



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA CELULAR

**Alimentación cruzada ('cross-feeding') y dinámicas de
diversidad en fase estacionaria de largo plazo en *Escherichia
coli*: Una aproximación matemática**

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

PÁMELA PATRICIA MARTÍNEZ VARGAS

Director

Pablo A. Marquet
Departamento de Ecología
Facultad de Ciencias Biológicas
P. Universidad Católica de Chile

Co-Director

Miguel A. Fuentes
Instituto Balseiro
Centro Atómico Bariloche
Argentina

Patrocinante

María Mercedes Zaldívar
Depto. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago, Chile
2010

Ahora sólo medía diez pulgadas y su cara se iluminó al pensar que ya tenía la medida apropiada para pasar por la puertecita y entrar en el precioso jardín.

Lewis Carroll (1865)

Agradecimientos

En primer lugar le quiero agradecer al doctor Pablo Marquet por haberme dado la oportunidad de trabajar en sus proyectos, por haber confiado en mí, por mostrarme lo maravilloso que es la biología y porque junto a él comprendí que aún existen personas apasionadas por la ciencia y la investigación. Muchas gracias a la gente del laboratorio, en especial al Seba, Angélica, Guille, Leo, Fernando, Feña, Marlene, Ana, Andy y Vane por los agradables momentos que hemos vivido juntos y por su buena disposición a resolver mis inquietudes.

Agradezco profundamente al doctor Miguel Fuentes por la oportunidad de investigar juntos, de disfrutar de enriquecedoras discusiones que me han cambiado la forma de ver la vida y por haber estado en el Instituto Santa Fe.

Durante mis 7 años de universidad conocí personas que han sido un pilar fundamental para mí. Le quiero agradecer a la Lore, Palo, Juan y Cony por todos los buenos momentos que compartimos, al Javi por su incondicional amistad y por todas esas horas que estuvimos juntos en nuestro paso por la U, a la Blanca por estar a mi lado siempre y ser una excelente amiga, y al Rata por haber sido un apoyo muy importante durante el desarrollo de esta tesis, principalmente por su ayuda a resolver mis problemas más técnicos. Además, le agradezco a la profesora Mercedes Zaldívar por aceptar ser mi patrocinante y por ser una excelente guía en este proceso.

Gracias a mis amigos de la vida: Nati, Paula P, Yuyo, Chela, Micki, Feña, Paula F, por su compañía y porque sin ellos no sería la persona que soy.

Finalmente le quiero agradecer y dedicar este trabajo a mis papás, por darme la libertad de estudiar lo que quería y porque junto a mis hermanos han estado siempre a mi lado, entregando ese amor incondicional que nos hace ser una familia maravillosa.

Financiamiento

Esta tesis fue realizada en el laboratorio del Dr. Pablo Marquet, del Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile y fue financiada por el proyecto “Iniciativa Científica Milenio” ICM P05-002 del Instituto de Ecología y Biodiversidad.

Índice General

Agradecimientos	ii
Financiamiento	iii
Índice General	iv
Índice de Figuras	vi
Abreviaturas	vii
Resumen	viii
Summary	ix
1 Introducción	1
1.1 Aspectos Ecológicos	1
1.2 Mecanismos asociados a dinámicas de diversidad en poblaciones bacterianas . .	3
1.2.1 Exclusión competitiva	3
1.2.2 Fenotipos aventajados	3
1.2.3 Compensación demográfica	4
1.2.4 Selección dependiente de frecuencia	5
1.2.5 Cross-feeding	5
Hipótesis	8
Objetivos	8
2 Métodos	9
2.1 El modelo	9
2.2 Análisis de diversidad	13
2.3 Análisis de coexistencia y probabilidad de extinción	14

2.4 Ejecución del modelo	15
3 Resultados	16
3.1 Objetivo 1: Generar un modelo matemático capaz de simular poblaciones bacterianas bajo el mecanismo de cross-feeding	16
3.2 Objetivo 2: Determinar la presencia de selección periódica, coexistencia y la transición entre ambas fases en las poblaciones generadas	18
3.3 Objetivo 3: Evaluar la sensibilidad del modelo	20
4 Discusión	25
5 Conclusiones	31
6 Proyecciones	32
7 Referencias	33

Índice de Figuras

Figura 1. Dinámica poblacional de cultivos en fase estacionaria de largo plazo	2
Figura 2. Metabolismo de glucosa, acetato y glicerol	6
Figura 3. Hipotética transición entre selección periódica y coexistencia	7
Figura 4. Probabilidad de supervivencia en función del recurso R_i	10
Figura 5. Diagramas representativos de la evolución del sistema	12
Figura 6. Dinámica poblacional en ausencia de cross-feeding	16
Figura 7. Dinámica poblacional en presencia de cross-feeding	17
Figura 8. Abundancia de metabolitos en presencia de cross-feeding	18
Figura 9. Análisis de diversidad y abundancia total de la población	19
Figura 10. Análisis de extinción y coexistencia para 5 metabolitos	22
Figura 11. Análisis de extinción y coexistencia para 6 metabolitos	23
Figura 12. Análisis de extinción y coexistencia para 7 metabolitos	24

Abreviaturas

ABC	ATP Binding Cassette
ACS	Acetil-CoA sintetasa
E	Índice de Pielou
g	Número total de genotipos presentes en el sistema
GK	Glicerol kinasa
H	Índice de Shannon - Weaver
ml	mililitro
n	Conjunto de metabolitos
pb	Pares de bases
p_i	Abundancia relativa del genotipo i
P_m	Probabilidad de mutación
P_s	Probabilidad de supervivencia
P_r	Probabilidad de reproducción
R_i	Abundancia relativa del metabolito i
t	Tiempo
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
ω	Metabolito
Φ	Genotipo

Resumen

Diversas investigaciones han mostrado que cultivos microbianos provenientes de una cepa pura pueden dar paso gradualmente a la emergencia y mantención de diversidad genética en condiciones de privación de recursos. En fase estacionaria de largo plazo, en *Escherichia coli*, se ha observado que aquellas mutantes con mayor adecuación biológica son capaces de invadir el sistema (selección periódica), lo cual posteriormente da paso a una fase de coexistencia y como consecuencia la biodiversidad se ve incrementada.

En este trabajo se postula que el mecanismo responsable de ambas dinámicas, selección periódica y coexistencia, es el cross-feeding, en otras palabras la existencia de acoplamientos entre los requerimientos de nutrientes por parte de las mutantes, tal que los productos de excreción de un genotipo son los recursos de otro.

El objetivo de esta tesis fue estudiar el rol de este mecanismo en las dinámicas de diversidad observadas en fase estacionaria de largo plazo, a través de la generación de un modelo de simulación matemático. En el modelo propuesto, las mutaciones le confieren a los individuos la capacidad de metabolizar y excretar distintos metabolitos, donde la supervivencia y la reproducción son dependientes de los recursos requeridos por cada genotipo.

Nuestros resultados muestran que bajo condiciones limitadas de nutrientes, en ausencia de cross-feeding, la población muere rápidamente. Sin embargo, la presencia de cross-feeding produjo dinámicas de diversidad similares a las descritas en cultivos de largo plazo (selección periódica y coexistencia). Estos resultados indican que este mecanismo podría ser fundamental en la persistencia de las poblaciones por largos periodos de tiempo y que jugaría un rol importante en la emergencia y mantención de diversidad en ecosistemas microbianos.

Summary

Cross-feeding and diversity dynamics of long-term microbial cultures: A mathematical approach

Several studies have shown that microbial cultures from a pure strain may gradually lead to the emergence and maintenance of genetic diversity in deprivation of resources. Long-term stationary phase cultures of *Escherichia coli* have shown that these mutants with higher fitness are able to invade the system (periodic selection), but then these mutants do not exclude each other and as a result biodiversity increases.

This work argues that the mechanism responsible for both dynamics, periodic selection and coexistence, is cross-feeding; in other words the existence of links between nutrient requirements by the mutants, in such a way that excretory products of one genotype are the resources of another.

The aim of this thesis was to study the role of this mechanism in diversity dynamics observed in long-term stationary phase, through the generation of a mathematical simulation model. In this model, mutations grant individuals the ability to metabolize and excrete different metabolites, where survival and reproduction are dependent on the resources required by each genotype.

Our results show that under limited concentrations of nutrients and without recycling of metabolites, the population quickly dies. However, the presence of cross-feeding produced diversity dynamics similar to those observed in long-term batch cultures (periodic selection and coexistence). These results indicate that the proposed mechanism could be fundamental to the persistence of populations for long periods of time and would play an important role in the emergence and maintenance of diversity in microbial ecosystems.

1 Introducción

Comentario [pm1]:

1.1 Aspectos Ecológicos

En ecología aun no existe una teoría general respecto a la generación y mantención de diversidad en ecosistemas, a pesar de las constantes investigaciones realizadas en esta dirección (Hubbell, 1997; Huisman *et al.*, 2001; Allen *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2004). Uno de los problemas que surge en su estudio y por lo tanto una dificultad para lograr una teoría general, es el uso de sistemas ecológicos complejos (Volkov *et al.*, 2007). En este contexto, las bacterias se presentan como un modelo de estudio simple debido a su fácil propagación, grandes tamaños poblacionales y cortos tiempos generacionales (Dykhuizen, 1990), permitiendo observar en tiempo real dinámicas ecológicas y cambios evolutivos.

Se ha descrito que cultivos microbianos provenientes de cepas puras pueden dar paso gradualmente a la emergencia de diversidad por medio de polimorfismos genéticos, generados a partir de mutaciones, incluso en ausencia de heterogeneidad ambiental (Zambrano *et al.*, 1993; Rosenzweig *et al.*, 1994; Riley *et al.*, 2001; Maharjan *et al.*, 2006). En estos análisis, se ha observado que aquellas mutantes con mayor adecuación biológica o *fitness* son capaces de predominar el sistema, fenómeno conocido como selección periódica (Atwood *et al.*, 1951) y el cual ha sido estudiado en diferentes formas de cultivos, como quimiostato y transferencia en serie (Helling *et al.*, 1987; Lenski y Travisano, 1994). No obstante, estos sistemas no representan de manera adecuada el estrés asociado a bajas concentraciones de recursos ni el nivel de competencia real de ecosistemas microbianos naturales (Morita, 1988; Zinser y Kolter, 2004; Finkel, 2006).

