



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE  
ESCUELA DE INGENIERIA

**CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO  
DINÁMICO BASADO EN  
INTERACCIONES METABÓLICAS  
ENTRE ESPECIES DEL MICROBIOMA  
INTESTINAL INFANTIL**

**FRANCISCO MATÍAS PINTO CHÁVEZ**

Tesis para optar al grado de  
Magister en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:  
**DANIEL GARRIDO CORTÉS**

Santiago de Chile, (Octubre, 2017)

© 2017, Francisco Matías Pinto Chávez



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE  
ESCUELA DE INGENIERIA

# **CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO DINÁMICO BASADO EN INTERACCIONES METABÓLICAS ENTRE ESPECIES DEL MICROBIOMA INTESTINAL INFANTIL**

**FRANCISCO MATÍAS PINTO CHÁVEZ**

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

**DANIEL GARRIDO**

**MARÍA RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ**

**PAOLA NAVARRETE**

**FRANCISCO SUÁREZ**

Para completar las exigencias del grado de  
Magister en Ciencias de la Ingeniería

Santiago de Chile, (Octubre, 2017)

A mis Padres, hermanas y amigos,  
que me apoyaron mucho, he hicieron  
esto posible.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer a mi profesor guía Daniel Garrido, por apoyarme durante el desarrollo de mi tesis de magister. Quien además de ser un buen guía, respondiendo y orientando cualquier duda en el largo camino, fue un excelente amigo y profesional, que transmite su emoción por la ciencia.

Quiero agradecer también al profesor Eduardo Agosín y al equipo del Laboratorio de Biotecnología por brindarnos un espacio donde trabajar y por la continua cooperación con todos los miembros de su laboratorio.

Al profesor J. Ricardo Pérez por ser un excelente guía en la generación del modelo, pues estuvo presente bajo cualquier problema durante la realización de la tesis.

También agradecer a todos mis compañeros de magister, y amigos, que soportaron cada una de mis iras y molestias cuando algo no resultaba: Magdalena Ribbeck, Kritsye Leiva, Min Bag, Aline Ovalle, Gonzalo Alcaíno, Valentina Frenkel, Juan Pablo Pedreros, Natalia Gutiérrez, Carolina Veneros, Pablo Vergara y Gonzalo Marchant. Además de amigos que brindaron sus conocimientos para lograr esta ardua tarea: Daniel Medina, Pamela Thomson, Verónica Ortúzar, Javiera Pérez, Ricardo Luna, Javiera López, Max Ibaceta y Paulina Torres.

Finalmente, agradecer a mi familia. Mi padre, Santiago, quien fue un pilar fundamental en toda mi carrera universitaria, junto a sus consejos durante el período de tesis. Mi madre, Érika, por su completo apoyo ante cualquier decisión tomada en el camino. Finalmente a mis ambas hermanas, Carolina y Fernanda, quienes nunca perdieron la confianza en que este sueño será cumplido.

A todos, muchas gracias por su confianza, cariño, comprensión y apoyo incondicional en esta etapa tan importante en mi vida.

## INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
INDICE DE TABLAS .....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Microbioma intestinal infantil.....	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.2 Establecimiento.....	1
1.1.3 Microbioma: Salud y enfermedades .....	3
1.1.4 Definición del consorcio e interacciones .....	5
1.2 Modelos computacionales de simulación del microbioma .....	6
1.2.1 Generalized Additive Models (GAM) .....	7
1.2.2 Reconstrucción metabólica a escala genómica (GSMR).....	8
1.2.3 Modelos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) ..	10
1.3 Motivación .....	12
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	13
2.1 Hipótesis.....	13
2.2 Objetivo general .....	13
2.3 Objetivos específicos.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
3.1 Reactivos .....	14
3.2 Microorganismos y medios de cultivo .....	15
3.2.1 Medios complejos .....	16
3.3.3 mZMB1.....	16
3.2 Desarrollo del modelo .....	19

3.3.1	Modelo de una bacteria.....	19
3.3.2	Generación de los co-cultivos.....	21
3.3.3	Fitting de parámetros .....	22
3.3.4	Análisis de pre/post-regresión .....	23
3.4	Experimento de co-cultivo <i>batch</i> en biorreactor .....	24
3.5	Análisis de muestras.....	24
3.5.1	Extracción de ADN.....	25
3.5.2	Cuantificación de especies bacterianas por qPCR .....	26
3.5.3	Cuantificación de azúcares (método del Fenol-Ácido sulfúrico) ..	28
3.5.4	Cuantificación de acetato y lactato (HPLC) .....	28
4.	RESULTADOS .....	29
4.1	Construcción de un modelo cinético de consorcios bacterianos en base a inhibiciones causadas por metabolitos intermediarios .....	30
4.2	Calibración del modelo en base a resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo de co-cultivos pareados .....	32
4.2.1	Parámetros fijados en mono-cultivo .....	32
4.2.2	Parámetros encontrados en co-cultivos pareados .....	34
4.3	Validación experimental del modelo.....	40
4.3.1	Co-cultivo de 4 bacterias en mono-cultivo .....	41
4.3.2	Co-cultivo de 4 bacterias en reactor biológico .....	44
4.3.3	Identificabilidad de parámetros .....	47
4.3.4	Sensibilidad de parámetros .....	49
4.4	Simulación caso bacteriostático .....	51
5.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	53
6.	PROSPECCIONES.....	56
	BIBLIOGRAFIA.....	57
	A N E X O S.....	65
	Anexo A : Seminario presentado en Copec-UC.....	66
	Anexo B : Seminario presentado en congreso Cambridge.....	67

Anexo C : PUBLICACIÓN 1 – MODELING METABOLIC INTERACTIONS IN A CONSORTIUM OF THE INFANT GUT MICROBIOME.....	68
Anexo D : PUBLICACIÓN – PREBIOTICS MEDIATE MICROBIAL INTERACTIONS IN A CONSORTIUM OF THE INFANT GUT MICROBIOME	69
Anexo E : Código Matlab® de las ecuaciones del modelo general de mono-cultivo bacteriano .....	70
Anexo F : Código Matlab® de las ecuaciones del modelo DE co-cultivo bacteriano pareado. ....	71
Anexo G : Código Matlab® de las ecuaciones del modelo de consenso bacteriano – 4 BACTERIAS.....	73
Anexo H : Código Matlab® de la búsqueda de parámetros utilizando el paquete SSmGO para monocultivo .....	76
Anexo I : Código Matlab® de la búsqueda de parámetros utilizando el paquete SSmGO para co-cultivo pareado.....	78

