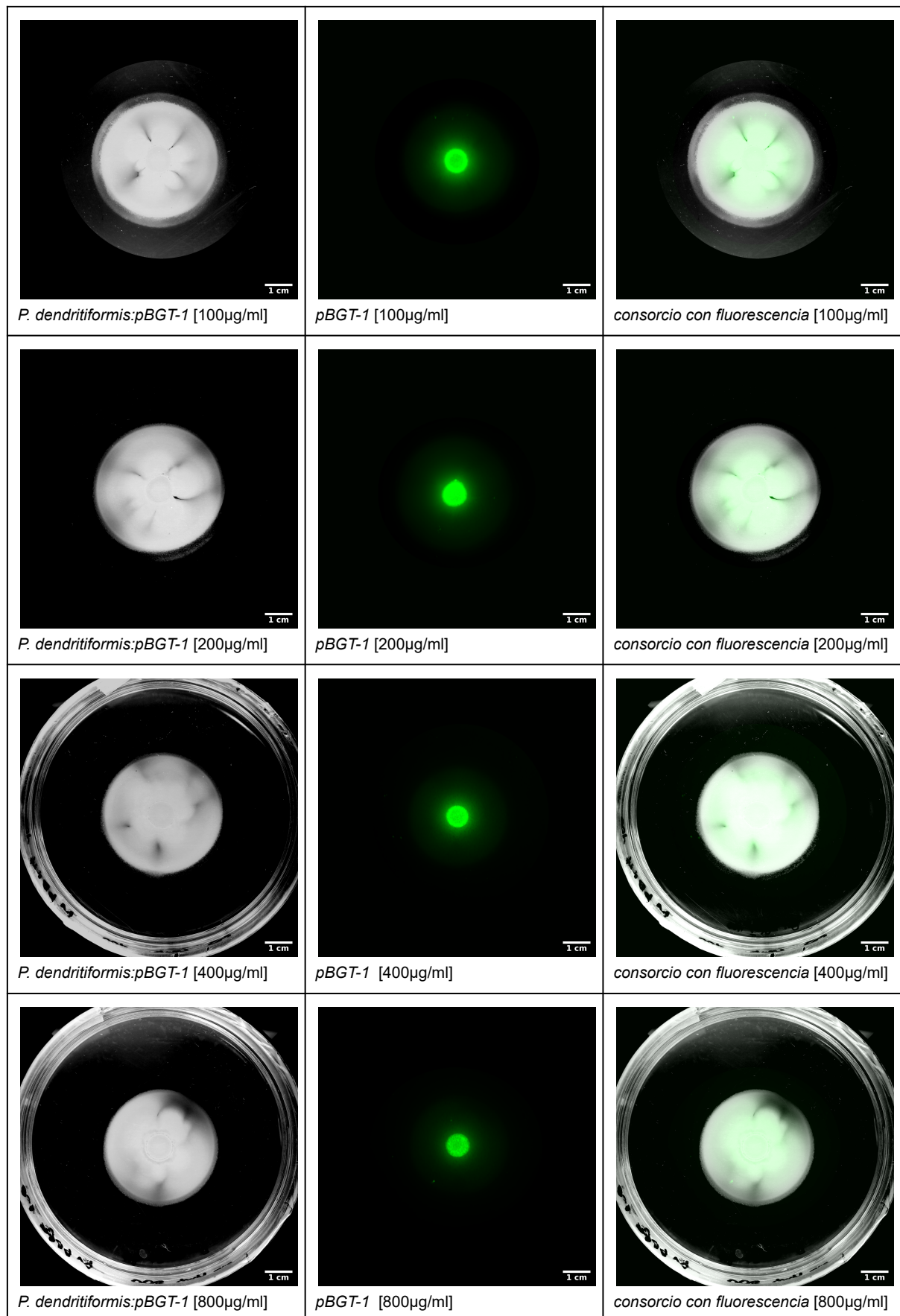
*P. dendritiformis:pBGT-1* [50µg/ml]



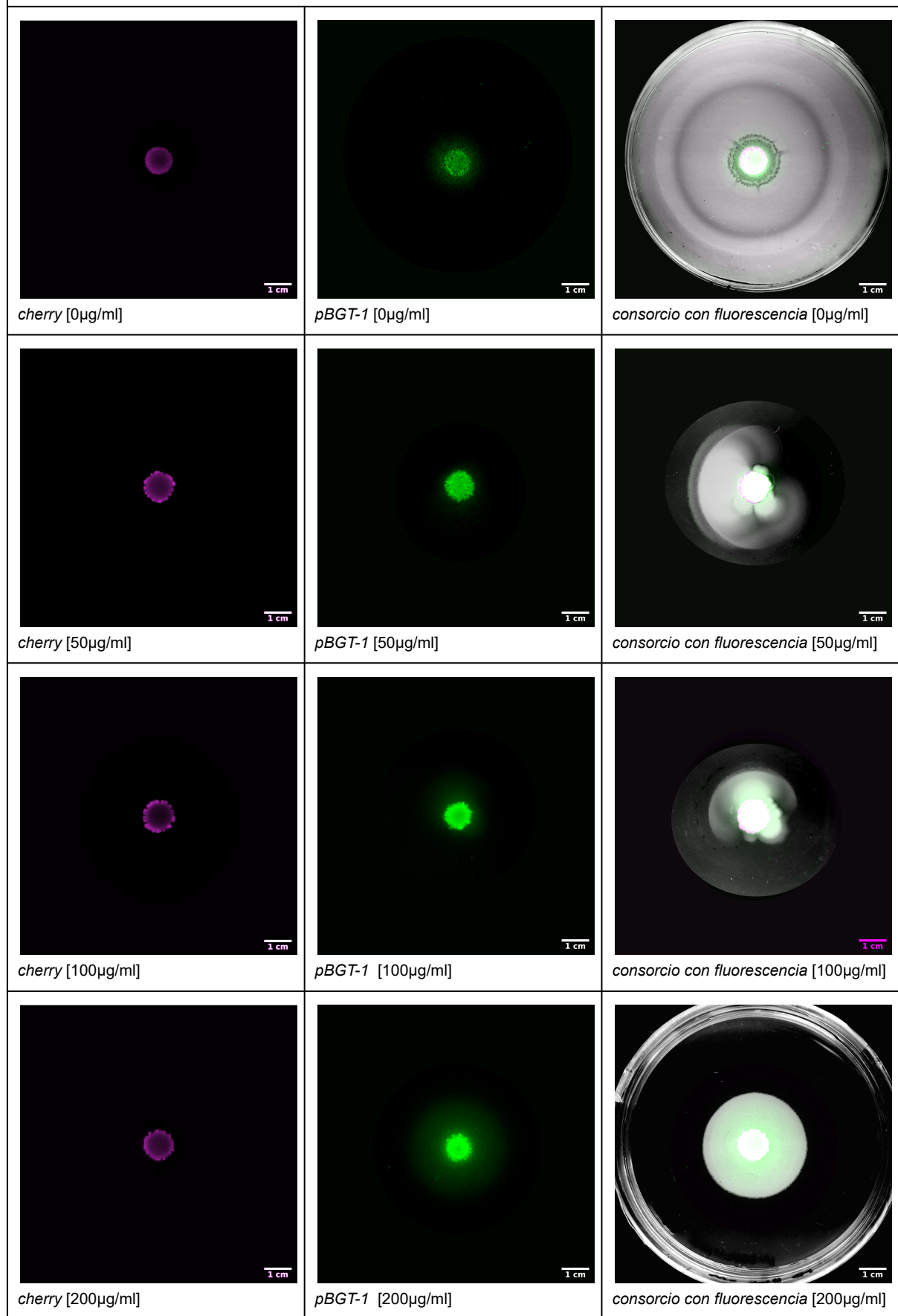
pBGT-1 [50µg/ml]