Experimentos en cultivos de *Escherichia coli* de largo plazo, donde no se añaden nutrientes luego de la condición inicial, ni se extrae ninguno de los metabolitos producto de la actividad metabólica, permiten comprender cómo evoluciona el sistema bajo condiciones de estrés similares a las que encuentran estos organismos en condiciones

naturales (Zambrano *et al.*, 1993; Finkel y Kolter, 1999; Zinser y Kolter, 1999, 2004). Estos trabajos muestran que después del tercer día de cultivo, la población pierde aproximadamente el 99% de la viabilidad celular (fase de muerte). Sin embargo, los individuos que son capaces de sobrevivir entran en una fase estacionaria de largo plazo, donde la población se mantiene constante a una densidad de 10^6 UFC/ml por al menos un año (Finkel y Kolter, 1999).

Durante los primeros meses de cultivo es posible observar una fase de selección periódica (Fig. 1a), pero a partir del quinto mes las distintas mutantes coexisten y como consecuencia la biodiversidad se ve incrementada (Fig. 1b) (Finkel y Kolter, 1999).

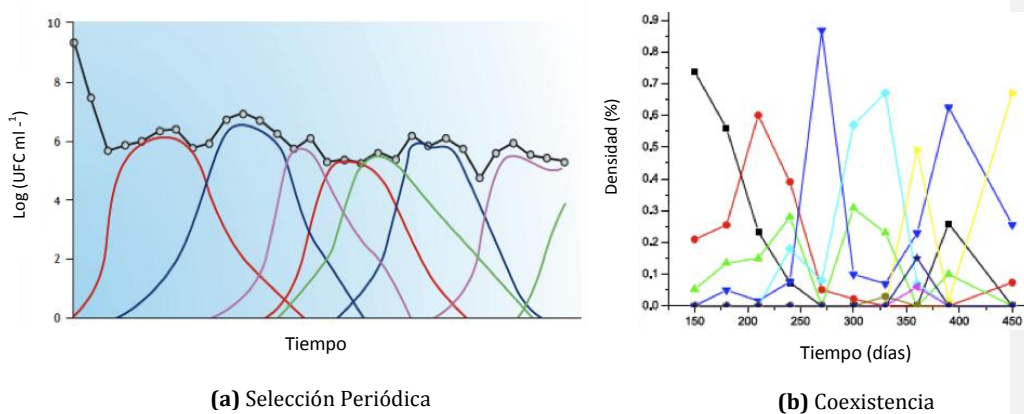


Figura 1: Dinámica poblacional de cultivos en fase estacionaria de largo plazo.

(a) Esquema representativo que describe cómo aquellas mutantes con mayor adecuación biológica son capaces de invadir el sistema durante los primeros meses de incubación (Finkel, 2006). Cada color representa una mutante distinta con fenotipo aventajado. La línea negra indica la densidad poblacional total. (b) Composición de la población analizada a partir del quinto mes de incubación. Los colores indican los diferentes morfotipos de las colonias. (Keymer *et al.*, 2008; modificado de Finkel y Kolter, 1999).

1.2 Mecanismos asociados a dinámicas de diversidad en poblaciones bacterianas

Se han propuesto diversos mecanismos capaces de explicar las fases de diversidad presentes en poblaciones bacterianas cultivadas en medios homogéneos. Sin embargo, estas investigaciones describen de manera independiente las dinámicas observadas (selección periódica y coexistencia).

Entre estos mecanismos, los asociados a selección periódica son principalmente la exclusión competitiva y la emergencia de fenotipos aventajados, mientras que los relacionados a coexistencia son la compensación demográfica, la selección dependiente de frecuencia y la alimentación cruzada o ‘cross-feeding’.

1.2.1 Exclusión competitiva

Bajo este principio, dos poblaciones (en este contexto, dos genotipos bacterianos) no pueden coexistir de manera estable frente a una limitación única de recurso si ambas ocupan el mismo nicho ecológico (rol que cumple cada genotipo dentro de la población), si comparten un espacio geográfico y si una de las poblaciones crece más rápido que la otra, aunque esta diferencia sea muy pequeña (Gause, 1934; Hardin, 1960).

1.2.2 Fenotipos aventajados

Según este mecanismo, aquellas mutantes con ventajas competitivas serían capaces de predominar o invadir el sistema a través de un fenotipo aventajado (Atwood *et al.*, 1951; Dykhuizen, 1990). Estudios en fase estacionaria de largo plazo han identificado algunas de estas mutaciones involucradas, una de ellas se encontró en el gen *rpoS*, donde una duplicación de 46 pb genera la disminución en la actividad de σ^S , factor sigma alternativo específico de la fase estacionaria (Zambrano *et al.*, 1993). Otra de las mutaciones se identificó en el gen *lrp*, donde una delección de 3 pb genera pérdida en la

actividad del factor transcripcional Lrp, el cual participa en la regulación de varios genes involucrados en el metabolismo y transporte de aminoácidos (Zinser y Kolter, 1999, 2000, 2004). La última de las mutaciones descritas se encontró en el operón *ybeJ-gltJKL*, donde una inserción seguida de una inversión del elemento móvil IS5, río arriba del operón, genera la activación del gen *gltJ*, el cual codifica para un transportador tipo ABC de aspartato y glutamato (Zinser y Kolter, 1999, 2004).

Aunque cada uno de estos genes se encuentra involucrado en diferentes procesos, los efectos de estas mutaciones se ven reflejados en el aumento de la eficiencia para utilizar uno o más aminoácidos como fuente de carbono, lo que le confiere a los individuos dicha ventaja adaptativa, aún cuando no se conoce completamente la participación directa de estos cambios genotípicos (Zinser y Kolter, 1999, 2000, 2004).

Tanto exclusión competitiva como la presencia de fenotipos aventajados son mecanismos que podrían estar complementados y de manera conjunta explicar la predominancia en el tiempo de aquellas mutantes con mayor adecuación biológica.

Por otro lado, los mecanismos asociados a coexistencia son los siguientes:

1.2.3 Compensación demográfica

Se puede explicar la coexistencia de distintos genotipos si se producen diferencias en las tasas de crecimiento máxima (V_{max}) y en la afinidad por el sustrato ($1/K_s$) según el crecimiento poblacional descrito por Monod (Ecuación 1; Monod, 1949), ecuación análoga a la cinética de Michaelis-Menten. De esta forma, algunas mutantes se verían favorecidas en presencia de bajas concentraciones de recurso (alta afinidad), mientras que otras estarían aventajadas a altas concentraciones de sustratos (V_{max} mayor) (Turner *et al.*, 1996; Rozen y Lenski, 2000).

$$\frac{dN}{dt} = \frac{NSV_{max}}{S + K_s} \quad (1)$$

En la ecuación 1, N corresponde a la densidad celular, S a la concentración del recurso y K_s a la concentración de recurso requerida para llevar el crecimiento poblacional a la mitad de su valor máximo.

1.2.4 Selección dependiente de frecuencia

Bajo este mecanismo, la abundancia de los genotipos es determinante de sus adecuaciones biológicas, lo que genera una ventaja en aquellos que se encuentran en baja densidad (el recurso disponible es mayor) y una desventaja cuando son comunes en la población (los nutrientes son escasos y por lo tanto la competencia aumenta) (Turner *et al.*, 1996; Rozen y Lenski, 2000).

1.2.5 Cross-feeding

Cross-feeding o alimentación cruzada se define como la capacidad de un genotipo para consumir metabolitos excretados por otros genotipos (Helling *et al.*, 1987) y se considera un mecanismo facilitador de la coexistencia debido a las diferencias existentes en los tipos de recursos requeridos por los individuos.

Helling y sus colaboradores (1987) identificaron tres genotipos de *Escherichia coli* coexistentes (CV101, CV103 y CV116), después de 773 generaciones en quimiostatos bajo limitación de glucosa. Dichas mutantes presentaban diferencias en la morfología de sus colonias, presencia de plasmidios, tasas de crecimiento y cinéticas de consumo de glucosa. Posteriormente, se identificó por espectroscopía de resonancia magnética nuclear la presencia al menos 33 intermediarios metabólicos de la glicólisis y el ciclo de Krebs en cultivos de dichas mutantes (Rosenzweig *et al.*, 1994).

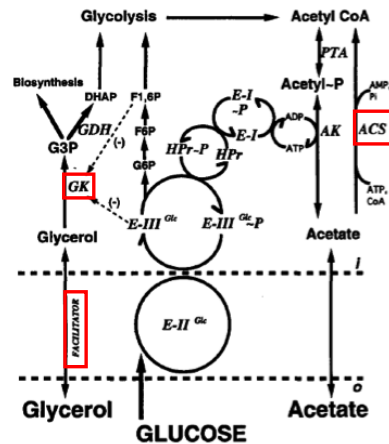


Figura 2: Metabolismo de glucosa, acetato y glicerol. Posibles sitios en los cuales glicerol y acetato pueden ser integrados en el sistema de fosfotrasferasa de azúcares en *Escherichia coli*. En rojo se destacan las proteínas que estarían involucradas en el mecanismo de cross-feeding. (Rosenzweig *et al.*, 1994). GK corresponde a Glicerol kinasa y ACS a Acetil-CoA sintetasa.

El genotipo CV101 presentó una sobreexpresión constitutiva de la enzima acetil-CoA sintetasa (ACS) y un crecimiento considerable de la población si se le suministraba acetato al medio. Esto, junto con una alta excreción de acetato por parte de CV103, permitieron inferir la capacidad de CV101 para consumir acetato excretado por CV103, existiendo un equilibrio de densidad-dependencia entre el genotipo productor y el consumidor. No obstante, se observó una habilidad atenuada de CV101 para consumir glicerol, en relación a las otras dos mutantes (Rosenzweig *et al.*, 1994).

Por otro lado, el genotipo CV116 expresó bajos niveles de ACS en condiciones de limitación de nutrientes, lo que indicó un consumo disminuido de acetato. Sin embargo, este genotipo presentó una mayor capacidad para metabolizar glicerol, lo que se asoció a diferencias en la regulación de las enzimas involucradas en su transporte y catabolismo (Fig. 2), las cuales son codificadas por genes presentes en el regulón glicerol (Rosenzweig *et al.*, 1994).