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 3-1. Bacterias utilizadas en el consorcio infantil. ....	15
Tabla 3-2. Componentes y concentraciones de mZMB1 .....	16
Tabla 3-3. Elementos utilizados en extracción de ADN, protocolo adaptado por Daniel Medina. ....	25
Tabla 3-4. Reacción qPCR realizada en <i>MicroAmp Fast Optical Plates</i> y analizadas en el equipo <i>AriaMx Real-Time PCR System</i> . ....	27
Tabla 3-5. Partidores utilizados en la cuantificación de las especies bacterianas en el co-cultivo. ....	27
Tabla 4-1. Parámetros encontrados vía <i>Scatter Search</i> utilizando el <i>toolbox SSmGO</i> en <i>Matlab</i> ® para monocultivo. ....	33
Tabla 4-2. Error calculado para datos de mono-cultivo. ....	33
Tabla 4-3. Parámetros finales encontrados via <i>Scatter Search</i> para co-cultivos. ....	39
Tabla 4-4. Parámetros de interacción encontrados en la optimización de co-cultivos pareados. ....	39
Tabla 4-5. Error calculado para datos de co-cultivo. ....	40
Tabla 4-6. Valor de la función objetivo en el co-cultivo de cuatro-bacterias en el cultivo en placas. ....	43
Tabla 4-7. Valor de la función objetivo en el co-cultivo de 4-bacterias en el cultivo en biorreactor. ....	45

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1-1. Factores que afectan el desarrollo del microbioma intestinal los primeros meses de vida .....	2
Figura 1-2. Simulación de co-cultivo realizado a través de GSMR entre <i>Bacteroides caccae</i> ATCC 43185 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103 .....	8
Figura 1-3. Resumen de grupos funcionales entre las bacterias del microbioma intestinal adulto .....	10
Figura 4-1. Representación general del modelo de consorcio bacteriano.....	31
Figura 4-2. Consumo de FOS en el tiempo de co-cultivos pareados .....	35
Figura 4-3. Cambios en población bacteriana en el crecimiento en FOS, expresado como porcentaje del co-cultivo en el tiempo. ....	36
Figura 4-4. . Concentración de acetato en los co-cultivos pareados .....	37
Figura 4-5. Concentración de Lactato en los co-cultivos pareados .....	38
Figura 4-6. Consumo de FOS en el tiempo de co-cultivos de cuatro bacterias en placas.....	42
Figura 4-7. Cambios en población bacteriana en el crecimiento en FOS en placas, expresado como porcentaje del co-cultivo en el tiempo .....	42
Figura 4-8. Concentración de acetato en el co-cultivo de cuatro bacterias en placas	43
Figura 4-9. Concentración de lactato en los co-cultivo de cuatro bacterias en placas.	43
Figura 4-10. Consumo de FOS en el tiempo de co-cultivos de cuatro bacterias en biorreactor .....	44
Figura 4-11. Cambios en población bacteriana en el crecimiento en FOS en biorreactor, expresado como porcentaje del co-cultivo en el tiempo.....	45
Figura 4-12. Concentración de acetato en el co-cultivo de cuatro bacterias en biorreactor. ....	46
Figura 4-13 Concentración de lactato en los co-cultivo de cuatro bacterias en biorreactor. ....	46
Figura 4-14. Identificabilidad de parámetros del modelo .....	48

Figura 4-15. Sensibilidad global de los parámetros del modelo .....	49
Figura 4-16. Variación de los valores de las ODE (en g/L) a causa de un cambio aleatorio de $\pm 5\%$ en un parámetro en 5000 iteraciones .....	51
Figura 4-17. Co-cultivo de 4 bacterias bajo el efecto de una sustancia bacteriostática, con las concentraciones iniciales del cultivo en placas.....	52

## RESUMEN

El microbioma intestinal es una comunidad microbiana compleja que tiene una influencia importante en el huésped. Las interacciones microbianas en el intestino están influenciadas por sustratos de la dieta, especialmente polisacáridos complejos. En este ambiente, productos de degradación de polisacáridos más complejos, y de ácidos grasos de cadena corta liberados al medio por microorganismos, pueden ser utilizados por otros. El poder entender las fuerzas que guían el desarrollo del microbioma intestinal y su composición es importante para determinar su rol en salud y en la aplicación del microbioma intestinal como una herramienta terapéutica. Recientemente, aproximaciones desde el modelamiento matemático, como análisis de modelos y series de tiempo, modelos metabólicos a escala genoma, han sido útiles para predecir las interacciones microbianas. En este estudio, se siguió un enfoque *bottom-up* para desarrollar un modelo matemático basado en ecuaciones de crecimiento microbiano, pero que incorporan interacciones metabólicas entre microorganismos. El modelo fue desarrollado utilizando datos experimentales *in vitro* de un consorcio bacteriano simple de cuatro especies del microbioma intestinal infantil, durante el crecimiento en fructooligosacáridos (FOS). Generalmente el modelo predijo con buena exactitud la abundancia bacteriana en co-cultivos desde datos de monocultivo. Además, se observó una buena correlación entre los datos experimentales de consumo de FOS y la producción de ácido y lo predicho por el modelo. *Bifidobacterium infantis* y *Lactobacillus acidophilus* fueron los microorganismos dominantes en estos experimentos. Se realizó posteriormente una validación del modelo, usando un sistema más óptimo para el crecimiento microbiano como un biorreactor anaeróbico, usando las cuatro especies y FOS como fuente de carbono. El modelo fue capaz de predecir el predominio de las dos especies mencionadas, así como la producción de acetato y lactato. Por último, el modelo fue testeado por su sensibilidad e identificabilidad de parámetros. Estos resultados sugieren que cambios en la abundancia bacteriana en el microbioma pueden ser explicados por interacciones metabólicas, y que un modelo matemático que incorpora estas interacciones puede predecir el comportamiento de un

consorcio simple de especies, desde información de crecimiento en mono y en co-cultivo. En el futuro, el modelo podría ampliarse para incluir datos de consorcios bacterianos más grandes, o ser aplicado a otras comunidades microbianas donde las interacciones metabólicas sean relevantes. Por otra parte, el modelo podría ser útil en el diseño de consorcios microbianos con propiedades deseadas, como por ejemplo una mayor producción de ácido.

Palabras Claves: microbioma intestinal, prebióticos, modelamiento matemático, ecuaciones diferenciales, ecuación de Monod, fructooligosacáridos.