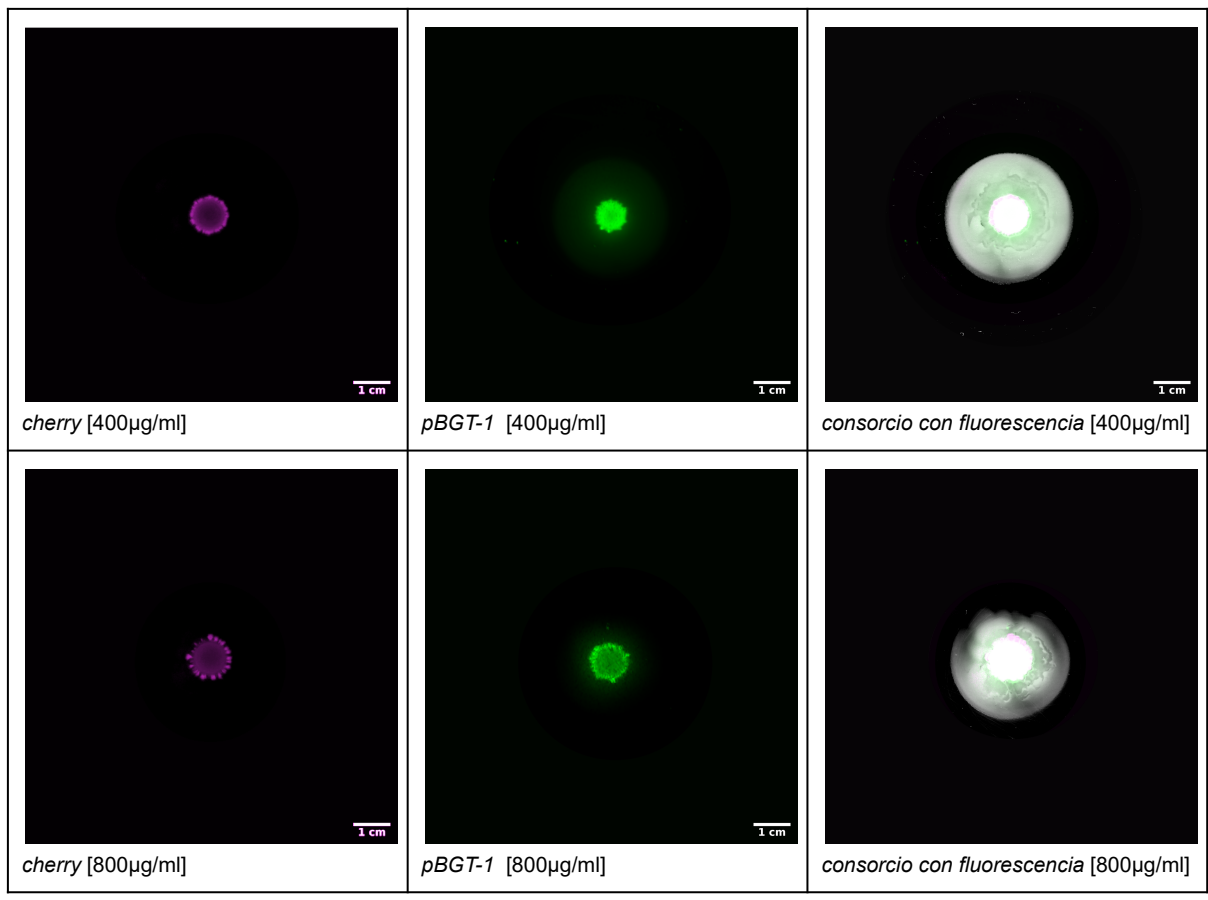
consorcio con fluorescencia [50µg/ml]



*Consortios de tres elementos con P. dendritiformis*

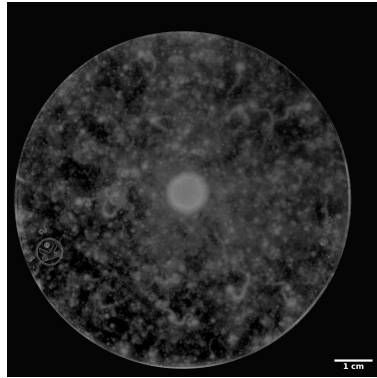




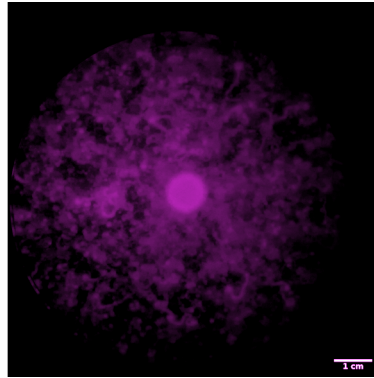


**Anexo 21. Distribución espacial (96h) de las cepas en consorcios de dos y tres elementos (*P. lautus*)**

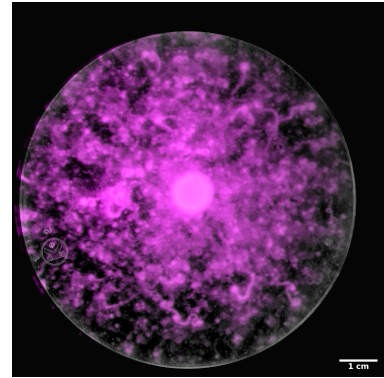
*Consortios de dos elementos con P. lautus*



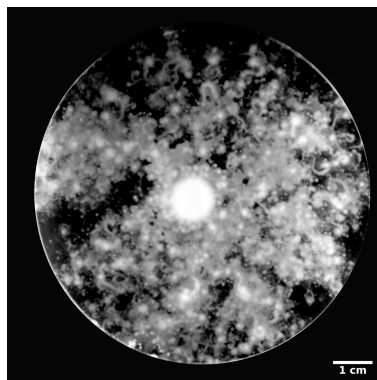
*P. lautus:cherry* [0µg/ml]



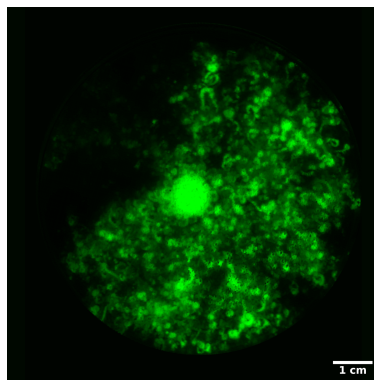
*cherry* [0µg/ml]



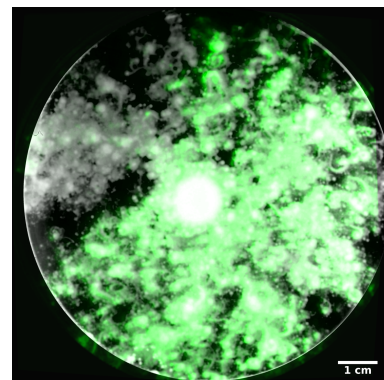
*consorcio con fluorescencia* [0µg/ml]



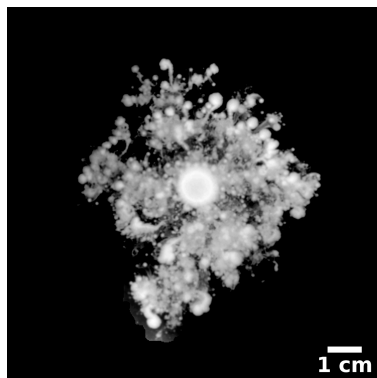
*P. lautus:pBGT-1* [0µg/ml]



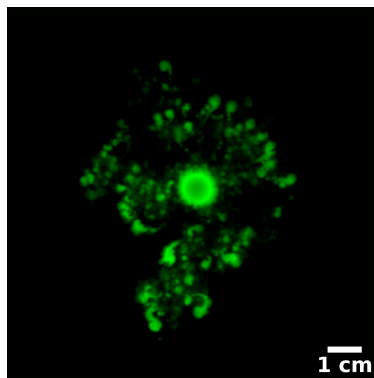
*pBGT-1* [0µg/ml]



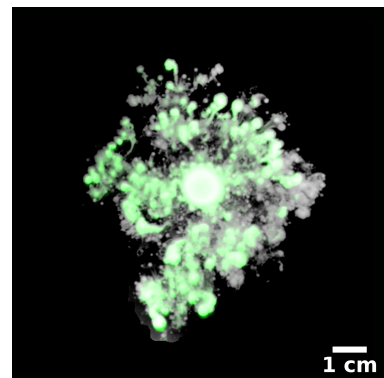
*consorcio con fluorescencia* [0µg/ml]