No sólo se han publicado trabajos experimentales en esta dirección, sino que también varios modelos teóricos han sido de gran importancia para entender el rol del cross-feeding en estos procesos evolutivos (Porcher *et al.*, 2001; Doebeli, 2002; Krone y Guan, 2006; Bull y Harcombe, 2009).

Dentro de los mecanismos planteados para comprender la fase de coexistencia, es necesario tener en cuenta que éstos podrían actuar de manera conjunta, puesto que los sistemas son altamente complejos y por lo tanto existen diversos tipos de interacciones.

No obstante, tanto las aproximaciones experimentales como teóricas explican exclusivamente la mantención de diversidad y no consideran la transición entre una fase de selección periódica y una de coexistencia. Bajo este escenario, el mecanismo de cross-feeding podría explicar dicha transición, puesto que en ausencia de un suministro constante de recursos, los metabolitos generados son consumidos y nuevamente transformados en otros metabolitos, generando una ventaja en ciertos genotipos cuando la concentración de éstos es alta (selección periódica). Sin embargo, este proceso puede dar paso a la generación de ciclos, lo que implicaría la constante generación de un grupo específico de metabolitos y como consecuencia la coexistencia de los genotipos capaces de consumir aquellos generados por estos ciclos (Fig. 3).

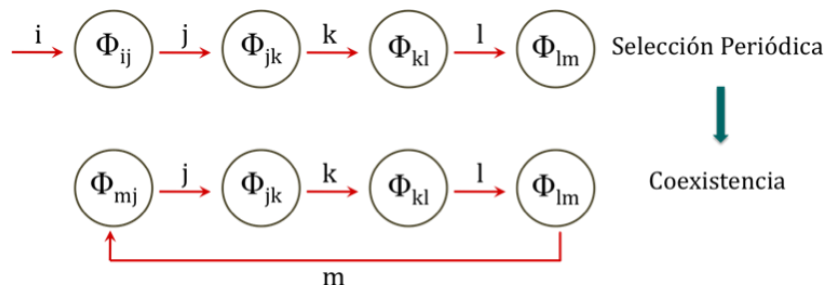


Figura 3. Hipotética transición entre selección periódica y coexistencia. Diagrama representativo de la transición entre distintas fases de diversidad en presencia de cross-feeding. Cada letra representa un metabolito, cada Φ representa un genotipo.

HIPÓTESIS

Cross-feeding es uno de los principales mecanismos responsables de las dinámicas de diversidad observadas en fase estacionaria de largo plazo en *Escherichia coli* sometidas a privación de nutrientes y da cuenta de la transición entre un régimen de selección periódica y uno de coexistencia.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del cross-feeding en la emergencia y mantención de selección periódica y coexistencia de distintos genotipos en poblaciones de *Escherichia coli*, mediante el uso de herramientas matemáticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar un modelo matemático capaz de simular poblaciones bacterianas bajo el mecanismo de cross-feeding.
2. Determinar la presencia de selección periódica, coexistencia y la transición entre ambas fases en las poblaciones generadas.
3. Evaluar la sensibilidad del modelo.

2 Métodos

2.1 El modelo

El modelo propuesto corresponde a una simulación basada en agentes, en otras palabras un tipo de modelo computacional que permite simular el comportamiento de individuos autónomos (en este caso bacterias) dentro de un entorno, y de esta forma evaluar los efectos generados en el sistema.

Se planteó el siguiente conjunto de reglas que permiten la evolución del modelo:

- A tiempo 0 se comienza con unos pocos individuos (cinco) que poseen un mismo genotipo y que consumen de un único recurso ω , cuya cantidad inicial está dada por ω_i .
- Por cada unidad de tiempo, las bacterias pueden sobrevivir y reproducirse en base a probabilidades que dependen de la abundancia relativa del recurso R_i que consume cada individuo ($R_i = \omega_i/\omega_i$). Para establecer estas probabilidades se utilizó como referencia la tasa de crecimiento descrita por Monod (Monod, 1949; Shehata y Marr, 1971) y la teoría de asignación de recursos, en la cual se postula que bajo limitaciones de nutrientes las células utilizan la energía principalmente para mantener su metabolismo interno, mientras que a altas concentraciones, éstos son utilizados para el proceso de reproducción (división celular) (Kirkwood, 1977; Nyström, 2004).

A partir de estos antecedentes, se definió P_s como la probabilidad de supervivencia (Ecuación 2, Fig. 4) y P_r como la probabilidad de reproducción (Ecuación 3), donde ambas dependen de R_i , siendo α una constante que da cuenta del valor de R_i necesario para alcanzar una probabilidad igual al 50%.

- Al dividirse, cada célula consume una unidad de recurso ω_i y excreta una unidad de metabolito ω_j . Si la célula no se reproduce, consume 0,0125 unidades de ω_i para

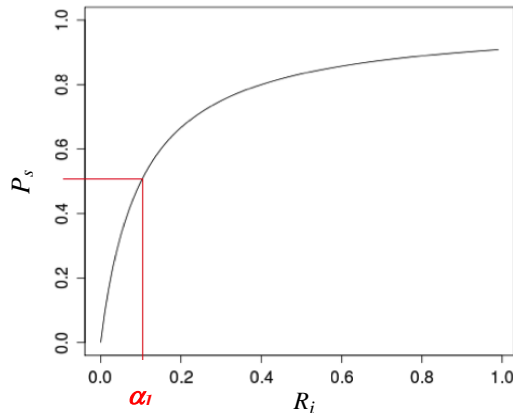


Figura 4. Probabilidad de supervivencia en función del recurso R_i .
La constante α_i da cuenta del valor de R_i necesario para alcanzar una $P_s = 0,5$.

mantener su metabolismo interno y excreta 0,0125 unidades de ω_j . La relación entre la energía utilizada para la reproducción y el mantenimiento interno fueron obtenidas de Pirt, 1965; Russell y Cook, 1995.

- Si la bacteria entra en fase de replicación, puede mutar con una probabilidad P_m , dando paso a un nuevo genotipo que es capaz de consumir y excretar distintos metabolitos escogidos aleatoriamente dentro del conjunto de metabolitos n , siendo $n = \{\omega_1, \omega_2, \dots, \omega_n\}$. Como consecuencia, se puede generar un máximo de $n(n-1)$ genotipos diferentes si consideramos que ninguna célula puede consumir la misma molécula que excreta y que cada uno es capaz de metabolizar y secretar sólo una de las moléculas.

$$P_s = \frac{1}{1 + \alpha_1 R_i^{-1}} \quad (2)$$

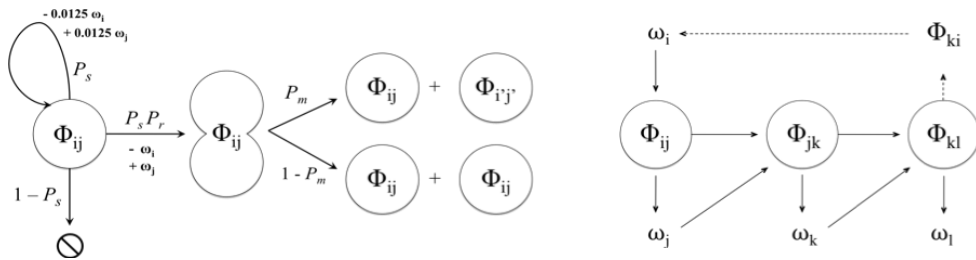
$$P_r = \frac{1}{1 + \alpha_2 R_i^{-1}} \quad (3)$$

Resumiendo, según estas reglas el sistema comienza con un conjunto de individuos isogénicos, que con el paso del tiempo pueden dar origen a nuevos genotipos, caracterizados por los metabolitos que pueden consumir ω_i y excretar ω_j . Junto con esto, los parámetros del modelo son: el conjunto de metabolitos posibles n , las constantes α_1 y α_2 de P_s y P_r respectivamente, la probabilidad de mutar P_m , la abundancia total de metabolitos ω_t y el número de iteraciones por cada simulación.

La Figura 5 contiene esquemas representativos de cómo evoluciona el sistema. La Fig. 5a posee el algoritmo del modelo, con las reglas y probabilidades necesarias para el paso de t a $t+1$, identificándose los tres procesos más importantes: supervivencia, reproducción y mutación. La Fig. 5b ejemplifica un ciclo generado a partir del reciclaje de metabolitos (cross-feeding). Finalmente, el esquema de la Fig. 5c representa cómo el algoritmo es implementado computacionalmente, donde la primera matriz corresponde a una matriz que es recibida al comienzo de cada iteración. Las filas indican los tipos de metabolitos que es capaz de utilizar cada genotipo y las columnas aquellos que son excretados. Los valores de cada casilla corresponden a las abundancias de los distintos genotipos, de acuerdo a ω_i y ω_j . El vector “metabolitos” contiene sus abundancias, las cuales permiten estimar las probabilidades P_s y P_r para cada par ‘ $i j$ ’. Las flechas rojas en la matriz final de individuos son representativas de posibles genotipos que pueden generarse en el proceso de duplicación, considerando la probabilidad de mutación P_m .

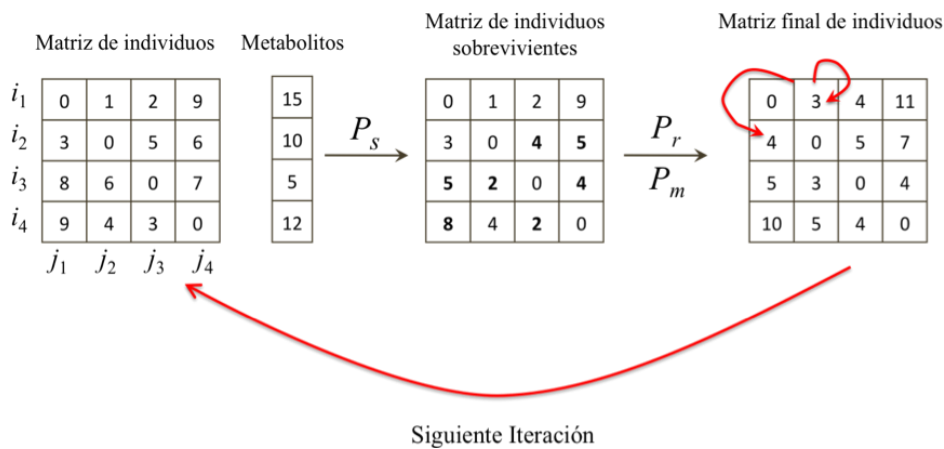
Puesto que los sistemas biológicos son altamente complejos, fue necesario realizar algunos supuestos y establecer ciertas restricciones para poder disponer de un modelo simple, pero que a su vez fuese capaz de rescatar los aspectos más sensibles del fenómeno en estudio. Los supuestos considerados en la construcción del modelo son:

- El evento de replicación es dependiente de la concentración de nutrientes. No son consideradas variaciones en el pH, temperatura ni la toxicidad generada a partir de los desechos metabólicos.