## ABSTRACT

The gut microbiome is a complex microbial community that has a significant influence on the host. Microbial interactions in the gut are mediated by dietary substrates, especially complex polysaccharides. In this environment, breakdown products from larger carbohydrates and short chain fatty acids are commonly shared among gut microbes. Understanding the forces that guide microbiome development and composition is important to determine its role in health and in the intervention of the gut microbiome as a therapeutic tool. Recently, modeling approaches such as genome-scale models and time-series analyses have been useful to predict microbial interactions. In this study, a bottom-up approach was followed to develop a mathematical model based on microbial growth equations that incorporate metabolic sharing and inhibition. The model was developed using experimental in vitro data from a simple bacterial consortium of four infant gut species, growing on fructooligosaccharides (FOS). Usually the model accurately predicted bacterial abundance in co-cultures using mono-culture data. In addition, a good correlation was observed between the experimental data with predicted FOS consumption and acid production. *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus* were dominant under these conditions. Further model validation included cultures with the four-species in a bioreactor using FOS. The model was able to predict the predominance of the two aforementioned species, as well as depletion of acetate and lactate. Finally, the model was tested for parameter identifiability and sensitivity. These results suggest that variations in microbial abundance and activities in the infant gut were mainly explained by metabolic interactions, and could be properly modeled using Monod kinetics with metabolic interactions. The model could be scaled to include data from larger consortia, or be applied to microbial communities where sharing metabolic resources is critical in shaping bacterial abundance. Moreover, the model could be useful in designing microbial consortia with desired properties such as higher acid production.

Keywords: Gut microbiome, prebiotics, mathematical modeling, ordinary differential equations, Monod equation, fructooligosaccharides.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Microbioma intestinal infantil

#### 1.1.1 Generalidades

La microbiota colónica humana es una compleja comunidad de microorganismos. Más de 1000 especies distintas han sido identificadas, principalmente bacterias (Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014) y arqueas (Horz, 2015). Esta comunidad de microorganismos coexiste con el huésped en un estado de simbiosis, participando en numerosos procesos fisiológicos que impactan nuestra salud, como lo son la estimulación del sistema inmune, desarrollo y fisiología gastrointestinal, el establecimiento de un efecto barrera contra agentes patógenos, e importantemente el metabolismo de compuestos no digeribles de la dieta. Se estima que la cantidad de bacterias en el intestino es de aproximadamente  $10^{11}$  células por gramo de contenido intestinal (Rodríguez et al., 2015). Además, la composición del microbioma intestinal en el humano adulto es dominada por los phylum *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (alrededor de un 87%), y en menor medida los phylum *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (Gill, Pop, DeBoy, & Eckburg, 2006; Qin et al., 2013).

#### 1.1.2 Establecimiento

Naturalmente, el establecimiento del microbioma intestinal infantil ocurre al momento del parto. El microbioma intestinal del recién nacido transita en los primeros meses a una microbiota adulta, en la que la diversidad microbiana aumenta considerablemente (Faith, Faith, McNulty, Rey, & Gordon, 2013; Koenig et al., 2010). Como lo es mostrado en la Figura 1-1. Factores que afectan el desarrollo del microbioma intestinal los primeros meses de vida. Fuente:

(Matamoros, Gras-leguen, Vacon, Potel, & Cochetiere, 2013). Figura 1-1-1, antes del nacimiento existen factores prenatales donde el microbioma del recién nacido es influenciado por el estilo de vida y salud de la madre.

El tipo de parto es un factor esencial en el ensamblaje del microbioma infantil. El parto vaginal, favorece el establecimiento de especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Prevotella* y *Enterobacterias*, y en general microorganismos de la microbiota vaginal y fecal de la madre (Dominguez-bello, Costello, Contreras, Magris, & Hidalgo, 2010). Por otro lado, el parto por cesárea provoca un retraso en la colonización por microorganismos anaeróbicos del microbioma. En este caso en los primeros días se observa una predominancia de bacterias asociadas al ambiente hospitalario y la piel, como *Propionibacterium* y *Staphylococcus* (Dominguez-bello et al., 2010).

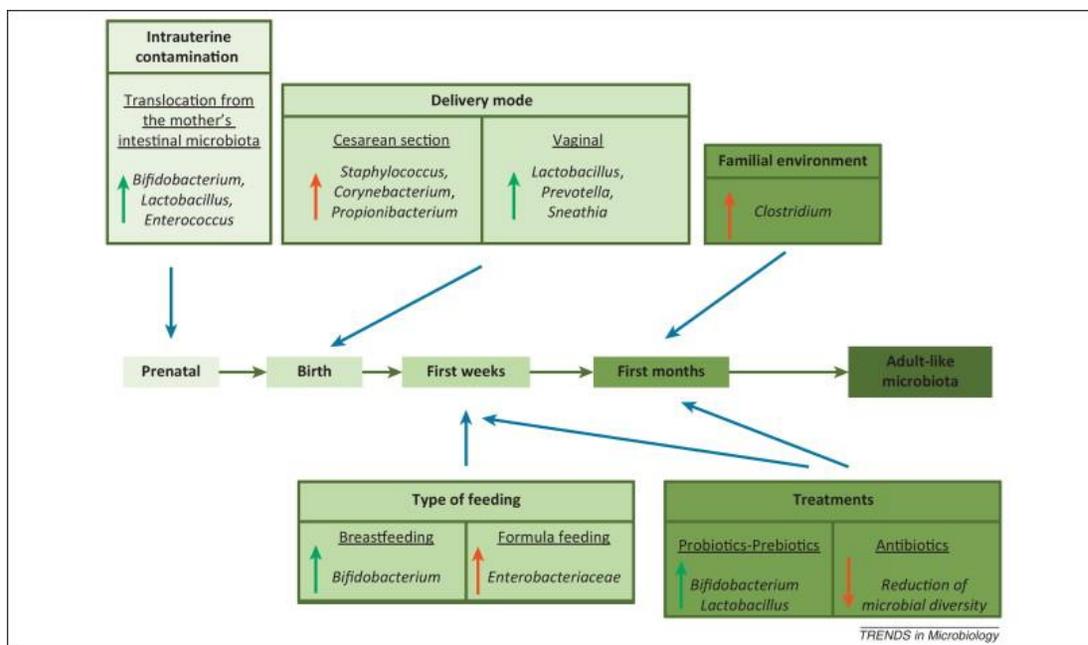


Figura 1-1. Factores que afectan el desarrollo del microbioma intestinal los primeros meses de vida. Fuente: (Matamoros, Gras-leguen, Vacon, Potel, & Cochetiere, 2013).

Durante los primeros días de vida, el microbioma es dominado por anaerobios facultativos provenientes principalmente del filo *Proteobacterias*. Estas bacterias

consumen el oxígeno del lumen intestinal, disminuyendo el potencial redox del intestino (Wilson, s. f., 2005). Esto favorece la posterior colonización de anaerobios estrictos y fermentadores secundarios como lo son bacterias de los géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Clostridium* (Eckburg et al., 2006).