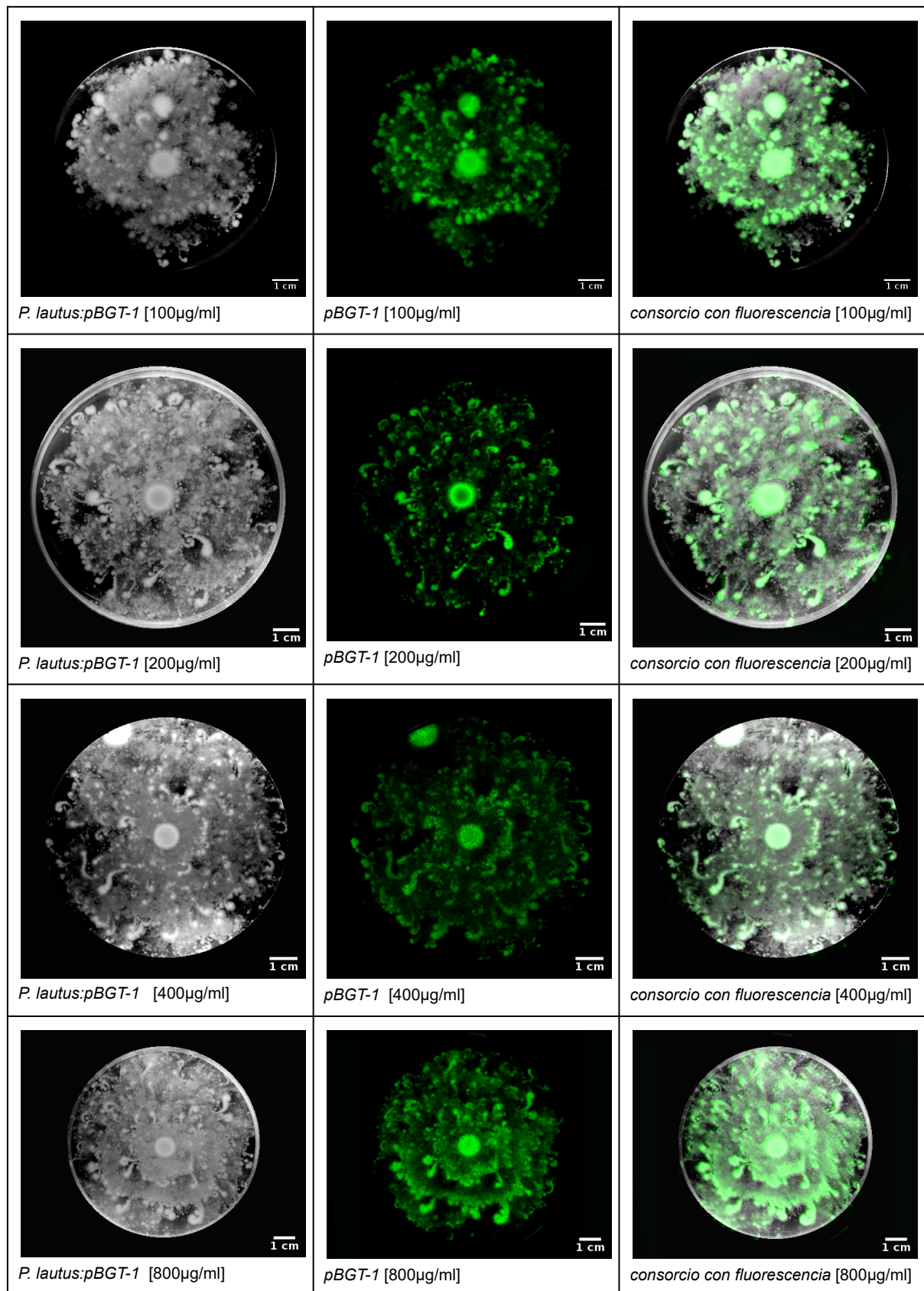
*P. lautus:pBGT-1* [50µg/ml]



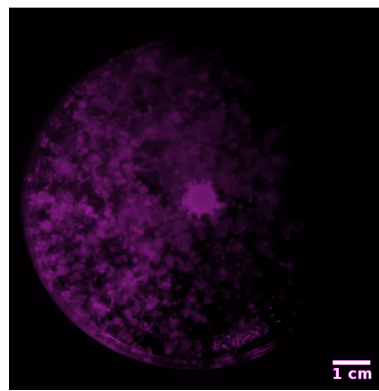
*pBGT-1* [50µg/ml]



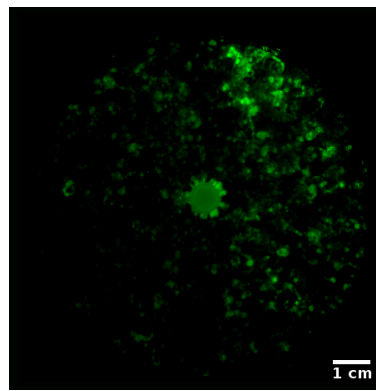
*consorcio con fluorescencia* [50µg/ml]



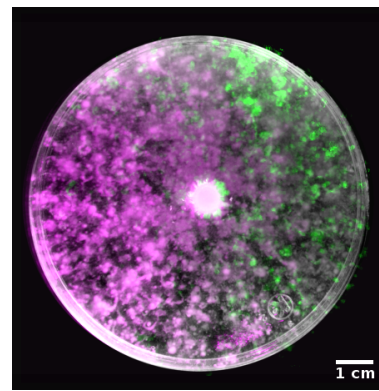
Consortios de tres elementos con *P. lautus*



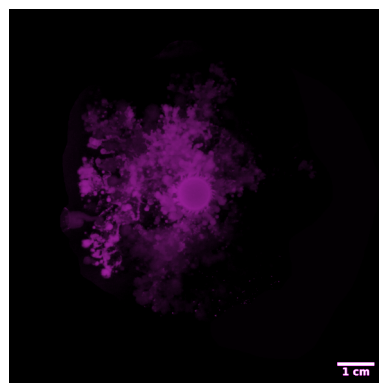
cherry [0µg/ml]



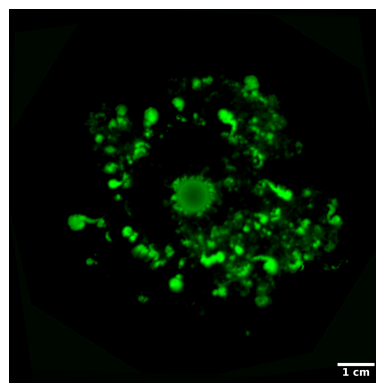
pBGT-1 [0µg/ml]



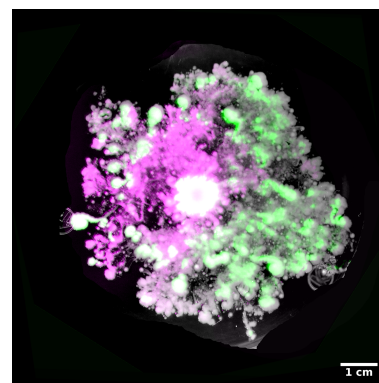
consorcio con fluorescencia [0µg/ml]



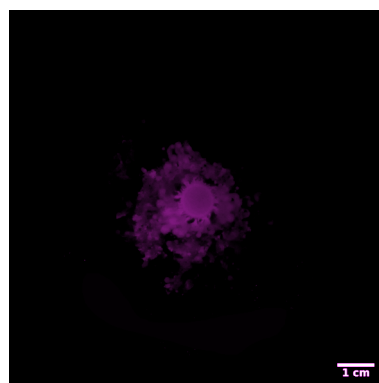
cherry [50µg/ml]



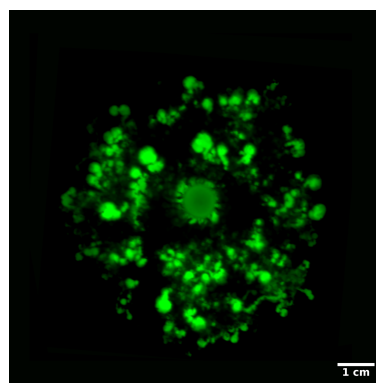
pBGT-1 [50µg/ml]



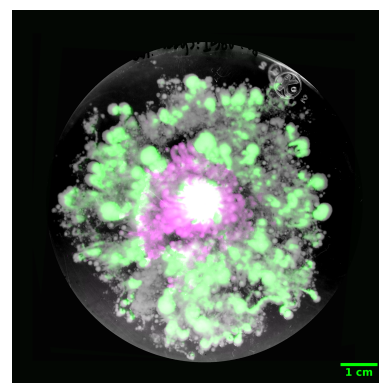
consorcio con fluorescencia [50µg/ml]



cherry [100µg/ml]



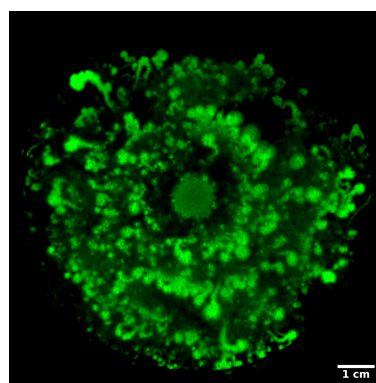
pBGT-1 [100µg/ml]