(a) Algoritmo del sistema para cada iteración.

(b) Ejemplo de una dinámica de cross-feeding.



(c) Evolución del sistema de acuerdo al algoritmo computacional.

Figura 5: Diagramas representativos de la evolución del sistema. Φ_{ij} representa un genotipo que consume i y excreta j . ω_i representa a un metabolito i , P_s es la probabilidad de supervivencia, P_r la probabilidad de reproducción, P_m la probabilidad de mutación y \emptyset el proceso de muerte celular. (a) Algoritmo que resume los posibles procesos que ocurren durante cada iteración. (b) Reciclaje de nutrientes en presencia del mecanismo de cross-feeding. (c) Implementación computacional del modelo. Las matrices dan cuenta de los cambios en las abundancias de los distintos genotipos Φ_{ij} luego de ser sometidas a las probabilidades P_s , P_r y P_m .

- La tasa de mutación es constante. Si se considera que el tamaño del genoma de *Escherichia coli* es de $\sim 4,6 \cdot 10^6$ pb y en fase estacionaria de largo plazo se ha inferido una frecuencia de mutación de 1 por cada 600 pb por genoma, entonces debiera observarse una mutación por cada 10000 células (Finkel y Kolter, 1999). Sin embargo, en el modelo se utilizaron tasas de mutaciones mayores a este valor, con el fin de alcanzar la evolución del sistema en un rango de tiempo menor.
- La energía disponible en el sistema es constante. Si bien sólo hay suministro de nutrientes a $t = 0$, las células excretan las mismas unidades de metabolitos que consumen.
- No existe una limitación espacial (modelo de campo medio).

2.2 Análisis de diversidad

Para determinar la diversidad del sistema se calculó el índice de uniformidad o *evenness* E propuesto por Pielou, el cual cuantifica qué tan equitativa es la asignación de biomasa entre los distintos genotipos (Ecuación 4, Pielou, 1966). El índice varía entre 0 y 1, donde valores cercanos a 1 representan una alta homogeneidad en las abundancias, mientras que valores próximos a 0 dan cuenta de la dominancia de algunos genotipos.

En las siguientes ecuaciones, H es el índice de diversidad de Shannon - Weaver (Ecuación 5, Shannon y Weaver, 1963) y H_{max} corresponde al valor de H cuando el sistema es totalmente homogéneo (Ecuación 6). En ambos casos p_i es la abundancia relativa del genotipo i y g es el número total de genotipos presentes en el sistema.

$$E = \frac{H}{H_{max}} \quad (4)$$

$$H = - \sum_{i=1}^g p_i \ln p_i \quad (5)$$

$$H_{max} = - \sum_{i=1}^g \frac{1}{g} \ln \frac{1}{g} = \ln g \quad (6)$$

2.3 Análisis de coexistencia y probabilidad de extinción

En primera instancia, se realizó una búsqueda exploratoria de aquellos parámetros que permitían un bajo porcentaje de extinción al término de 1000 iteraciones. Se comenzó fijando el conjunto de metabolitos en $n = 5$ y variando los otros parámetros de forma aleatoria. De este análisis se observó que para $P_m = 0,02$, $\omega_t = 1500$, $\alpha_1 = 0,1$ y $\alpha_2 = 0,15$ el porcentaje de extinción era de un 25% (1000 simulaciones) y además las poblaciones presentaban ambas fases de diversidad: selección periódica y posterior coexistencia.

A partir de estos antecedentes, se escogieron tres probabilidades de mutación ($P_m = 0,01; 0,02; 0,03$) y tres conjuntos de metabolitos distintos ($n = 5,6,7$), dejando fija la abundancia total de metabolitos ($\omega_t = 1500$) y el número de iteraciones (1000).

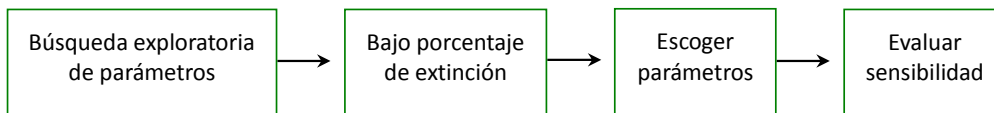
Para evaluar la sensibilidad del modelo a variaciones en las probabilidades de supervivencia y reproducción, se estudió el rango de valores de α_1 en los cuales había un cambio considerable en el porcentaje de extinción, dejando fijo el valor de α_2 en 0,15. Posteriormente se fijó α_1 en aquel valor que daba cuenta de una extinción entre el 20% y 40% para $P_m = 0,02$ (presencia de selección periódica y coexistencia).

El análisis se realizó de esta forma, puesto que realizar 1000 simulaciones para todas las posibles combinaciones de los parámetros es altamente costoso en tiempo computacional. Junto con esto, evaluar un número inferior de simulaciones no sería considerado como una muestra estadísticamente significativa, debido a los procesos

aleatorios involucrados.

Luego de realizar 1000 simulaciones para los diferentes conjuntos de parámetros, se estimó el porcentaje de extinción como el porcentaje de poblaciones que no presentan individuos vivos al término de 1000 iteraciones. Para el análisis de coexistencia se calculó el tiempo promedio al cual se alcanza el valor máximo de genotipos (dado por $n(n-1)$), incluyendo las respectivas barras de error estándar.

A continuación se muestra un esquema que resume los pasos involucrados en el análisis de sensibilidad del modelo:



* Los parámetros son: el conjunto de metabolitos posibles n , las constantes α_1 y α_2 de P_s y P_r respectivamente, la probabilidad de mutación P_m , la abundancia total de metabolitos ω_t y el número de iteraciones por cada simulación.

2.4 Ejecución del modelo

El modelo fue programado en el lenguaje estadístico R y las simulaciones fueron realizadas en los computadores disponibles en el laboratorio de Ecología de la PUC.

3 Resultados

3.1 Objetivo 1: Generar un modelo matemático capaz de simular poblaciones bacterianas bajo el mecanismo de cross-feeding.

Como se describió en la sección de métodos, el modelo desarrollado evoluciona en base a reglas y dispone de los siguientes parámetros: número máximo de metabolitos distintos n , constantes α_1 y α_2 , probabilidad de mutar P_m , abundancia total de metabolitos ω_t y el número de iteraciones por cada simulación.

Para poner a prueba el rol del reciclaje de nutrientes y la disponibilidad inicial de recursos en el sistema, primero se realizó un modelo nulo, en el cual todos los genotipos consumen del mismo metabolito y ninguno de ellos puede reutilizar las moléculas excretadas, vale decir, las mutaciones no le confieren a los individuos la capacidad de metabolizar los metabolitos excretados por otros genotipos.

La Fig. 6 muestra un resultado representativo de esta primera simulación, donde los individuos mueren rápidamente bajo privación de recursos, además de la emergencia de no más de 5 mutantes a lo largo del tiempo.

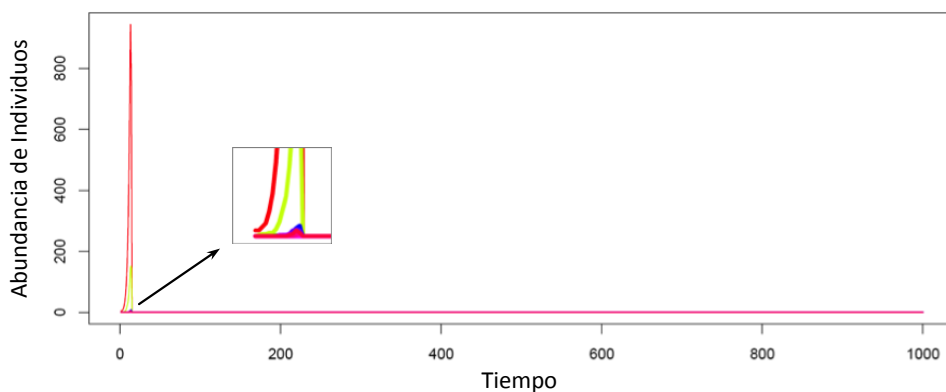


Figura 6: Dinámica poblacional en ausencia de cross-feeding. Simulación generada con $n = 5$, $\alpha_1 = 0,1$; $\alpha_2 = 0,15$; $P_m = 0,02$; $\omega_t = 1500$ y 1000 iteraciones. Cada color corresponde a un genotipo diferente.

Posteriormente, se simuló una dinámica poblacional con los mismos parámetros utilizados en el modelo nulo, pero considerando el mecanismo de cross-feeding, definido en estas condiciones como la capacidad que le confieren las mutaciones a las bacterias para utilizar uno de los posibles metabolitos excretados al medios (escogidos aleatoriamente entre el grupo de n metabolitos). Como se observa en la Fig. 7, la población permanece viva al menos 1000 iteraciones y durante las primeras 400 los genotipos emergentes predominan el sistema de forma transitoria. Sin embargo, después las mutantes ya no se excluyen entre si y coexisten de manera estable en el tiempo.

A partir de esta misma dinámica poblacional, se cuantificó la abundancia de los metabolitos. En la Fig. 8 se puede ver que al comienzo hay una fluctuación de sus abundancias, pero luego se estabilizan de manera homogénea, con valores cercanos a 300 unidades cada uno. A partir de este resultado, junto con el de la Fig. 7, se puede deducir que existe una denso-dependencia producto de la variación en las cantidades de los distintos metabolitos, y por lo tanto, la estabilidad en sus abundancias implicaría la generación de probabilidades de supervivencia y reproducción similares para todos genotipos.