Por otro lado, la alimentación de los lactantes influye en las bacterias predominantes durante este período de vida. Se han reportado distintas composiciones del microbioma (a nivel de filos) si los bebés han sido alimentados con leche materna o fórmula infantil (Matamoros et al., 2013). La leche materna es el alimento indicado para un recién nacido, y aporta múltiples beneficios en la salud, independiente de los aspectos nutricionales (Thomson, Medina, & Garrido, 2017). Uno de estos es el estimular un microbioma saludable, dominado por especies del género *Bifidobacterium*. La leche materna posee una alta concentración de oligosacáridos (HMO), los que no son digeribles por enzimas del recién nacido, y actúan como sustratos prebióticos, favoreciendo el crecimiento de bifidobacterias (Thomson et al., 2017). En contraste, neonatos alimentados por fórmula no presentan esta predominancia (Thomson et al., 2017).

Otro evento importante en la definición del establecimiento del microbioma es el destete, o cambio a alimentación sólida desde la lactancia. La incorporación de sustratos dietarios derivados de vegetales, y la cesación de ingesta de leche materna, genera un cambio importante en el microbioma intestinal, que pasa a un estado “adulto” del microbioma dominado por de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Múltiples especies de estos filos poseen capacidad sacarolítica usando múltiples polisacáridos vegetales (Bäckhed et al., 2015; Eckburg et al., 2006; Gill et al., 2006).

### **1.1.3 Microbioma: Salud y enfermedades**

La composición del microbioma intestinal infantil está influenciada por múltiples factores, tanto ambientales como genéticos. Este proceso de formación es importante, debido a que el microbioma tiene un impacto en la salud del huésped.

Se genera una homeostasis entre el sistema inmune y el recién nacido, previniendo enfermedades del tipo inflamatorias o infecciosas (Chervonsky, 2010; Hooper, Littman, Macpherson, & Program, 2015). Además, ciertos metabolitos presentes en el intestino que pueden inhibir el crecimiento de patógenos oportunistas, no son producidos por las células epiteliales del ser humano, sino que son producidos por microorganismos, estimulando el sistema inmune (Tamburini, Shen, Wu, & Clemente, 2016). En el microbioma intestinal infantil, especies de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* aparecen ser clave en la salud del recién nacido, teniendo un efecto positivo sobre la salud. En particular el género *Bifidobacterium* puede representar entre el 60 a 90% del total del microbioma en neonatos sanos (Favier, Vaughan, Vos, & Akkermans, 2002).

Alteraciones en la composición del microbioma, ya sea por cirugías, cambios drásticos en la dieta, infecciones bacterianas, entre otras causas, están asociadas a enfermedades agudas o crónicas en infantes. Ejemplos son alergias alimentarias, colon irritable, asma y obesidad, enfermedades altamente prevalentes estos días (Arrieta et al., 2015; Marko Kalliomäki, Maria Carmen Collado, Seppo Salminen, 2008; Tamburini et al., 2016).

Los antibióticos son comúnmente utilizados para el tratamiento de enfermedades bacterianas en general. Sin embargo, el uso de estos tiene un impacto directo en el microbioma. Durante la lactancia, el uso de antibióticos puede afectar la diversidad microbiana, disminuyéndola, generando una disminución en fenotipos o funciones particulares del intestino. Un ejemplo es la disminución en el establecimiento del género *Bifidobacterium*, trayendo como consecuencia diarreas y problemas alimenticios en los bebés (Fouhy et al., 2012). Además, el uso prolongado de antibióticos en recién nacidos ha sido asociado a una mayor morbilidad en asma (Hoskin-parr, Teyhan, Blocker, & Henderson, 2013), enfermedades inflamatorias del intestino (Theoklis & Haynes, 2012), alergias, diabetes tipo II (Bailey et al., 2014; Mikkelsen, Knop, Frost, & Hallas, 2015), entre otras.

#### 1.1.4 Definición del consorcio e interacciones

El microbioma intestinal infantil posee una composición más simple comparada con un microbioma adulto (Tamburini et al., 2016). Como se mencionó, en el neonato el género *Bifidobacterium* (filo *Actinobacteria*) puede alcanzar alrededor del 75% de las bacterias del microbioma infantil, independiente de la geografía donde habite el niño o haya nacido la persona (Yatsunenko et al., 2012). En menor medida, en este ecosistema pueden ser observadas especies pertenecientes a los filos *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Turnbaugh et al., 2009). Por esta razón, el consorcio utilizado para la simulación del microbioma infantil posee especies características de cada uno de estos filos. Del filo *Actinobacteria* fue escogido *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, del filo *Proteobacteria* fue escogido *Escherichia coli*, del filo *Bacteroidetes* fue escogido *Bacteroides vulgatus*, y del filo *Firmicutes* fue escogido *Lactobacillus acidophilus* (Bäckhed et al., 2015; Eckburg et al., 2006; Gill et al., 2006). Todas estas especies del microbioma infantil poseen la capacidad de digerir, ya sea completa o parcialmente fructooligosacáridos (FOS) con grado de polimerización de 3 a 6 monómeros de fructosas (Swanson et al., 2002).

Por otra parte, en el microbioma intestinal algunos microorganismos que no poseen mayores capacidades sacarolíticas o proteolíticas pueden crecer gracias a productos metabólicos liberados por otros microorganismos. Las interacciones microbianas son importantes tanto para el establecimiento, fortalecimiento y funcionamiento del microbioma intestinal. Principalmente, relaciones ecológicas del tipo competición y cooperación han sido reportadas como dominantes en el microbioma intestinal (Faust & Raes, 2012). Una interacción ecológica representa una sumatoria de sucesos, tanto físicos, como químicos y microbiológicos que un microorganismo pueda ejercer sobre otro (Batista et al., 2002; Hecht et al., 2016; Rakoff-Nahoum, Foster, & Comstock, 2016; Vogt, Peña-Díaz, & Finlay, 2015). Por lo postulado previamente, una hipótesis posible es que si compuestos dietarios poseen un potente efecto modulador del microbioma intestinal (Turnbaugh et al., 2009), estos

compuestos influncian y dictan las interacciones metabólicas entre microorganismos del microbioma.