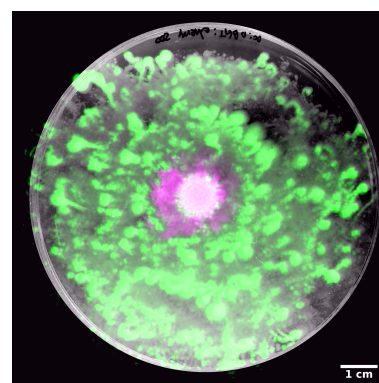
consorcio con fluorescencia [100µg/ml]



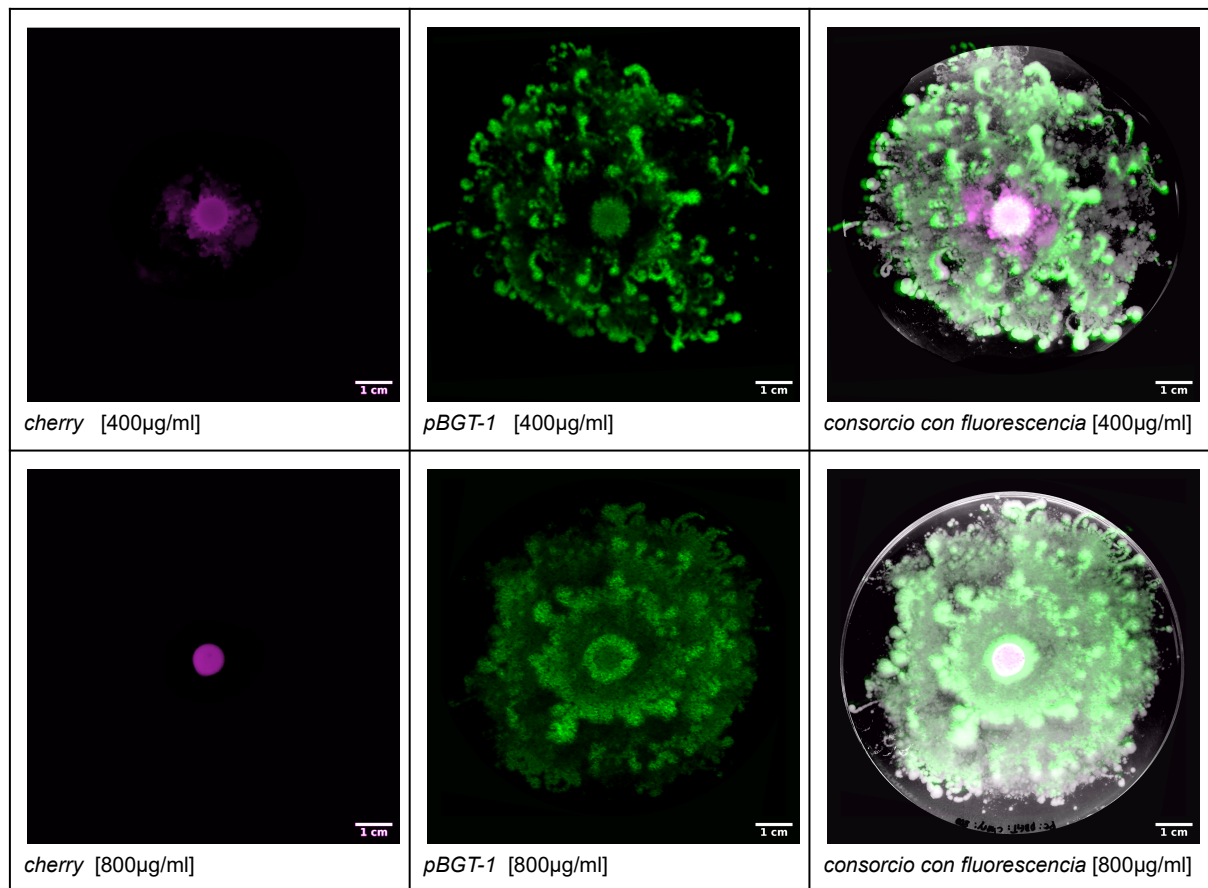
cherry [200µg/ml]



pBGT-1 [200µg/ml]



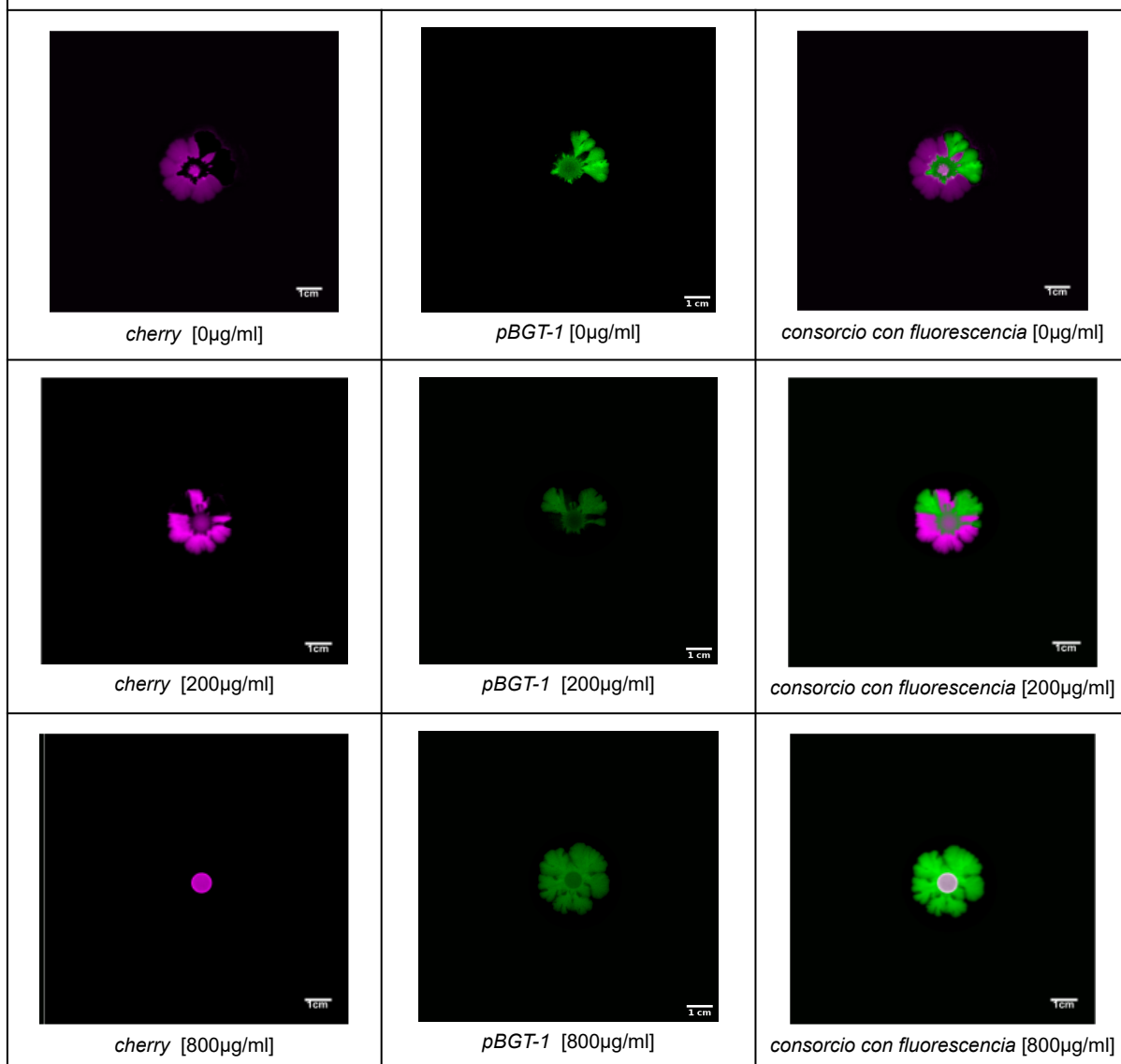
consorcio con fluorescencia [200µg/ml]