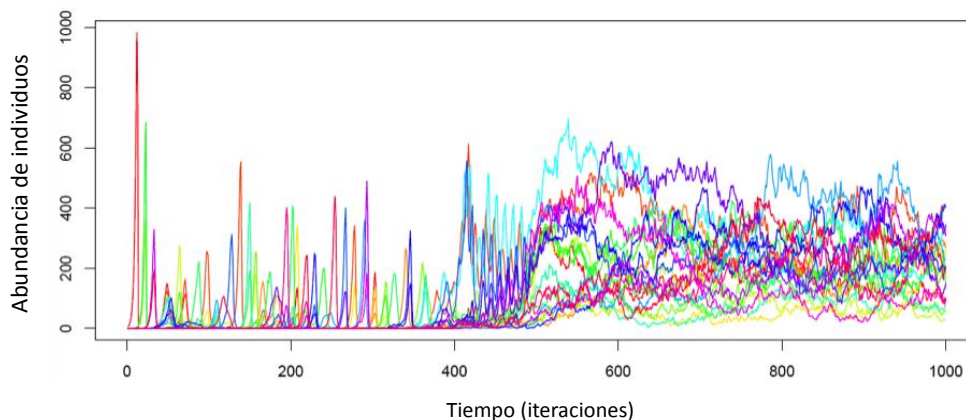


Figura 7: Dinámica poblacional en presencia de cross-feeding. Simulación realizada con $n = 5$, $\alpha_1 = 0,1$; $\alpha_2 = 0,15$; $P_m = 0,02$; $\omega_t = 1500$ y 1000 iteraciones. Cada color representa un genotipo diferente.

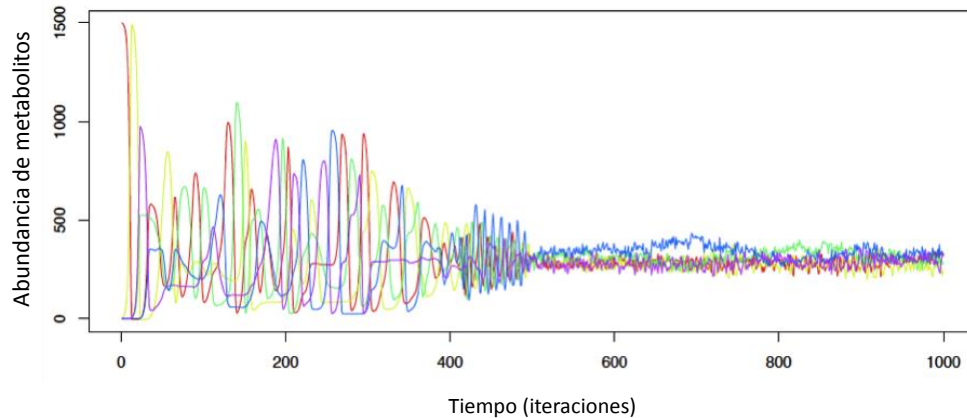
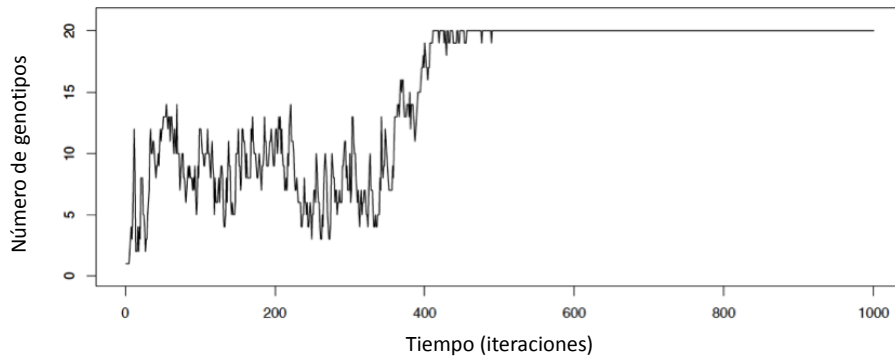


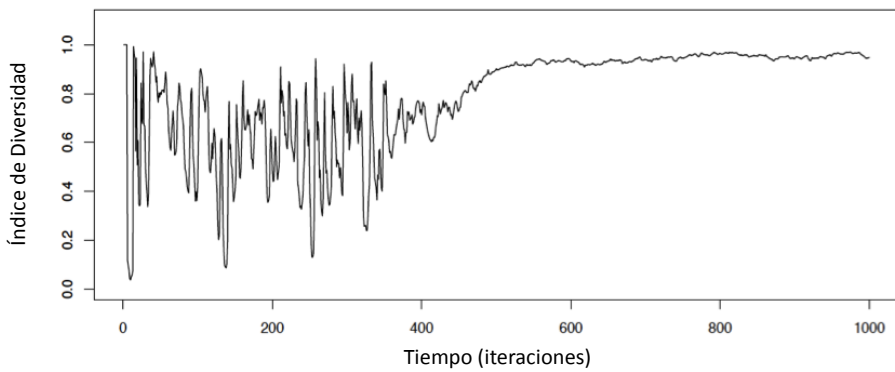
Figura 8: Abundancia de metabolitos en presencia de cross-feeding. Valores obtenidos de la dinámica poblacional de la Fig. 7. Cada color corresponde a un metabolito distinto ($n = 5$).

3.2 Objetivo 2: Determinar la presencia de selección periódica, coexistencia y la transición entre ambas fases en las poblaciones generadas.

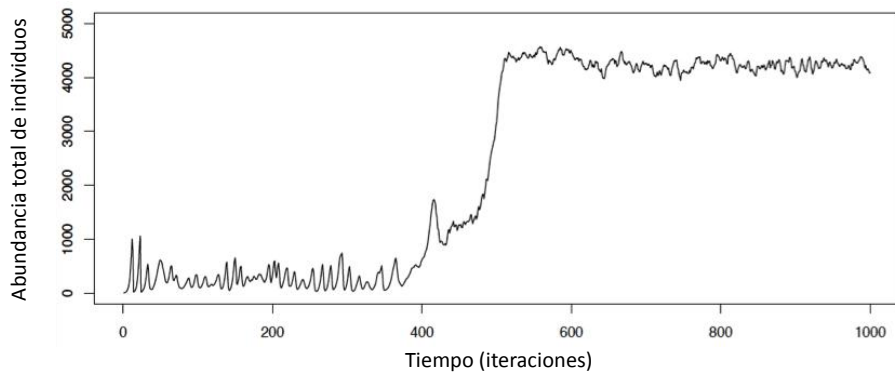
Se continuó analizando la misma población de la Fig. 7. Primero se cuantificó el número de genotipos en el tiempo (Fig. 9a). Al comienzo, se puede ver una gran variación en las mutantes coexistentes, pero luego el valor se estabiliza en el máximo, dado por $n(n-1)$. Junto con esto, se calculó el índice de diversidad de Pielou, con el fin de analizar qué tan homogéneas son las abundancias de los distintos genotipos. La Fig. 9b muestra que al comienzo existe una gran fluctuación en el tiempo en los valores de este índice, lo que da cuenta de períodos de dominancia de determinados genotipos, cuando el valor es ~ 0 . No obstante, a partir de $t = 400$ (aprox.) el índice se estabiliza en un valor cercano a 1, lo que implica la presencia de abundancias homogénea de los genotipos. Finalmente, se cuantificó la abundancia total de individuos (Fig. 9c), donde se observa un aumento significativo a la misma iteración descrita previamente ($t = 400$).



(a) Número de genotipos coexistentes.



(b) Diversidad de Genotipos



(c) Número total de individuos

Figura 9: Análisis de diversidad y abundancia total de la población. (a) Máximo de genotipos dado por $n(n - 1)$, siendo $n = 5$. (b) Índice de diversidad. (c) Estimación del número total de individuos presentes en la población.

En resumen, podemos ver que el máximo de genotipos coexistentes (Fig. 9a) se logra al mismo tiempo en que se estabilizan las abundancias de los metabolitos (Fig. 8), se alcanza un índice de diversidad cercano al máximo (Fig. 9b) y hay un incremento considerable en la abundancia total de los individuos presentes en el sistema (Fig. 9c).

3.3 Objetivo 3: Evaluar la sensibilidad del modelo.

Con el fin de determinar si los resultados obtenidos en las figuras 7, 8 y 9 son representativos y reproducibles, independiente de los parámetros utilizados y de la variación producto de los procesos aleatorios presentes en el modelo, se realizó una estimación de la probabilidad de extinción de las poblaciones y del tiempo promedio al cual se alcanza el máximo de genotipos coexistentes, como una medida de evaluación de la presencia de selección periódica y coexistencia.

Se simularon poblaciones con $n = 5, 6$ y 7 , dejando fija la energía disponible ($\omega_t = 1500$) y variando los valores de α_1 y α_2 , constantes que representan el valor de R_t necesario para alcanzar una probabilidad de 0,5 en P_s y P_r , respectivamente. En estos estudios además se evaluó la influencia de 3 probabilidades de mutación: 0,01; 0,02 y 0,03 (el detalle de los análisis se puede encontraren la sección de métodos).

La Fig. 10 muestra los resultados obtenidos para $n = 5$. En relación al análisis de extinción en función de α_1 , se observa que al disminuir la probabilidad de mutación (P_m), la probabilidad de extinción es mayor y junto con esto, el intervalo de valores de α_1 en el que ocurre el paso de 0% a 100% de extinción también es mayor (Fig. 10a izq).