Otro fenómeno que ocurre en el microbioma es el *cross-feeding*, o alimentación a través de intermediarios metabólicos (Rogowski et al., 2015). Por ejemplo, ha sido reportado este fenómeno en el consumo de mucina y oligosacáridos de leche materna sialilados entre *B. bifidum* y *B. breve* (Egan, O'Connell Motherway, et al., 2014; Egan, Motherway, Ventura, & van Sinderen, 2014), o durante el consume de fructanos entre *bifidobacteria* y bacterias productoras de butirato. Además, el fenómeno de *cross-feeding* ha sido observado cuando metabolitos finales de la fermentación de un microorganismo son utilizados como fuentes de carbono de otro. Estos metabolitos pueden ser aminoácidos o ácidos grasos de cadena corta (Short Chain Fatty Acid, SCFA) (Egan, O'Connell Motherway, et al., 2014; Moens, Weckx, & De Vuyst, 2016). Por ejemplo, lactato y acetato son productos finales de bacterias fermentadoras lácticas y heterolácticas, los que pueden ser utilizados por bacterias productoras de butirato, como lo son *Faecalibacterium prausnitzii* y *Eubacterium rectale* (Louis & Flint, 2017). Finalmente, estos ácidos en algunos casos pueden tener un efecto negativo sobre el crecimiento de algunos microorganismos, en particular aquellos más sensibles a pHs más ácidos (Walker et al., 2011).

## 1.2 Modelos computacionales de simulación del microbioma

Recientemente, el enfoque de modelaje del microbioma intestinal está siendo desarrollado de manera de predecir tanto composiciones, como interacciones entre los individuos pertenecientes a esta comunidad. Entre los enfoques se encuentran modelos del tipo ecológico-estadístico (*Generalized Additive Models*, GAM), reconstrucciones metabólicas a escala genómica (*Genome-Scale Metabolic Reconstruction*, GSMR) y modelos cinéticos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias (*Ordinary Differential Equation*, ODE).

### 1.2.1 Generalized Additive Models (GAM)

La aproximación que entregan los GAM consiste en una técnica de regresión estadística, que ha sido utilizada en análisis de series de tiempo de información ecológica, para la caracterización y estimación de coeficientes de competición y cooperación entre las especies de la población (Hastie & Tibshirani, 1990). La ventaja de este enfoque es que no necesitan ninguna suposición previa, ni relaciones funcionales entre las especies, de lo que ocurre en la situación a analizar. Por el contrario, el *output* de un GAM entrega indicios para deducir posteriormente el fenómeno presente (Trosvik, Rudi, et al., 2010), realizando la respectiva discusión, para correlacionar con descubrimientos de otros autores.

Particularmente, ha sido utilizado en el estudio del microbioma intestinal, de manera de identificar correlaciones y patrones positivos y negativos en la información, por lo que es posible estudiar los fenómenos de *cross-feeding* y competición (Faust & Raes, 2012; Trosvik, de Muinck, & Stenseth, 2015).

Esta mirada posee dos grandes desventajas, la primera, es que requieren una extensa cantidad de información para que el modelo pueda ser correctamente ejecutado, y se debe básicamente a la gran variabilidad presente en la población. El segundo problema es que suele ser afectado por *data over-fitting*, esto quiere decir, que a medida que más parámetros son utilizados para ajustarse a los datos, mejor será el error generado por el modelo (Trosvik, Stenseth, & Rudi, 2010; Wood, 2008). Sin embargo, un menor error no necesariamente significa una mejor aproximación, pues la tendencia en el comportamiento de la información es errónea.

Para evitar caer en el problema de *over-fitting* de datos, los GAM requieren de un proceso posterior denominado validaciones cruzadas, el cual permite curar el modelo, mediante la generación de numerosos modelos y evaluando su desempeño (Ward, 2014). Finalmente, luego de una adecuada calibración y validación, los GAM proveen de una predicción certera del fenómeno mediante interpolación del problema (Trosvik, Stenseth, et al., 2010).

## 1.2.2 Reconstrucción metabólica a escala genómica (GSMR)

Una segunda aproximación son las reconstrucciones metabólicas a escala genómica. Estos han sido exitosamente aplicados recientemente para la exploración de interacciones metabólicas entre bacterias del microbioma intestinal (Magnúsdóttir et al., 2016). Como es posible apreciar en la Figura 1-2, estos modelos representan determinados flujos metabólicos de producción, exportación y consumo de intermediarios dentro de las vías metabólicas de las bacterias (Magnúsdóttir et al., 2016).

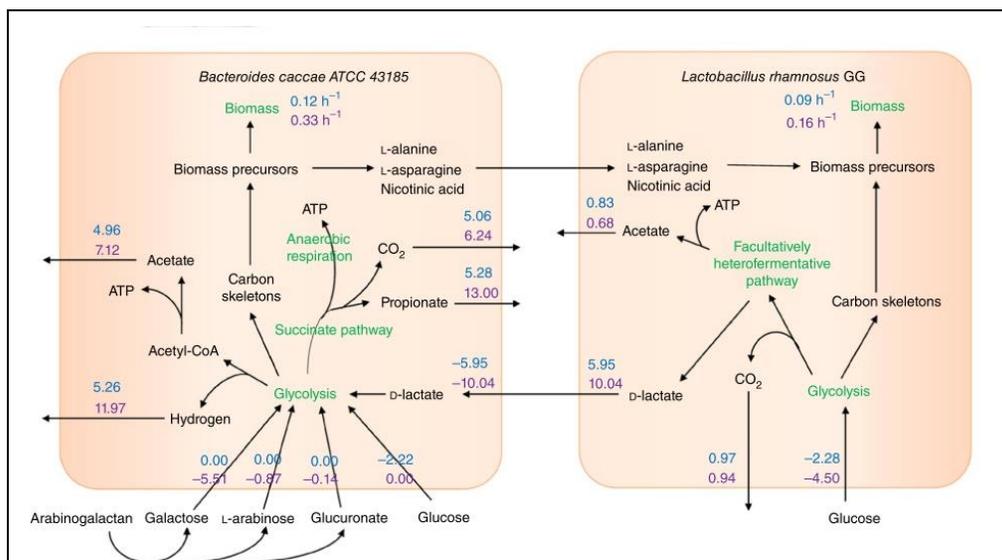


Figura 1-2. Simulación de co-cultivo realizado a través de GSMR entre *Bacteroides caccae* ATCC 43185 y *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103. Fuente (Magnúsdóttir et al., 2016).

Utilizar una simplificación de este enfoque requiere de una extensiva base de datos para la reconstrucción. Debe poseer un esqueleto metabólico que permita el crecimiento de la bacteria, además de reacciones que identifiquen características propias de la bacteria a estudiar (Kanehisa, 2006). Es decir, procesos de curación, edición y *gap-filling* son requeridos para poseer una aproximación fidedigna

(Thiele, Vlassis, & Fleming, 2014). Numerosas técnicas han sido descritas, y actualmente siendo utilizadas, basadas en ortología, topología y estequiometría, para facilitar el diseño de estos esqueletos y la curación del modelo (Thiele, Ines; Palsson, 2010). Finalmente, luego del proceso de curación y definición de medios (lo que genera restricciones de metabolitos, pH, entre otros elementos), es posible encontrar interacciones entre un número finito y pequeño de especies, por limitación en la sobre definición de los intermediarios (Thiele, Heinken, & Fleming, 2013).