### Anexo 22. Enlaces a todos los videos de los experimentos

- *P. dendritiformis* monocultivo: <https://www.youtube.com/watch?v=t8aW30oBc2E>
- *P. lautus* monocultivo: <https://youtu.be/dRQB9qhqJHk>
- *P. dendritiformis* consorcios de dos elementos: <https://youtu.be/BDtCvdC-ukk>
- *P. dendritiformis* consorcios de tres elementos: [https://youtu.be/DZz\\_3wwUto](https://youtu.be/DZz_3wwUto)
- *P. lautus* consorcios de dos elementos: <https://youtu.be/LtMViiUgN2k>
- *P. lautus* consorcios de tres elementos: <https://youtu.be/xhACIJeadzs>
- Simulaciones del modelo computacional: [https://youtu.be/pK5Yq-mx\\_oA](https://youtu.be/pK5Yq-mx_oA)

**Anexo 23. Distribución espacial del consorcio *E. coli* pBGT-1 : *E. coli* cherry (96h)**



## Anexo 24. Metodología para edición de fotos y videos en ImageJ

### Imágenes del BAFFLE:

1. Se descargó el programa ImageJ Fiji versión 2017 desde <https://imagej.net/software/fiji/downloads>.
2. Se abrieron las fotos tomadas con el BAFFLE, correspondientes a la misma caja de Petri de campo claro, fluorescencia verde y fluorescencia roja.
3. Se convirtieron las imágenes a 8 bits. Image → type → 8 bit.
4. Se estableció la escala global con base en la imagen de campo claro. Se realizó una línea recta pasando por el centro de la caja de Petri (diámetro) con la herramienta Straight Line. Analyze → set scale. Known distance: 10. Unit of length: cm. Hacer escala global.
5. A cada foto se le redujo el tamaño de canvas de 6000x4000px a 4000x4000px. Image → adjust → canvas size.
6. Cada imagen se separó en sus diferentes canales. Image → color → split channels.
7. Para las fotos de fluorescencia se conservó el canal correspondiente a fluorescencia verde o roja. Para la foto de campo claro se conservó la foto de canal verde y se le aplicó un filtro de grises. Image → lookup tables → grays.
8. Se editó el brillo y contraste de cada imagen. Image → adjust → brightness/contrast.
9. Dependiendo del caso se puede eliminar el ruido exterior seleccionando solamente el área de las colonias y aplicando la función Edit → clear outside.
10. Se incluyó una barra de escala en cada imagen. Analyze → tools → scale bar. Width: 1cm. Se guardaron las imágenes individuales en formato tiff y png.

### Mediciones

11. Los radios por foto se midieron colocando una línea recta con un extremo en el centro de la caja de Petri y el otro extremo en el borde de la colonia. Se realizaron en cuatro inclinaciones 0°, 90°, 180° y 270°. De cada inclinación se obtuvo una medida de distancia con la herramienta Analyze → measure. Se repite este procedimiento para las imágenes de campo claro, fluorescencia verde y fluorescencia roja.
12. Las áreas se midieron utilizando la herramienta Wand (tracing) Tool y modificando su tolerancia hasta que se abarcara la totalidad del área de la colonia. Algunas áreas se midieron manualmente y se sumaron sus valores. Se utilizó la herramienta Analyze → measure. Se repite este procedimiento para las imágenes de campo claro, fluorescencia verde y fluorescencia roja.
13. Las áreas de segregación en pBGT-1 se midieron restando el área total menos el área fluorescente.

### Fusión de canal fluorescente y de campo claro

Para medir las áreas compartidas entre fluorescencias se deben fusionar los distintos canales, procedimiento que se menciona a continuación:

14. Se fusionaron las diferentes imágenes mediante la función Image → color → merge channels. En cada canal se selecciona la imagen correspondiente y se selecciona Keep Source Images.
15. Se añadió de nuevo la barra de escala siguiendo las instrucciones del punto 10.
16. Se guardó la imagen en formato tiff y png.

### Imágenes y videos del microscopio:

1. Se verificó la escala de las imágenes obtenidas con el objetivo 100x al abrir los archivos en ImageJ mediante la función Image → show info → resolution. La escala es 7.7519 píxeles por micrómetro.
2. Se establece la escala en Analyze → set scale.
3. Se incluyó una barra de escala en cada imagen. Analyze → tools → scale bar. Width: 10 µm.

### Medición de longitud

4. Se editó el brillo y contraste de cada imagen. Image → adjust → brightness/contrast.
5. Se seleccionaron varias células de cada especie en las imágenes de monocultivos para medir su longitud. Se muestrearon aproximadamente 50 células por especie y se promedió su longitud.
6. Para las imágenes con fluorescencia se aplicó el filtro correspondiente en Image → lookup tables → (red/green). Las imágenes editadas se guardan en formato png y tiff.
7. Se realizó la fusión de canales mediante la función Image → color → merge channels.
8. Se añadió de nuevo la barra de escala siguiendo las instrucciones del punto 10.
9. Se guardó la imagen en formato tiff y png.

### Videos

1. Se abrió el vídeo formato nd2 en ImageJ y se convirtió en 8 bits. Image → type → 8 bit.
2. Se incluyó la escala al igual que en las imágenes. Analyze → set scale: 7.7519 píxeles por micrómetro.
3. Se incluyó una barra de escala en cada imagen. Analyze → tools → scale bar. Width: 10 µm.
4. Dependiendo del caso se añadió el filtro de fluorescencia correspondiente en Image → lookup tables.
5. Se exportó como vídeo seleccionando File → save as → gif.

## 14. REFERENCIAS

Adamowicz EM, Flynn J, Hunter RC, Harcombe WR. Cross-feeding modulates antibiotic tolerance in bacterial communities. *ISME J.* 2018 Nov;12(11):2723-2735. doi: 10.1038/s41396-018-0212-z. Epub 2018 Jul 10. PMID: 29991761; PMCID: PMC6194032.

Anderson, D.F. (2011). *Stochastic Models in Biology*. University of Wisconsin at Madison. <https://people.math.wisc.edu/~anderson/605F11/IntroSlides.pdf>

Ash, C., Priest, F. G., & Collins, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3-4), 253–260. <https://doi.org/10.1007/BF00873085>

Baggio, J. A. (2017) *Complex Adaptive Systems, simulations and agent-based modeling*. Chapter 9. In: *Quantitative research methods in tourism: a handbook*. 2A edición. Editores: Baggio, R. y Jane, K. Channelview.

Baquero, F., & Negri, M.-C. (1997). Challenges: Selective compartments for resistant microorganisms in antibiotic gradients. *BioEssays*, 19(8), 731–736. doi:10.1002/bies.950190814

Batchelor M. D. (1919). Aerobic Spore-Bearing Bacteria in the Intestinal Tract of Children. *Journal of bacteriology*, 4(1), 23–34.15. <https://doi.org/10.1128/jb.4.1.23-34.15.1919>

BATCHELOR, F. R., DOYLE, F. P., NAYLER, J. H., & ROLINSON, G. N. (1959). Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature*, 183(4656), 257–258. <https://doi.org/10.1038/183257b0>

Baym, M., Lieberman, T.D., Kelsic, E.D., Chait, R., Gross, R., Yelin, I. y Kishony, R. (2016). Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science*, 353(6304), 1147-1151. DOI: 10.1126/science.aag0822

Be'er A, Florin EL, Fisher CR, Swinney HL, Payne SM. Surviving bacterial sibling rivalry: inducible and reversible phenotypic switching in *Paenibacillus dendritiformis*. *mBio*. 2011 May 31;2(3):e00069-11. doi: 10.1128/mBio.00069-11. PMID: 21628502; PMCID: PMC3104493.

Be'er A, Smith RS, Zhang HP, Florin EL, Payne SM, Swinney HL. *Paenibacillus dendritiformis* bacterial colony growth depends on surfactant but not on bacterial motion. *J Bacteriol.* 2009 Sep;191(18):5758-64. doi: 10.1128/JB.00660-09. Epub 2009 Jul 17. PMID: 19617369; PMCID: PMC2737951.

Be'er A, Strain SK, Hernández RA, Ben-Jacob E, Florin EL. Periodic reversals in *Paenibacillus dendritiformis* swarming. *J Bacteriol.* 2013 Jun;195(12):2709-17. doi: 10.1128/JB.00080-13. Epub 2013 Apr 19. PMID: 23603739; PMCID: PMC3697242.

Ben-Jacob E, Cohen I I, Shochet O, Tenenbaum A, Czirik A, Vicsek T. Cooperative formation of chiral patterns during growth of bacterial colonies. *Phys Rev Lett.* 1995 Oct 9;75(15):2899-2902. doi: 10.1103/PhysRevLett.75.2899. PMID: 10059433.