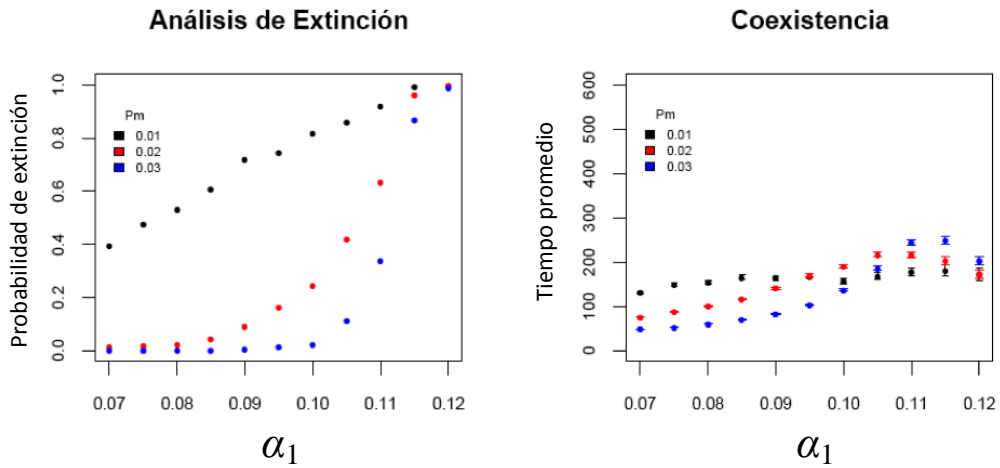
Respecto al estudio de coexistencia en función de α_1 , el gráfico de la derecha en la Fig.10a muestra que al aumentar el valor de la constante, incrementa el tiempo promedio en que se alcanza la máxima coexistencia, dada por $n(n-1)$ genotipos. Esto indica que una mayor estrictez en P_s (mayor requerimiento de metabolitos para una misma probabilidad) genera variaciones en el periodo de tiempo en que se observa selección periódica y coexistencia (intervalo posterior al tiempo promedio).

Para los análisis en función de α_2 , se fijó el valor de α_1 de acuerdo al criterio establecido en la sección de métodos. En los resultados de la Fig. 10b se ve que, al igual que para el estudio en función de α_1 , a menor P_m el porcentaje de extinción es mayor para un mismo valor de α_2 (Fig. 10b izq). En relación al análisis de coexistencia, se observa que para $n = 5$ no hay diferencias significativas entre los valores de P_m utilizados (Fig. 10b der).

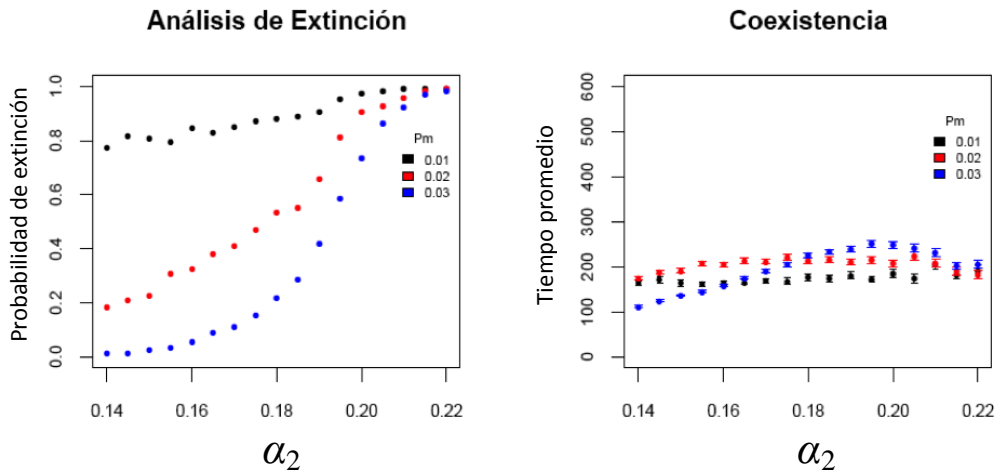
Si comparamos los resultados de $n = 5$ con $n = 6$ y $n = 7$ (Fig. 11 y Fig. 12), se puede ver un comportamiento análogo para los 3 escenarios. Al evaluar las probabilidades de extinción en función de α_1 , se observa un efecto similar en las distintas condiciones, donde las principales diferencias se ven en el rango de α_1 al cual se produce la mayor variación en el porcentaje de extinción (paso de 0% a 100%), siendo menores los valores de la constante a medida que aumenta el valor de n . Esto se puede entender si se considera que al aumentar el número de metabolitos, las abundancias absolutas se ven reflejadas en abundancias relativas menores.

Al evaluar la coexistencia en función de α_1 , se observa que al aumentar n , la pendiente de aumento del tiempo promedio es mayor y las diferencias entre las P_m son significativas (al disminuir P_m , el tiempo en el cual se alcanza la máxima coexistencia es mayor).

En relación a variaciones en función de α_2 , se ve que los resultados del análisis de extinción son similares para los 3 valores de n , tanto en el rango de la constante como en las diferencias existentes entre los valores de P_m . Finalmente, respecto al análisis de coexistencia, se observan diferencias análogas a las observadas en el comportamiento de α_1 al aumentar el número de metabolitos disponibles en el sistema.

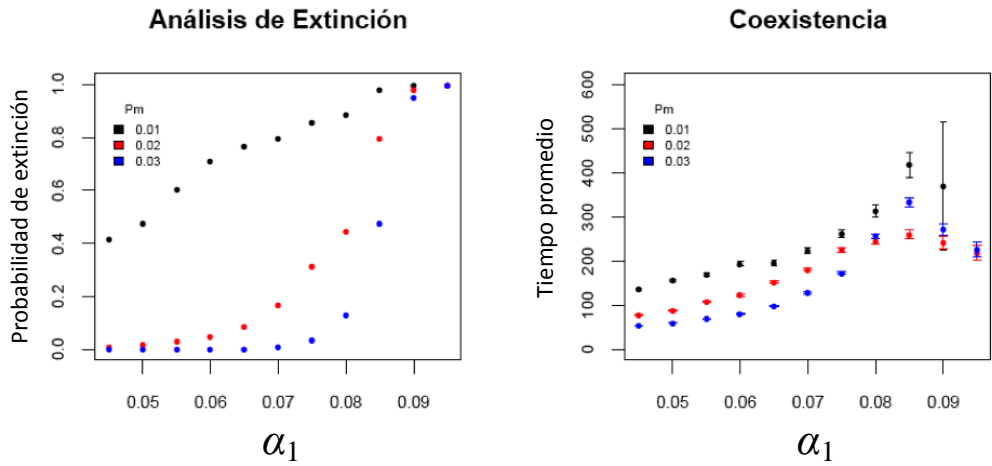


(a) Probabilidad de Extinción y análisis de coexistencia en función de α_1

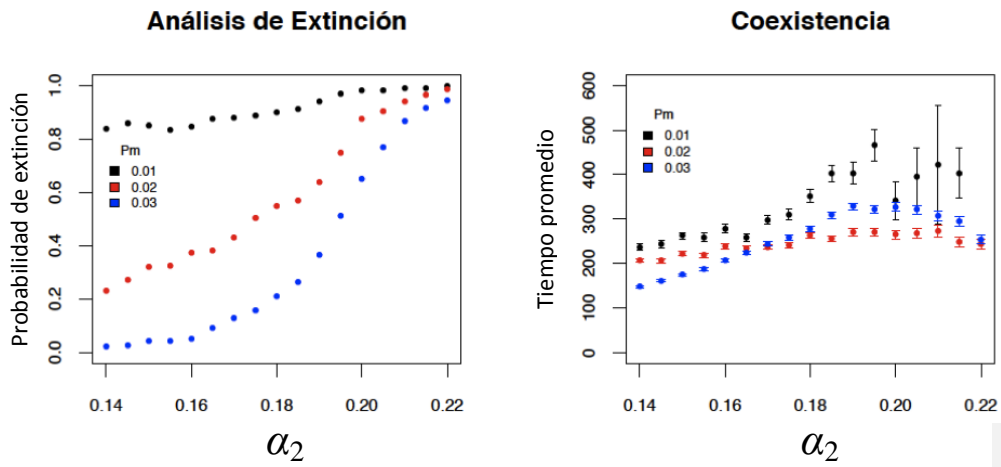


(b) Probabilidad de Extinción y análisis de coexistencia en función de α_2

Figura 10: Análisis de extinción y coexistencia para 5 metabolitos. Se utilizó $\omega_t = 1500$ y 1000 iteraciones para todas las simulaciones. (a) Simulación realizada con $\alpha_2 = 0,15$. (b) Simulación realizada con $\alpha_1 = 0,1$.

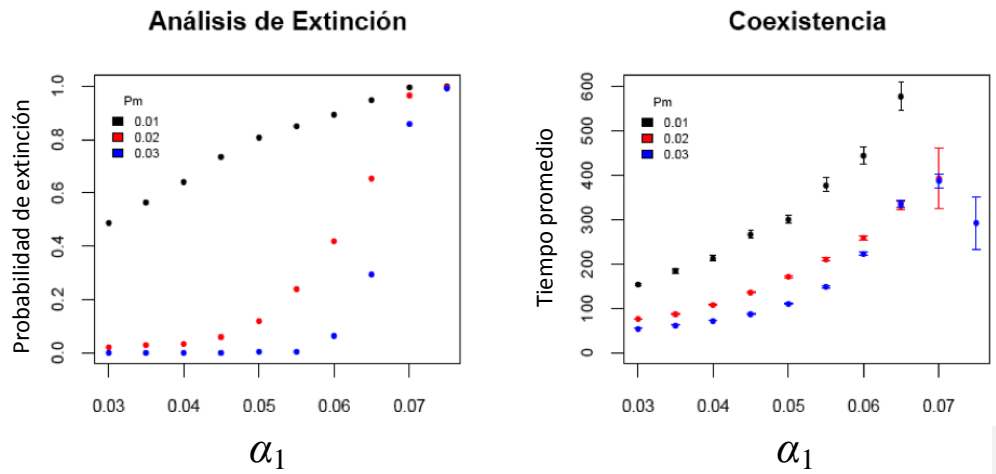


(a) Probabilidad de Extinción y análisis de coexistencia en función de α_1

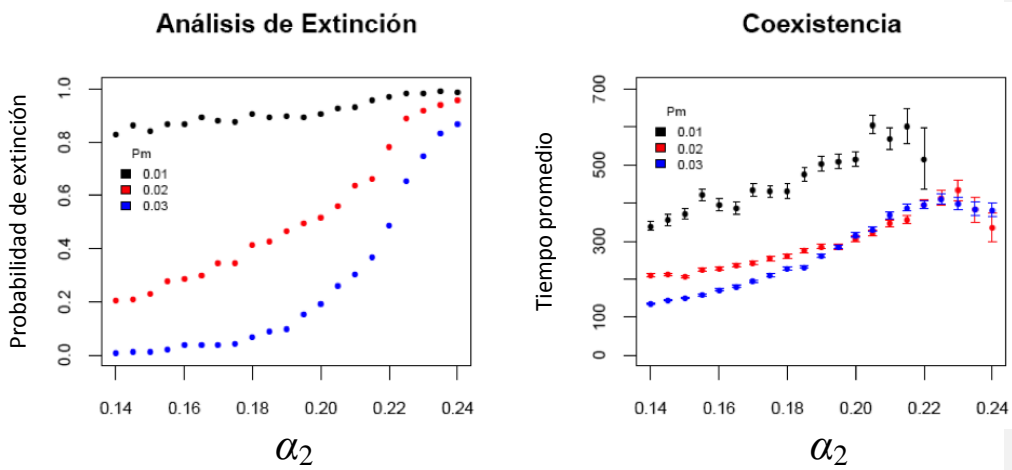


(b) Probabilidad de Extinción y análisis de coexistencia en función de α_2

Figura 11: Análisis de extinción y coexistencia para 6 metabolitos. Se utilizó $\omega_t = 1500$ y 1000 iteraciones para todas las simulaciones. (a) Simulación realizada con $\alpha_2 = 0,15$. (b) Simulación realizada con $\alpha_1 = 0,075$.