### 1.2.3 Modelos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE)

Una tercera aproximación es la construcción de modelos cinéticos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias. Por ejemplo, el grupo de Kettle ha propuesto una aproximación basada en un *input* de vías metabólicas, que consiste en una matriz que describe los compuestos producidos durante la fermentación, de manera de generar un sistema de ODEs para la simulación de abundancia del microbioma intestinal (Kettle, Louis, Holtrop, Duncan, & Flint, 2015). Los datos usados corresponden al trabajo de Walker et al. (Walker et al., 2011). Como es presentado en la Figura 1-3, la complejidad del microbioma fue simplificada asignando el aporte de un microorganismo a uno de diez grupos funcionales (*Bacterial Functional Groups*, BFGs) según capacidades sacarolíticas, patrones de consumo de sustratos, o bien producción de algún SCFA en particular (Kettle et al., 2015).

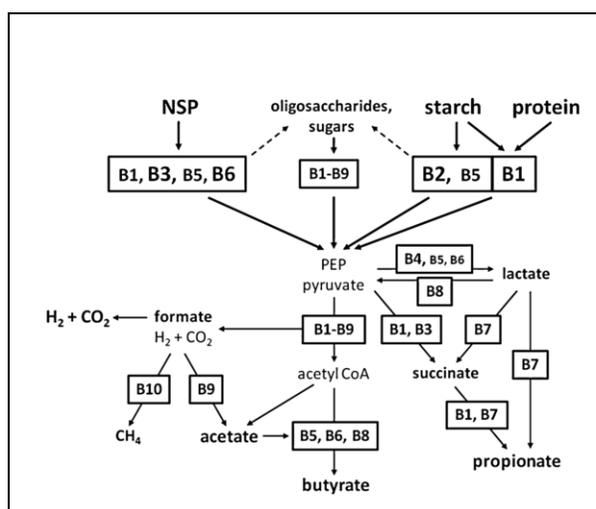


Figura 1-3. Resumen de grupos funcionales entre las bacterias del microbioma intestinal adulto. Fuente: (Kettle et al., 2015).

El modelo propuesto muestra un buen ajuste de los datos experimentales, que corresponden a un biorreactor de flujo continuo e inoculado con microbiota fecal humana. En el análisis realizado, se utiliza el pH como un factor determinante y limitante del modelo. El pH utilizado en el artículo es ligeramente ácido, alrededor

de 6.5 (Duncan, Louis, Thomson, & Flint, 2009), lo que indica un estado similar al del colon distal. Principalmente, aquí ocurren fermentaciones donde altas concentraciones de lactato (pKa 3.8) son utilizadas para la producción de butirato (pKa 4.75) y propionato (pKa 4.91), generando un aumento en el pH desde el colon proximal (5.5) al colon distal (6.5) (ChemAxon, 2016). El pH puede afectar directamente el crecimiento de bacterias y archaeas, especialmente las pertenecientes a los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Euryarchaeota* (Duncan et al., 2009).

### 1.3 Motivación

Debido a que el microbioma intestinal está íntimamente relacionado con varios aspectos de la salud humana, y puede contribuir a varias enfermedades, se requiere avances en la comprensión que tenemos de esta comunidad. No sólo importante estudiar a las bacterias por separado, pues es una comunidad compleja que vive en simbiosis con el ser humano, y que ante algún estado de disbiosis puede potencialmente generar enfermedades.

Los avances realizados en el área de modelamiento generalmente recopilan información de composición de microbioma, generados por métodos de secuenciación masiva. En algunos casos deficiencias en anotación de genomas, variaciones en la tecnología, métodos de análisis, o capacidad computacional pueden oscurecer estos análisis. Esto hace también relevante el desarrollo de aproximaciones que puedan partir desde abajo (*bottom-up approach*), revelando las fuerzas que guían la composición de microbiomas más complejos.

Tomando en consideración los puntos anteriores, en este trabajo de tesis se presenta un enfoque simplificado, para comprender la influencia de las interacciones metabólicas entre microorganismos del microbioma intestinal infantil. El modelo presentado en este proyecto, permite estimar y predecir los cambios del microbioma a causa de factores de inhibición y potenciamiento por la presencia de la otra bacteria, como también producción y consumo de productos intermediarios. Se estudió un consorcio bacteriano formado de cuatro microorganismos representativos provenientes del microbioma intestinal infantil, el cual fue primero caracterizado por su crecimiento experimental en mono y en co-cultivo, y la información obtenida fue utilizada en la construcción de un modelo matemático basado en ODE. El modelo fue validado usando resultados experimentales provenientes de un biorreactor que contiene las cuatro especies simulando de forma simple el microbioma intestinal infantil.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 Hipótesis**

La hipótesis de esta investigación es que un modelo cinético basado en interacciones metabólicas entre especies representativas del microbioma intestinal reproduce el comportamiento de un consorcio microbiano simple.

### **2.2 Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo fue el desarrollar un modelo matemático basado en interacciones metabólicas, y los resultados experimentales necesarios, que permita predecir el comportamiento de un consorcio definido del microbioma intestinal durante el consumo de fructooligosacáridos.

### **2.3 Objetivos específicos**

Para cumplir con este objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Construcción de un modelo cinético de consorcios bacterianos en base a inhibiciones causadas por metabolitos intermediarios.
2. Calibración del modelo en base a resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo de co-cultivos pareados (crecimientos, consumo de sustrato y producción de acetato y lactato).
3. Validación experimental del modelo en un reactor biológico.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Reactivos

De Becton, Dickinson and Company (Francia) se obtuvo Bacto-agar, extracto de levadura, triptona, peptona, Lactobacilli MRS Broth y Reinforced Clostridial Medium Difco™.

De Merck (Alemania), se obtuvo ácido bórico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, agua para cromatografía, cloruro de magnesio hexahidratado, cloruro de calcio dihidratado, cloruro de magnesio hexahidratado, fosfato de potasio dihidrogenado, hidróxido de sodio, sulfato de amonio,  $\alpha$ -naftol, N-butanol, myo-inositol, sulfato de cobre (III), sulfato de hierro (II) heptahidratado, sulfato de manganeso tetrahidratado, sulfato de potasio, sulfato de zinc heptahidratado, sulfato de potasio, tween 80 y yoduro de potasio.

De Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA), se obtuvo, acetato de sodio, ácido D-pantoténico, ácido lipoico, ácido nicotínico, ácido nitrilotriacético, ácido p-aminobenzoico, clorhidrato de tiamina, guanina, hemina, molibdato de amonio tetrahidratado, piridoxal HCL, riboflavina, sales biliares, sulfato de cobalto heptahidratado, sulfato de magnesio, tricina, uracilo.