Ben-Jacob, E. (2014) *Phys. Biol.* 11 053009

Ben-Jacob, E., Cohen, I., & Gutnick, D. L. (1998). Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype. *Annual review of microbiology*, 52, 779–806. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.779>

Ben-Jacob, E., Finkelshtein, A., Ariel, G. e Ingham, C. (2016). Multispecies swarms of social microorganisms as moving ecosystems. *Trends in Microbiology*, 24(4), 257-269. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.008>



- Biocyc. (2020). Summary of *Paenibacillus lautus*, Strain E7593-69, version 25.5 Tier 3 Uncurated Database. Disponible en: [https://biocyc.org/organism-summary?object=GCF\\_003590055](https://biocyc.org/organism-summary?object=GCF_003590055)
- Bonabeau, Eric. (2002). Agent-Based Modeling: Methods And Techniques for Simulating Human Systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 Suppl 3. 7280-7. [10.1073/pnas.082080899](https://doi.org/10.1073/pnas.082080899).
- Book, G., Ingham, C. y Ariel, G. (2017). Modeling cooperating micro-organisms in antibiotic environment. *PLoS ONE*, 12(12), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190037>
- Bottery, M.J., Matthews, J.L., Wood, A.J. et al. Inter-species interactions alter antibiotic efficacy in bacterial communities. *ISME J* 16, 812–821 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01130-6>
- Boucher, D. H., James, S., & Keeler, K. H. (1982). The Ecology of Mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13(1), 315–347. doi:10.1146/annurev.es.13.110182.001531
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 14, 320–330 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>
- Brook I. (2009). The role of beta-lactamase-producing-bacteria in mixed infections. *BMC infectious diseases*, 9, 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-202>
- Bush, Karen. (2018). Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62. AAC.01076-18. [10.1128/AAC.01076-18](https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18).
- Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013 Aug;303(6-7):298-304. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23499304.
- Celandroni F, Salvetti S, Gueye SA, Mazzantini D, Lupetti A, Senesi S, Ghelardi E. Identification and Pathogenic Potential of Clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* Isolates. *PLoS One*. 2016 Mar 31;11(3):e0152831. doi: 10.1371/journal.pone.0152831. PMID: 27031639; PMCID: PMC4816569.
- Clarke, L., Pelin, A., Phan, M. et al. The effect of environmental heterogeneity on the fitness of antibiotic resistance mutations in *Escherichia coli*. *Evol Ecol* 34, 379–390 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10682-019-10027-y>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). M100-S25: Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing; twenty fifth informational supplement. 535 (3). CLSI. USA. ISSN 1-56238-990-4.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). M45: Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 3A ed. USA.
- Cordes, EE, Arthur, MA, Shea, K, Arvidson, R y Fisher, C. (2005). Modeling the mutualistic interactions between tubeworms and microbial consortia. *PloSBiology*, 3(3), 0497-0506. DOI:10.1371/journal.pbio.0030077.
- Custer GF, Bresciani L, Dini-Andreote F. Ecological and Evolutionary Implications of Microbial Dispersal. *Front Microbiol*. 2022 Apr 6;13:855859. doi: 10.3389/fmicb.2022.855859. PMID: 35464980; PMCID: PMC9019484.
- Dadgostar P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and drug resistance*, 12, 3903–3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Datta, N., & Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature*, 208(5007), 239–241. <https://doi.org/10.1038/208239a0>
- DeAngelis, D.L. y Mooij, W. M. (2005). Individual-based modeling of ecological and evolutionary processes. *Annual review of ecology, evolution and systematics*. 36:1, 147-168.

- Deangelis, Donald & Grimm, Volker. (2014). Individual-based models in ecology after four decades. *F1000prime reports*, 6, 39. 10.12703/P6-39.
- Dunny GM, Brickman TJ, Dworkin M. Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. *Bioessays*. 2008 Apr;30(4):296-8. doi: 10.1002/bies.20740. PMID: 18348154.
- Finkelshtein, A., Roth, D., Ben-Jacob, E. e Ingham, C. (2015). Bacterial swarms recruit cargo bacteria to pave the way in toxic environments. *Mbio*, 6(3), 1-10.
- Finkelshtein, Alin & Sirota-Madi, Alexandra & Roth Rosenberg, Dalit & Ingham, Colin & Ben-Jacob, Eshel. (2016). *Paenibacillus vortex — A Bacterial Guide to the Wisdom of the Crowd*.
- Fischer, J. & Ganellin, C. (2006). *Analogue-based Drug Discovery*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Fisher, J. F., Meroueh, S. O., & Mobashery, S. (2005). Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical reviews*, 105(2), 395–424. <https://doi.org/10.1021/cr030102i>
- Fisher, Jed & Mobashery, Shahriar. (2009). Three Decades of the Class A beta-Lactamase Acyl-Enzyme. *Current protein & peptide science*. 10, 401-7. 10.2174/138920309789351967.
- Fleming A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, 10(3), 226–236.
- Frère, J. M., Duez, C., Ghuysen, J. M., & Vandekerkhove, J. (1976). Occurrence of a serine residue in the penicillin-binding site of the exocellular DD-carboxy-peptidase-transpeptidase from *Streptomyces R61*. *FEBS letters*, 70(1), 257–260. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80770-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80770-3)
- Golding, I., & Ben-Jacob, E. (2001). The Artistry of Bacterial Colonies and the Antibiotic Crisis. *Lecture Notes in Physics*, 218–241. doi:10.1007/3-540-44698-2\_14  
10.1007/3-540-44698-2\_14
- Golding, I., Cohen, I., Ron, I.G. y Ben-Jacob, E. Adaptive Branching During Colonial Development of Lubricating Bacteria. *Capítulo X en: Fleury, V., Gouyet, J.F. y Leonetti, M. (eds) (2001). Branching in nature*. EDP Sciences.
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z.-C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, 15(1). doi:10.1186/s12934-016-0603-7
- Hall, Barry & Barlow, Miriam. (2004). Evolution of the serine  $\beta$ -lactamases: Past, present and future. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 7, 111-23. 10.1016/j.drug.2004.02.003.
- Harshey, R. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*, 57, 249-73. DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.091014.
- Haruta, S y Yamamoto K. (2018). Model microbial consortia as tools for understanding complex microbial communities. *Current genomics*, 19, 723-733. DOI: 10.2174/1389202919666180911131206.
- Hermesen, R., & Hwa, T. (2010). Sources and Sinks: A Stochastic Model of Evolution in Heterogeneous Environments. *Physical Review Letters*, 105(24). doi:10.1103/physrevlett.105.248104
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Apr;35(4):322-32. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011. Epub 2010 Feb 10. PMID: 20149602.
- Hu, B., Du, J., Zou, R. Y., & Yuan, Y. J. (2010). An environment-sensitive synthetic microbial ecosystem. *PLoS one*, 5(5), e10619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010619>

Ingham, C. y Ben-Jacob, E. (2008). Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus* vortex studied by imaging and tracking cells. *BMC Microbiology*, 8(36). DOI: 10.1186/1471-2180-8-36

Ingham, Colin & Kalisman, Oren & Finkelshtein, Alin & Ben-Jacob, Eshel. (2011). Mutually facilitated dispersal between the nonmotile fungus *Aspergillus fumigatus* and the swarming bacterium *Paenibacillus* vortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108. 19731-6. 10.1073/pnas.1102097108.

Katzung, B., Masters, S. & Trevor, A. (2012). *Basic & clinical pharmacology*. New York London: McGraw-Hill Medical McGraw-Hill distributor.

Kaushik, D., Mohan, M., Borade, D. M., & Swami, O. C. (2014). Ampicillin: rise, fall and resurgence. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 8(5), ME01–ME3. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8777.4356>

Klümper, U., Recker, M., Zhang, L. et al. (2019). Selection for antimicrobial resistance is reduced when embedded in a natural microbial community. *ISME J* 13, 2927–2937 <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0483-z>

Kull, K. (2010). Ecosystems are made of semiotic bonds: consortia, umwelten, biophony and ecological codes. *Biosemiotics*, 3, 347-357. DOI: 10.1007/s12304-010-9081-1.

Leinweber A, Fredrik Inglis R, Kümmerli R. Cheating fosters species co-existence in well-mixed bacterial communities. *ISME J*. 2017 May;11(5):1179-1188. doi: 10.1038/ismej.2016.195. Epub 2017 Jan 6. PMID: 28060362; PMCID: PMC5437929.