(a) Probabilidad de Extinción y análisis de coexistencia en función de α_1



(b) Probabilidad de Extinción y análisis de coexistencia en función de α_2

Figura 12: Análisis de extinción y coexistencia para 7 metabolitos. Se utilizó $\omega_t = 1500$ y 1000 iteraciones para todas las simulaciones. (a) Simulación realizada con $\alpha_2 = 0,15$. (b) Simulación realizada con $\alpha_1 = 0,055$.

4 Discusión

El propósito principal de este trabajo fue estudiar el efecto del mecanismo cross-feeding en la dinámica de diversidad observada en cultivos bacterianos de largo plazo. La forma de abordar este objetivo fue a través de la generación de un modelo matemático, capaz de proveer un contexto conceptual que permita guiar una futura investigación empírica.

Diferentes investigaciones se han enfocado en comprender dinámicas de diversidad en poblaciones microbianas, sin embargo, la mayoría de estos estudios se realizan bajo un suministro constante de nutrientes (generalmente glucosa), lo que no refleja el estrés real presente en los ecosistemas naturales. Por esta razón, nuestro trabajo consideró un sistema análogo a cultivos de largo plazo, al cual no se le añade ningún componente luego de la condición inicial.

Dentro del modelo de estudio escogido, se planteó el mecanismo de cross-feeding como aquel que permite explicar las dinámicas de diversidad presentes, dado que la reutilización de metabolitos facilitaría una cooperación entre los individuos, afectando directamente la coexistencia y mantención de una población heterogénea por largos periodos de tiempo. A su vez, esto permitiría explicar la existencia de las dos fases de diversidad: selección periódica y coexistencia, como consecuencia de la transición entre un reciclaje lineal y la formación de ciclos que permiten un suministro constante de determinados metabolitos.

Se formuló como primer objetivo generar un modelo matemático, capaz de simular poblaciones bacterianas bajo las condiciones mencionadas. Éste se llevó a cabo a través de la creación de un modelo que evoluciona en base a probabilidades de supervivencia y reproducción, ambas dependientes de la abundancia de los metabolitos consumidos por cada genotipo, además de considerar una probabilidad de mutación constante en el tiempo. Si bien se sabe que la frecuencia de mutación puede variar temporalmente

dependiendo de las condiciones del sistema (nutrientes, temperatura, densidad poblacional, etc.), estas probabilidades se mantuvieron constante para no interferir en el estudio del mecanismo propuesto.

Junto con esto, el cross-feeding se planteó de la siguiente forma: a $t = 0$ se comienza con una población que posee individuos genéticamente iguales, la cual evoluciona en el tiempo, debido a las mutaciones que ocurren en presencia de la probabilidad P_m , dando paso a nuevos genotipos capaces de consumir y excretar metabolitos distintos, escogidos aleatoriamente en el conjunto n .

Los resultados de este objetivo mostraron en primer lugar que en ausencia de un reciclaje, la población muere rápidamente (Fig. 6), lo que sugiere la importancia de la reutilización de metabolitos presentes en el sistema. En evidencias empíricas (Zinser y Kolter, 1999, 2000, 2004; Rozen *et al.*, 2009) se ha visto que este reciclaje no sólo se limita a los productos de excreción, sino que también podría estar relacionado al consumo de moléculas provenientes de células muertas, tales como aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos.

En segundo lugar se mostró que el cross-feeding favoreció la supervivencia de la población al menos por 1000 unidades de tiempo, donde fue posible observar fenómenos de selección periódica y coexistencia (Fig. 7). Al estudiar la fluctuación de los metabolitos se vio que el paso entre ambos fenómenos estaba acompañado de una estabilidad en sus abundancias relativas (Fig. 8). La simetría en estas interacciones positivas podría estar dada por la convergencia en las abundancias de las distintas mutantes y en las abundancias de los metabolitos, debido a la existencia de una densidad-dependencia entre el genotipo productor de un metabolito y su genotipo consumidor. Esto se debe a que una mayor abundancia del primero genera un aumento de dicho sustrato, y por lo tanto las probabilidades de supervivencia y reproducción del segundo genotipo incrementan, generando a su vez un efecto sobre la adecuación biológica. Un estudio teórico reciente reafirma la idea de que la coexistencia de distintos genotipos es producto de una equivalencia en sus adecuaciones biológicas, argumentando que esto

provocaría la emergencia de neutralidad como resultado del proceso adaptativo en un hábitat finito (Keymer *et al.*, 2008).

El segundo objetivo de este trabajo fue estudiar la dinámica de diversidad emergente en las poblaciones generadas. Como se observa en la Fig. 9, el aumento en la riqueza de mutantes se ve acompañado de un índice de diversidad cercano a 1 y un crecimiento significativo en la población. Durante la fase de selección periódica, la diversidad de genotipos es menor a lo observado en la fase de coexistencia, además de una fuerte desigualdad en las abundancias de las distintas mutantes. En la fase de coexistencia, por otro lado, la diversidad alcanza su máximo valor y la abundancia total de la población incrementa significativamente.

En términos ecológicos, podemos pensar que la coexistencia emerge como una consecuencia de la diversificación del nicho ecológico, concepto definido como el conjunto de factores que determinan la distribución y abundancia de una población o especie. En este contexto, la diferenciación en el nicho se debe a la especialización de los genotipos por el consumo de un determinado metabolito, de lo cual se infiere que la diversidad máxima se alcanza cuando todos los nichos disponibles son utilizados. En ambientes naturales, por ejemplo, existen ciclos biogeoquímicos conformados por consorcios bacterianos, donde también es posible observar diversificación en el nicho, junto con una complementariedad en el rol que cumple cada especie en el ecosistema (Finlay *et al.*, 1997). Haciendo una analogía, estos sistemas se comportan de manera similar a cultivos microbianos en presencia de cross-feeding, en los cuales los distintos genotipos se ven representados por las distintas especies y donde los metabolitos, en general, son los compuestos químicos que conforman los ciclos biogeoquímicos.

Otra de las posibles causas del aumento en la riqueza de especies (en nuestro contexto, la riqueza de genotipos) es la presencia de interacciones recíprocas que generan ciclos de cooperación, entendido en términos generales como procesos de

facilitación (Fridley, 2001). Junto con esto, nuestros resultados respaldan las teorías que plantean que un aumento en la riqueza de especies favorece la productividad (biomasa/unidad de tiempo) y como consecuencia la estabilidad de las funciones ecosistémicas (Tilman, 1996; Tilman *et al.*, 1996; Finlay *et al.*, 1997). Una investigación desarrollada en comunidades microbianas ha corroborado que un aumento en la homogeneidad de las abundancias de las distintas especies favorece la estabilidad del sistema, al presentar una mayor resistencia a fluctuaciones ambientales y por lo tanto, una mayor robustez a situaciones de estrés (Wittebolle *et al.*, 2009).

Sin embargo, el resultado observado en la Fig. 9c, donde se ve un aumento en el tamaño total de la población al incrementar la diversidad, no son similares a las evidencias experimentales existentes de fase estacionaria de largo plazo, en los cuales la población tiende a mantenerse constante. Esto se puede comprender si se toma en cuenta que el modelo propuesto mantiene la abundancia de los metabolitos constante, pero en la realidad los organismos utilizan la materia orgánica para la producción de energía (ATP) y por lo tanto, la abundancia disponible en el sistema disminuye en el tiempo.

Finalmente, el último objetivo planteado fue evaluar la sensibilidad del modelo. A partir de las figuras 10, 11 y 12 podemos concluir que el porcentaje de extinción depende del valor de la constante que forma parte de la probabilidad de supervivencia. Si se considera que α_1 da cuenta de la abundancia relativa del metabolito a la cual P_s es igual a 0,5; entonces se puede entender que a medida que aumenta el valor de n , se requiere de una constante más pequeña para observar un fenómeno similar, debido a que la presencia de una cantidad mayor de metabolitos puede generar una disminución en las abundancias relativas, aunque las abundancias absolutas sean similares.

De esta forma, si el número de metabolitos disponible en los ecosistemas microbianos es mucho mayor que 7 (n más alto utilizado en estos análisis), entonces con el modelo planteado, la población se extinguiría rápidamente. Además, éste requiere de

la presencia de ciclos para mantener el recambio de los metabolitos constante, los cuales son poco estables en el tiempo. Por lo tanto, esto sugiere que los distintos mecanismos involucrados a los procesos de diversidad debieran actuar de manera simultánea, generando una sinergia reflejada en las complejas interacciones que existen en la naturaleza. Podemos pensar que el cross-feeding no excluye la participación de fenotipos aventajados, capaces de utilizar compuestos orgánicos proveniente de células muertas, e incluso esto favorecería la diversificación de los nichos. Además, tampoco se descarta la presencia de selección dependiente de frecuencia y de una compensación demográfica, producto de diferencias en la afinidad por los metabolitos entre los distintos genotipos y puesto que estos podrían metabolizar más de un tipo de sustrato.