De Calbiochem® (USA) se obtuvo acetato de potasio, adenina y xantina.

De Heyn (Chile), se obtuvo ácido acético glacial, citrato de sodio, cloruro de sodio, EDTA, glucosa y lactosa.

De LAFKEN (Chile) se obtuvo agarosa de grado analítico.

De MP biomedicals (USA) se obtuvo glicerol y glutatión.

De Terrium (Chile), se obtuvo inulina.

De Biolabs (Massachusetts, USA) se obtuvo aceite mineral.

De TLC (Chile), se obtuvo etanol y agua destilada.

De Winkler (Chile), se obtuvo el antiespumante de silicona (base de polidimetilsiloxano).

De Applied Biosystems (USA), se obtuvo *qPCR Power Up SYBR Green MasterMix* y *MicroAmp Fast Optical Plates*.

### 3.2 Microorganismos y medios de cultivo

Los microorganismos utilizados en el consorcio definido de bacterias pertenecientes al microbioma infantil son mostrados en la Tabla 3-0-1. Éstos fueron almacenados en sus medios complejos respectivos en *stocks* de 1mL con 50% glicerol (25% final) v/v a una temperatura de -80°C.

Tabla 3-0-1. Bacterias utilizadas en el consorcio infantil.

Bacteria	Código ATCC	Medio de cultivo (Complejo)	Origen
<i>Bifidobacterium longum subsp. Infantis</i>	15697	MRS – Cys (0.5 g/L)	Viticulture & Enology Culture Collection (UC-Davis)
<i>Bacteroides vulgatus</i>	8482	RCM – Cys (1 g/L)	American Type Culture Collection (ATCC)
<i>Escherichia coli</i> K12	-	LB	Viticulture & Enology Culture Collection (UC-Davis)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356	MRS	Viticulture & Enology Culture Collection (UC-Davis)

Para cultivos pre-biorreactor, las bacterias fueron cultivadas al menos dos veces desde el *stock*. La primera en el medio complejo, mientras que la segunda en medio mZMB. En ambos casos, los cultivos se realizaron en tubos de 15 mL dentro de jarras de anaerobiosis (Anaerocult, Merck, Alemania), con parches de anaerobiosis (Gaspak EM, Becton Dickinson) por 48 h a 37°C. Toda acción fue realizada en esterilidad, bajo una campana de flujo laminar (Zhi Cheng Mod. ZHJH-1109C, Shanghái), previamente limpia (Etanol al 70% v/v) y esterilizada (20 minutos con luz UV).

### 3.2.1 Medios complejos

El medio MRS (*Lactobacillus MRS broth*) utilizado para cultivos de *B. infantis* y *L. acidophilus*. Se agrega 52.2 g de *Lactobacillus MRS broth* a 1 l de volumen total, con agua destilada como solvente.

El medio LB (*Luria-Bertani*) utilizado para el cultivo de *E. coli*. Se agrega 10 g de Peptona, 5 g de Extracto de levadura y 5 g de NaCl a 1 l de volumen total, con agua destilada como solvente.

El medio RCM (*Reinforced Clostridial Medium*) utilizado para el cultivo de *B. vulgatus*. Se agrega 38 g de *Reinforced Clostridial Medium broth* a 1 l de volumen total, con agua destilada como solvente.

Para cultivos en placas, fue agregado 20 g/L Agar. Cada uno de estos medios fue esterilizado vía autoclave (121°C por 15 minutos). Una vez la temperatura de éstos disminuyó a 60°C, se suministra L-Cisteína a la concentración final pertinente.

### 3.3.3 mZMB1

Se modificó el medio definido ZMB1 (Zhang, Mills, & Block, 2009), donde fueron eliminados los grupos correspondientes a aminoácidos y buffers que no tienen acción a pH 5.5 (Tricina y MOPS). La Tabla 3-0-2 contiene las concentraciones a la cual fue preparado el medio mZMB1. Los grupos fueron filtrados (0.2 µm) y ajustado el pH a 5.5, a excepción del grupo 1 que fue esterilizado vía autoclave (121°C por 15 minutos).

Tabla 3-0-2. Componentes y concentraciones de mZMB1

Grupos	Descripción	Componente	Concentración final (g/L)
Grp 1	Fuente de aminoácidos	Triptona	2.80E+01
Grp 2	Fuente de Carbono	FOS	1.00E+01

Grp 3	Vitamina	myo-inositol	2.00E-03
Grp 4	Buffers de fosfato	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3.14E+00
		$\text{K}_2\text{HPO}_4$	6.43E+00
Grp 5	Importantes grupos vitaminas	Pantotenato de calcio	1.20E-03
		Niacina	9.00E-04
		Piridoxal-HCL	4.80E-03
Grp 6	Importantes grupos minerales	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00E+00
		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.00E-03
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.00E-03
Grp 7	Otros grupos vitaminas	Ácido fólico	5.60E-04
		Ácido p-aminobenzoico	5.60E-05
Grp 8	Grupos de ácidos grasos	Acetato de potasio	9.01E-01
		Ácido tióctico	1.00E-03
		Tween 80	5.00E-01
Grp 9	Grupos de bases nitrogenadas	Adenina	1.10E-02
		Guanina	5.51E-03
		Uracilo	2.20E-02
		Xantina	3.67E-03
Grp 10	Otros grupos buffers	MOPS	1.50E+01
		Tricina	1.50E+00
Grp 11	Trazas de grupos minerales	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.90E-04
		$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.80E-04
		$\text{CaSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.80E-02
		$\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.28E-04
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.90E-04
		$\text{H}_3\text{BO}_3$	7.60E-04
		$\text{K}_2\text{SO}_4$	2.28E-02
		KI	1.14E-04
Grp 12	Grupos quelantes	EDTA	7.50E-03
		Ácido Nitrilíoacético	7.50E-03
Grp 13	Otros grupos	Glutación	1.50E-02

	componentes	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00E+00
		NaCl	3.00E+00
Grp 14	EAA#8	Biotina	6.00E-03
Grp 15	EAA#9	Tiamina	5.60E-04
Grp 16	EAA#10	Riboflavina	9.00E-04

### 3.2 Desarrollo del modelo

El modelo desarrollado describe los cambios en biomasa de una bacteria hipotética en un mono-cultivo *batch*, como lo reporta previamente (Sacher et al., 2011). El modelo excluye la fase lag del crecimiento bacteriano. Además, se basa en las siguientes suposiciones:

- Cultivo es anaeróbico.
- Temperatura, pH y actividad de agua son constantes en todo el cultivo.
- No existe limitación por fuentes de nitrógeno.
- La fuente de carbono es el único limitante del crecimiento.
- La jerarquía en el consumo de las bacterias es primero la fuente de carbono y luego el respectivo SCFA si fue previamente reportado en literatura.
- Los parámetros cinéticos permanecen constantes en el modelo.