Little, AEF, Robinson, CJ, Peterson, SB, Raffa, KF y Handelsman, J. (2008). Rules of engagement interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annual Review of Microbiology*, 62, 375-401. DOI: 10.1146/annurev.micro.030608.101423.

Loong, S.-K., Ishak, S.-N., Lim, F.-S., Khoo, J.-J., Tan, S.-N., Freddy-Jalin, E.-J., ... AbuBakar, S. (2018). *Paenibacillus lautus*, an opportunistic bacterial pathogen, isolated from *Ixodes granulatus* Supino (Acari: Ixodidae) collected from a Müller's giant Sunda rat (*Sundamys muelleri*). *Systematic and Applied Acarology*, 23(4), 597. doi:10.11158/saa.23.4.2

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. y Stahl, D.A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*. USA. Pearson.

Mangwani N, Kumari S, Shukla SK, Rao TS, Das S. Phenotypic switching in biofilm-forming marine bacterium *Paenibacillus lautus* NE3B01. *Curr Microbiol*. 2014 May;68(5):648-56. doi: 10.1007/s00284-014-0525-8. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24452426.

Martin, M. (2009). Happy together...life of the bacterial consortium *Chlorochromatium aggregatum*. *American society for microbiology: the microbe blog*: <https://web.archive.org/web/20090501115354/http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009/04/happy-together-life-of-the-bacterial-consortium-chlorochromatium-aggregatum.html>

Maruch, S. y Maruch, A. (2006). *Python for dummies*. John Wiley & Sons. ISBN: 9780471778646.

Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., & Frère, J. M. (1998). Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *The Biochemical Journal*, 330 ( Pt 2)(Pt 2), 581–598. <https://doi.org/10.1042/bj3300581>

Mead DA, Lucas S, Copeland A, Lapidus A, Cheng JF, Bruce DC, Goodwin LA, Pitluck S, Chertkov O, Zhang X, Detter JC, Han CS, Tapia R, Land M, Hauser LJ, Chang YJ, Kyrpides NC, Ivanova NN, Ovchinnikova G, Woyke T, Brumm C, Hochstein R, Schoenfeld T, Brumm P. Complete Genome Sequence of *Paenibacillus* strain Y4.12MC10, a Novel *Paenibacillus lautus* strain Isolated from Obsidian Hot Spring in Yellowstone National Park. *Stand Genomic Sci*. 2012 Jul 30;6(3):381-400. doi: 10.4056/sigs.2605792. Epub 2012 Jul 27. PMID: 23408395; PMCID: PMC3558958.

- Medeiros A. A. (1984). Beta-lactamases. *British medical bulletin*, 40(1), 18–27. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071942>
- Miranda García, M<sup>a</sup> C.. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido: resistencia. *Sanidad Militar*, 69(4), 244-248. <https://dx.doi.org/10.4321/S1887-85712013000400003>
- Mougi A, Kondoh M. Diversity of interaction types and ecological community stability. *Science*. 2012 Jul 20;337(6092):349-51. doi: 10.1126/science.1220529. PMID: 22822151.
- Nakamura, L. K. (1984). *Bacillus amylolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus pabuli* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(2), 224–226. doi:10.1099/00207713-34-2-224
- National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. (2020). Modelado Computacional. NIH. <https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/modelado-computacional>
- NCBI Taxonomy Browser. Consultado: 2020). *Paenibacillus vortex*. NCBI Taxonomy Browser. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=71995&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&mod=1&log\\_op=modifier\\_toggle#modif](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=71995&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&mod=1&log_op=modifier_toggle#modif)
- Paredes, F. y Roca, J.J. (2004). Acción de los antibióticos: perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm*. 23 (3): 116-124.
- Polikovskiy, Mark & Ben-Jacob, Eshel & Finkelshtein, Alin. (2015). P. vortex-mediated strategies for polysaccharides decomposition. *Technology*. 3. 1-4.
- Popa, R. (2004). *Between necessity and probability: searching for the definition and origin of life*. Alemania. Springer.
- Ragazzo-Sánchez, Juan Arturo, Robles-Cabrera, Alejandra, Lomelí-González, Leopoldo, Luna-Solano, Guadalupe, & Calderón-Santoyo, Montserrat. (2011). Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(spe1), 5-11.
- Railsback S. F. y Grimm, V. (2005). *Individual-based modeling and ecology*. USA. Princeton university press.
- Railsback S. F. y Grimm, V. (2019). *Agent-based and individual-based modeling: a practical introduction*. USA. Princeton university press.
- Rodriguez-Beltran, J., Hernandez-Beltran, J.C.R., DelaFuente, J., Escudero, J.A., Fuentes-Hernandez, A., MacLean, R.C., Peña-Miller, R. y San Millan, A. (2018). Multicopy plasmids allow bacteria to escape from fitness trade-offs during evolutionary innovation. *Nature*, 2(5). DOI: [doi.org/10.1038/s41559-018-0529-z](https://doi.org/10.1038/s41559-018-0529-z).
- Romana, J.C. (2012). *Estadística experimental: herramientas para investigación*. Perú. UPT-PERU fondo editorial.
- Roth, D., Finkelshtein, A., Ingham, C., Helman, Y., Sirota-Madi, A., Brodsky, L. y Ben-Jacob, E. (2013). Identification and characterization of a highly motile and antibiotic refractory subpopulation involved in the expansion of swarming colonies of *Paenibacillus vortex*. *Environmental microbiology*, 15(9), 2532-2544. DOI: 10.1111/1462-2920.12160
- Salverda, M., Visser, A. y Barlow, M. (2010). Natural evolution of TEM-1 beta-lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 34, 1015-1035. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x.
- San Millan, A., Escudero, J.A., Gifford, D.R., Mazel, D. y MacLean, R.C. (2016). Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria. *Nature Ecology and Evolution*, 1, 0010, 1-8. DOI: 10.1038/s41559-016-0010.

Shade A, Jones SE, McMahon KD. The influence of habitat heterogeneity on freshwater bacterial community composition and dynamics. *Environ Microbiol.* 2008 Apr;10(4):1057-67. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01527.x. Epub 2008 Jan 23. PMID: 18218031.

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 2004 Dec;22(12):1567-72. doi: 10.1038/nbt1037. Epub 2004 Nov 21. PMID: 15558047.

Sharma, A., Wood, K.B. Spatial segregation and cooperation in radially expanding microbial colonies under antibiotic stress. *ISME J* (2021). <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00982-2>

Sharma, M., & Anand, S. K. (2002). Swarming: A coordinated bacterial activity. *Current Science*, 83(6), 707–715. <http://www.jstor.org/stable/24106146>

Sirota-Madi A, Olender T, Helman Y, Brainis I, Finkelshtein A, Roth D, Hagai E, Leshkowitz D, Brodsky L, Galatenko V, Nikolaev V, Gutnick DL, Lancet D, Ben-Jacob E. Genome sequence of the pattern-forming social bacterium *Paenibacillus dendritiformis* C454 chiral morphotype. *J Bacteriol.* 2012 Apr;194(8):2127-8. doi: 10.1128/JB.00158-12. PMID: 22461558; PMCID: PMC3318481.

Sirota-Madi, A., Olender, T., Helman, Y., Ingham, C., Brainis, I., Roth, D., Hagi, E., Brodsky, L., Leshkowitz, D., Galatenko, V., Nikolaev, V., Mugasimangalam, R. C., Bransburg-Zabary, S., Gutnick, D. L., Lancet, D., & Ben-Jacob, E. (2010). Genome sequence of the pattern forming *Paenibacillus vortex* bacterium reveals potential for thriving in complex environments. *BMC genomics*, 11(710). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-710>

Smith, N. W., Shorten, P. R., Altermann, E., Roy, N. C., & McNabb, W. C. (2019). *The Classification and Evolution of Bacterial Cross-Feeding*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7. doi:10.3389/fevo.2019.00153

Smith P, Schuster M. Public goods and cheating in microbes. *Curr Biol.* 2019 Jun 3;29(11):R442-R447. doi: 10.1016/j.cub.2019.03.001. PMID: 31163154.

Song, H, Ding, MZ, Jia, XQ, Ma, Q y Yuan, YJ. (2014). Synthetic microbial consortia: from systematic analysis to construction and applications. *The royal society of chemistry*. DOI: 10.1039/c4cs00114a.

Space Studies Board y National Research Council (SSP y NRC). (1999). *Size limits of very small microorganisms*. SSP y NRC. USA. ISBN 0-309-06634-4.