Resumiendo, las conclusiones de este tercer objetivo son que el modelo es sensible a las funciones que definen las probabilidades de supervivencia y reproducción (en términos de extinción), pero es robusto a las fases de diversidad generadas.

En términos generales, a partir de este trabajo se concluye que el cross-feeding participa en la supervivencia y en la existencia de las distintas dinámicas de diversidad observadas en poblaciones de largo plazo, bajo estrés de nutrientes, a diferencia de lo planteado en trabajos anteriores, donde se propone que este mecanismo es menos probable de encontrar en dichas condiciones, en relación a otras formas de cultivo (como quimiostatos) (Rozen y Lenski, 2000).

Por otro lado, es importante tener en cuenta que el mecanismo asociado a emergencia de diversidad habitualmente es el proceso de mutación. En general, se atribuye que éste es el principal responsable de las dinámicas adaptativas, tomando en cuenta que las mutaciones pueden ser favorables dependiendo de las condiciones del ambiente en que se encuentran los individuos. No obstante, en poblaciones bacterianas la transferencia horizontal de genes es trascendental para la supervivencia en condiciones de estrés, lo que sugiere que también debiera considerarse en estos análisis.

Por último, es importante tener en cuenta que los modelos se construyen con la finalidad de mejorar la comprensión de un problema teórico, así como los experimentos son generados para mejorar nuestro entendimiento de un problema empírico. Además se debe considerar que ningún modelo tiene como objetivo duplicar en detalle lo que ocurre en el mundo real, así como tampoco existe un modelo único adecuado para un determinado propósito, esto ya que no es posible maximizar simultáneamente generalidad, realismo y precisión (Caswell, 1988).

5 Conclusiones

- En ausencia de cross-feeding la población muere rápidamente, lo que sugiere la importancia de la reutilización de elementos generados en el sistema, ya sea provenientes de la excreción por parte de los mismos individuos o de células muertas.
- El reciclaje de metabolitos es capaz de explicar los fenómenos de selección periódica y coexistencia observados en poblaciones bacterianas bajo privación de nutrientes, como consecuencia de la diversificación en los nichos ecológicos de cada genotipo.
- El aumento en la diversidad, acompañado de abundancias homogéneas de los genotipos y un incremento considerable en el número total de individuos en fase de coexistencia, son resultados que respaldan las teorías planteadas sobre una estrecha relación entre riqueza de especies, productividad y estabilidad del sistema.
- El modelo propuesto presenta sensibilidad frente a las funciones que definen las probabilidades de supervivencia y reproducción, pero se muestra robusto a la presencia de distintas fases de diversidad (selección periódica y coexistencia).

6 Proyecciones

Se pueden realizar distintos tipos de proyecciones, dependiendo del enfoque que sea considerado. Por ejemplo, en relación al modelo, las futuras investigaciones podrían ser las siguientes:

- Realizar un modelo analítico, utilizando ecuaciones diferenciales. Esto le daría una mayor robustez al modelo planteado en este trabajo, si los resultados obtenidos en ambas condiciones son similares.
- Pasar de un modelo cualitativo a uno cuantitativo. De esta forma, se podrían utilizar parámetros que reflejen las condiciones reales de los cultivos utilizados como referencia en este estudio.

En relación a futuras aproximaciones empíricas, podemos considerar las siguientes investigaciones en cultivos de largo plazo:

- Evaluar a través de resonancia magnética nuclear la presencia de metabolitos intermediarios de la glicólisis y del ciclo de Krebs.
- Secuenciar los distintos genotipos y determinar sus mutaciones. Identificar cuáles son los genes involucrados y si es que estos se relacionan con cross-feeding.

Por otro lado, se pueden hacer proyecciones orientadas al estudio de emergencia y mantención de diversidad en patrones espaciales de colonias de *E. coli*:

- Evaluar la presencia de fenotipos aventajados y si estos son capaces de dominar en el sistema o si existe una limitación espacial.
- Determinar la existencia del mecanismo de cross-feeding, a través un estudio a nivel genético y uno a nivel químico (presencia de metabolitos secundarios).

7 Referencias

- Allen**, A. P., Brown, J. H., Gillooly, J. F. (2002). Global biodiversity, biochemical kinetics, and the energetic-equivalence rule. *Science*, 297(5586): 1545 - 1548.
- Atwood**, K. C., Schneider, L. K., Ryan, F. J. (1951). Periodic selection in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37(3): 146 - 155.
- Brown**, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., West, G. B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85(7): 1771 - 1789.
- Bull**, J. J., Harcombe, W. R. (2009). Population dynamics constrain the cooperative evolution of Cross-Feeding. *Public Library of Science ONE*, 4(1): e4115.
- Caswell**, H. (1988). Theory and models in ecology: A different perspective. *Bulletin of the Ecological Society of America*, 69: 102 - 109.
- Doebeli**, M. (2002). A model for the evolutionary dynamics of cross-feeding polymorphisms in microorganisms. *Population Ecology*, 44(2): 59 - 70.
- Dykhuisen**, D. E. (1990). Experimental studies of natural selection in bacteria. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21(1): 373 - 398.
- Finkel**, S. E. (2006). Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2): 113 - 120.
- Finkel**, S. E., Kolter, R. (1999). Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7): 4023 - 4027.
- Finlay**, B. J., Maberly, S. C., Cooper, J. I. (1997). Microbial diversity and ecosystem function. *Oikos*, 80: 209 - 213.
- Fridley**, J. D. (2001). The influence of species diversity on ecosystem productivity: how, where, and why. *Oikos*, 93: 514 - 526.
- Gause**, G. F. (1934). *The struggle for existence*. Williams & Wilkins, Baltimore, 163 p.
- Hardin**, G. (1960). The competitive exclusion principle. *Science*, 131(3409): 1292 - 1297.
- Helling**, R. B., Vargas, C. N., Adams, J. (1987). Evolution of *Escherichia coli* during

growth in a constant environment. *Genetics*, 116(3): 349 - 358.

Hubbell, S. P. (1997). A unified theory of biogeography and relative species abundance and its application to tropical rain forests and coral reefs. *Coral Reefs*, 16(5): S9 - S21.

Huisman, J., Johansson, A. M., Folmer, E. O., Weissing, F. J. (2001). Towards a solution of the plankton paradox: the importance of physiology and life history. *Ecology Letters*, 4(5): 408 - 411.

Keymer, J. E., Fuentes M. A., Marquet P. A., (2008). Diversity emerging: From competitive exclusion to neutral coexistence in ecosystems. Santa Fe Institute Working Papers.

Kirkwood, T. B. (1977). Evolution of ageing. *Nature*, 270(5635): 301 - 304.

Krone, S. M., Guan, Y. (2006). Spatial self-organization in a cyclic resource-species model. *Journal of Theoretical Biology*, 241(1): 14 - 25.

Lenski, R. E., Travisano, M. (1994). Dynamics of adaptation and diversification: A 10000 Generation experiment with bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15): 6808 - 6814.

Maharjan, R., Seeto, S., Notley-McRobb, L., Ferenci, T. (2006). Clonal adaptive radiation in a constant environment. *Science*, 313(5786): 514 - 517.

Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3: 371 - 394.

Morita, R. Y. (1988). Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation survival in nature. *Canadian Journal of Microbiology*, 34(4): 436 - 441.

Nyström, T. (2004). Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? *Molecular Microbiology*, 54(4): 855 - 862.

Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13: 131 - 144.

Pirt, S. J. (1965). The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 163(991): 224 - 231.

Porcher, E., Tenaillon, O., Godelle, B. (2001). From metabolism to polymorphism in bacterial populations: A theoretical study. *Evolution*, 55(11): 2181 - 2193.

Riley, M. S., Cooper, V. S., Lenski, R. E., Forney, L. J., Marsh, T. L. (2001). Rapid

phenotypic change and diversification of a soil bacterium during 1000 generations of experimental evolution. *Microbiology*, 147(4): 995 - 1006.

Rosenzweig, R. F., Sharp, R. R., Treves, D. S., Adams, J. (1994). Microbial evolution in a simple unstructured environment: Genetic differentiation in *Escherichia coli*. *Genetics*, 137(4): 903 - 917.

Rozen, D. E., Lenski, R. E. (2000). Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. VIII. Dynamics of a balanced polymorphism. *The American Naturalist*, 155(1): 24 - 35.

Rozen, D. E., Philippe, N., de Visser, J. A., Lenski, R. E., Schneider, D. (2009). Death and cannibalism in a seasonal environment facilitate bacterial coexistence. *Ecology Letters*, 12(1): 34 - 44.

Russell, J., Cook, G. (1995). Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiological Reviews*, 59(1): 48 - 62.

Shannon, C. E., Weaver, W. (1963). *The mathematical theory of communication*. University Illinois Press, Urbana, 125 p.

Shehata, T. E., Marr, A. G. (1971). Effect of nutrient concentration on the growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 107(1): 210 - 216.

Tilman, D. (1996). Biodiversity: Population versus ecosystem stability. *Ecology*, 77: 350 - 363.

Tilman, D., Wedin, D., Knops, J. (1996). Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature*, 379: 718 - 72.

Turner, P. E., Souza, V., Lenski, R. E. (1996). Tests of ecological mechanisms promoting the stable coexistence of two bacterial genotypes. *Ecology*, 77(7): 2119 - 2129.

Volkov, I., Banavar, J. R., Hubbell, S. P., Maritan, A. (2007). Patterns of relative species abundance in rainforests and coral reefs. *Nature*, 450(7166): 45 - 49.

Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., Vos, P. D., Verstraete, W., Boon, N. (2009). Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature*, 458(7238): 623 - 626.

Zambrano, M., Siegele, D., Almiron, M., Tormo, A., Kolter, R. (1993). Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science*, 259(5102): 1757 - 1760.

Zinser, E. R., Kolter, R. (1999). Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 181(18): 5800 - 5807.

Zinser, E. R., Kolter, R. (2000). Prolonged stationary phase incubation selects for *lrp* mutants in *Escherichia coli* k-12. *Journal of Bacteriology*, 182: 4361 - 4365.

Zinser, E. R., Kolter, R. (2004). *Escherichia coli* evolution during stationary phase. *Research in Microbiology*, 155(5): 328 - 336.