Spratt B. G. (1983). Penicillin-binding proteins and the future of beta-lactam antibiotics. The Seventh Fleming Lecture. *Journal of general microbiology*, 129(5), 1247–1260. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-5-1247>

Tan C, Smith RP, Srimani JK, Riccione KA, Prasada S, Kuehn M, You L. The inoculum effect and band-pass bacterial response to periodic antibiotic treatment. *Mol Syst Biol.* 2012;8:617. doi: 10.1038/msb.2012.49. PMID: 23047527; PMCID: PMC3472685.

Tardío Pi, C., Reyes-González, D., Fernández-Duque, A., Fuentes-Hernandez, 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.

Tcherpakov M, Ben-Jacob E, Gutnick DL. *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Jan;49 Pt 1:239-46. doi: 10.1099/00207713-49-1-239. PMID: 10028268.

ThermoFisher Scientific. (2021). Green Fluorescent Protein (GFP). ThermoFisher. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/green-fluorescent-protein.htm#>

Thompson, J. N. (1988). Variation in Interspecific Interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19,

65–87. <http://www.jstor.org/stable/2097148>

Tipper, D. J., & Strominger, J. L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(4), 1133–1141. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.4.1133>

Traveset, A y Richardson, D. (2014). Mutualistic interactions and biological invasions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*, 45, 89-113. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-120213-091857.

Turner, L., Zhang, R., Darnton, N.C. y Berg, H.C. (2010). Visualization of flagella during bacterial swarming. *Journal of Bacteriology*, 192(13), 3259-3267. DOI: 10.1128/JB.00083-10.

Vega NM, Gore J. Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Curr Opin Microbiol*. 2014 Oct;21:28-34. doi: 10.1016/j.mib.2014.09.003. Epub 2014 Sep 29. PMID: 25271119; PMCID: PMC4367450.

Vijay S, Nhung HN, Bao NLH, Thu DDA, Trieu LPT, Phu NH, Thwaites GE, Javid B, Thuong NTT. Most-Probable-Number-Based Minimum Duration of Killing Assay for Determining the Spectrum of Rifampicin Susceptibility in Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021 Feb 17;65(3):e01439-20. doi: 10.1128/AAC.01439-20. PMID: 33257450; PMCID: PMC8092508.

Wiener, P. Experimental studies on the ecological role of antibiotic production in bacteria. *Evol Ecol* 10, 405–421 (1996). <https://doi.org/10.1007/BF01237726>

Yadav S, Dubey SK. Cellulose degradation potential of *Paenibacillus lautus* strain BHU3 and its whole genome sequence. *Bioresour Technol*. 2018 Aug;262:124-131. doi: 10.1016/j.biortech.2018.04.067. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29702421.

Zeigler, D.R. (2013). The family Paenibacillaceae. Part 5. *Bacillus Genetic Stock Center*.

Zhang, Q., Lambert, G., Liao, D., Kim, H., Robin, K., Tung, C., Pourmand, N. y Austin, R. (2011). Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments. *Science* 333(6050), 1764-1767. DOI: 10.1126/science.1208747

Zuo, W., & Wu, Y. (2020). Dynamic motility selection drives population segregation in a bacterial swarm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201917789. doi:10.1073/pnas.1917789117



Cuernavaca, Morelos a 11 de mayo de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE  
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES  
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: ANDREA FERNÁNDEZ DUQUE, con el título del trabajo: ESTUDIO SOBRE LA INTERACCIÓN RESISTENCIA-MOTILIDAD EN UN CONSORCIO BACTERIANO *ESCHERICHIA COLI - PAENIBACILLUS SP.*

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación Profesional por Tesis como lo marca el artículo 4° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E  
*Por una humanidad culta*

JURADO REVISOR	FIRMA
PRESIDENTE: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ	_____
SECRETARIO DRA. MARÍA LUISA CASTREJÓN GODÍNEZ	_____
VOCAL: DR. RAFAEL PEÑA MILLER	_____
SUPLENTE: DRA. ROSALBA SALGADO MORALES	_____
SUPLENTE: DRA. ERIA ALAIDE REBOLLAR CAUDILLO	_____

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

**RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2022-05-11 11:50:09 | Firmante**

QWrrB+9rDRRdBBL2ZInUxplKCTTQyzktKCAiaXz9vmKnpMz99glYKXWk4gxZCSZBpNjBb+gls8YyPwDYrCnV/BFCy+vRq9hAKnkVD2pdF2znmuxerACWTwqLXSCS400Mdv  
BhcmYPO7eJqOTeQU4zo6oR5i8pjiS0rWOP4lqYSQTbfYFYApkLZtmvrt7gbph+aJFLdHZlgKBdouGMob1wLbaK+ZD57xlEuPpcBsgAU1FsL2POPDGovKBoyQ15PcpsQoBwD  
zTEeckpSsHVL06mhY0/i0+OHe3rZyqKiZ6Y28NMhnXtbBMg4MGulVyROMJ2QZ3KBFnkDrGrg==

**MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2022-05-11 12:31:06 | Firmante**

alBlUS0kOQ+22DOPdrE6hoa7W/TcJvnhb3Y19YpZucVs1xtHXXBuBvQOvYySBV4cEPYdV132u3R/+AMLE9Dcax0fXpRB7HQ1sEmI9vjqZIEoBmEUSTcDFW8hJqNp3Hf0+mml  
0Jr6k8eFavr8hm/Ctj9P1t0xfyd0ndZecblj1dWxmMEEGP0R0qmDsXv0DqDd+Bva6Dzdxic3+zPLJYrJUuKlk4BonPm1QVGValseT4hMruYCx4wrrsUUK5t2bHT8GNs4urumtSJY  
AEV5JFAIaxRaUbetcJHXfTPdM34223JC9cN7O9+Xu5ipDnoV+/hK2WjyUceDbA==

**RAFAEL PEÑA MILLER | Fecha:2022-05-11 20:44:14 | Firmante**

6O7SRQyT8UhvQouu61OKHK8GX4G6ym63DQoiNaxEXk9nZos6DhJkxi9Gd1ccKoNJVrYulu0yavr7ue4dvdxRCIMZfFU/nbht1UMIUZRg9r8MnkTssXyiOI8874buEc5DteY1vw34  
5+ATF4tGfobbUUajRwrfZgqBHYlg6VAqY9ueyeDQooPnMGfPE/ZXKwUyGxfX2gGPXP2NkHOTxosH13LbM3YJ7k6UyBwMPXVugBDrUpU+ObBN+Yao/Jbbq2eTQU6ayQhB8A  
W1q5u2i9Xa55R00gclI2Lesgdf7K0wANYVZEfiT3IVuFVQeLLeYL9QxX5GPE22Mq2NL+tGsq0g==

**ROSALBA SALGADO MORALES | Fecha:2022-05-12 08:16:42 | Firmante**

Nzi84UJDNhluSUzF85HR9CwQyYL7OXm90L3rypAm/FUUQq6UfS836DxL73ypoK8oQfZBSCchNBC/U6aNCg9ordO8HBprrkKQ0/8U52mCnUlcMx49BqIP9KWxexXZ3MAedTZp  
0QTuFZH+647cTDWW5BDnLcftSqZATRwUMbQNMUIE5K6ISFJx33r/QvzRxQ0TAaUlnOaSfm0OC+MUWduFDXspjA5i7TZ9GnQLWMAfRz0+mkDNgp1z501G2FjwKS+XbA  
q43OusY+gYj0f690137jciOLLctd7YdAHhHqQRQEzo/q5TpzKhW/nOzBdSisUPx1ALO/iIWhYk6JLA==

**ERIA REBOLLAR CAUDILLO | Fecha:2022-09-27 15:39:28 | Firmante**

y90iwGyVfdTMSv8rSxvLyyT4KaJC7cw75tVO+9A79pnXkwh9hGm3dS0gNduq6XkmX8GgJ81WN5OZdsZa/VKTRCoQocEjU565aDjBPFYjCBoXjsFJeEqCCbYnQV2/PjBGeOYau  
21zo63bJyI5CV5DD7gJfyFXHLzRW5L3yBk48wEQFg1D1pJ/Bakollbicp3i1+2mdaD0PIO6ox69RLj+EYbJfNilAs0o8BqGGcg9CnMdLurrx6CPn67LaPIbVoclcb/T+IC6cT1qhl1n77u  
eMNvz26dkE14jOBQCxEvynOYItuh5ra767ienb+Wmme0QrKzaj5rMO3tchOvEZWWRQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



TP4tBsUIS

<https://efirma.uaem.mx/noReputio/xJMR5vsoghPjGFZWGFxSnEZ4OIS85v>