La construcción se basó en las fases que se muestran a continuación:

#### 3.3.1 Modelo de una bacteria

Este es el punto en el que se definieron todas las bacterias como una bacteria estándar, la que podía producir dos compuestos (acetato o lactato) y consumir alguno o ninguno de estos según lo muestra la Tabla 3-.

Tabla 3-3. Asunciones del modelo de una bacteria utilizadas en el consorcio.

Bacteria	Puede producir	Puede consumir
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Acetato y lactato	-
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Acetato y lactato	Lactato
<i>Escherichia coli</i>	Acetato	Acetato
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactato	-

El modelo consta con las siguientes ecuaciones diferenciales:

La biomasa ( $X_m$ ) es la cantidad total de biomasa seca, esta incluye células vivas y muertas. Depende de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ), como se muestra en la Ecuación 3.1.

$$\frac{dX_m}{dt} = \mu \cdot X \quad (3.1)$$

La biomasa viva ( $X$ ) es calculada asumiendo una cinética de muerte de primer orden ( $k_d$ ), como es mostrado en la Ecuación 3.2.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - k_d \cdot X \quad (3.2)$$

El sustrato consumido (FOS) en el tiempo está definido por dos eventos principales: El crecimiento y el consumo de azúcar utilizado en mantención celular. El crecimiento bacteriano posee un rendimiento de gramos de biomasa generados por gramo de sustrato consumido ( $Y_{x/s}$ ). Mientras que la mantención celular es calculada asumiendo una cinética de primer orden ( $m_s$ ), como es descrito previamente en (Schnapp, Curtis, Bressan, & Hasegawa, 1991), como se muestra en la Ecuación 3.3.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu \cdot X}{Y_{x/s}} - m_s \cdot X \quad (3.3)$$

Cada producto producido en la fermentación anaeróbica (acetato y lactato) es calculado basado en la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el rendimiento de gramo de producto por biomasa generada ( $Y_{x/PSCF A}$ ), mostrado en la Ecuación 3.4.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{x/PSCF A}} \quad (3.4)$$

La tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) es modelada usando el método de (Andrews y Noack, 1968), cinética de Monod con inhibición de producto (Sivakumar, Srinivasaraghavan, Swaminathan, & Baradarajan, 1994). El término adicional

considera la concentración del inhibidor ( $I_i$ ) y la respectiva constante de inhibición ( $K_{I_i}$ ), donde  $i$  es uno de los productos generados en la fermentación que pueda inhibir el crecimiento bacteriano (Ecuación 3.5).

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \cdot \frac{1}{1 + \frac{I_A}{K_{I_A}}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{I_L}{K_{I_L}}} \quad (3.5)$$

### 3.3.2 Generación de los co-cultivos

Para los co-cultivos pareados, términos adicionales fueron agregados: Primero, la interacción microbiana como un inhibidor o potenciador de crecimiento en la cinética de Monod y el consumo parcial de acetato y lactato por fermentadores secundarios. Se realizaron las correspondientes restricciones para evitar la indeterminación de funciones, principalmente por la dinámica que depende de la función en el tiempo de la otra bacteria ( $X_j(t)$ ), mostrado en la Ecuación 3.6.

$$\mu_i = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \cdot \frac{1}{1 + \frac{I_A}{K_{I_A}}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{I_L}{K_{I_L}}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{X_j(t)}{e_{fji}}} \quad (3.6)$$

Segundo, el consumo parcial de acetato y lactato de cada bacteria es agregado en orden jerárquico, es decir, luego que el principal sustrato se agota. Notar que las tasas de crecimiento son distintas (parámetros de  $\mu_{max}$  y  $K_s$  distintos), debido a que ambos sustratos generan distintas cinéticas en las bacterias (Ecuación 3.7).

$$\frac{dP}{dt} = \begin{cases} S(t) \geq 0 & \frac{\mu_1 \cdot X_1}{Y_{x/P}} + \frac{\mu_2 \cdot X_2}{Y_{x/P}} \\ S(t) = 0 & -\frac{\mu_{1p} \cdot X_1}{Y_{P/x}^{1'}} - \frac{\mu_{1p} \cdot X_1}{Y_{P/x}^{2'}} \end{cases} \quad (3.7)$$

### 3.3.3 Fitting de parámetros

El *fitting* de los parámetros fue realizado mediante la minimización numérica de la sumatoria de los residuos cuadráticos entre el valor experimental y la información predicha, esto normalizado por la varianza experimental,  $Var(X_i^{exp})$ , como es mostrado en la Ecuación 3.8.

$$\min_{\Theta} \sum_j^n \sum_i^m \frac{(X_{i,j}^{exp} - X_{i,j}^{model})^2}{Var(X_i^{exp})} \quad (3.8)$$

Donde  $X_{i,j}$  es la medición  $j$  de la variable  $i$ ,  $m$  es el número de las variables medidas, mientras que  $n$  es el número de mediciones.  $\Theta$  representa el espacio de valores posibles de los parámetros donde cada combinación de éstos están localizados.

La optimización fue resuelta utilizando *SSmGO Toolbox*, una rutina de búsqueda dispersa programada para *Matlab*® (Egea, Rodríguez-Fernández, Banga, & Martí, 2007; Rodríguez-Fernández, Egea, & Banga, 2006). El integrador utilizado fue ODE15s, y las tolerancias absolutas y relativas fueron fijadas en  $1e-6$ . El número de evaluaciones fue fijado en 20000 iteraciones. Luego de que este número de iteraciones fuera completo, un nuevo set de parámetros iniciales fueron utilizados, esto se realiza para que la rutina no busque solamente en un óptimo local, sino en todo el espacio de soluciones posibles.

Para mono-cultivos, los *lower* y *upper bounds* fueron fijados en 0.000001 y 100 respectivamente. Además, una vez el mejor resultado fue encontrado, se utilizaron análisis de identificabilidad y sensibilidad para fijar alguno de los parámetros del set probado.

Para co-cultivos pareados cuatro casos fueron analizados, debido a que el parámetro de interacción puede ser positivo y negativo (produce una noción de inhibición y potenciamiento del crecimiento respectivamente).

### 3.3.4 Análisis de pre/post-regresión

Como está descrito por (Sacher et al., 2011), este análisis consiste básicamente en tres estudios: sensibilidad, identificabilidad y significancia de los parámetros del modelo. Estos fueron programados en *Matlab*®.

El análisis de sensibilidad de parámetros permite revisar cuál parámetro interfiere directamente en cada una de las variables de estado. Además, si este valor es normalizado, es útil para comparar entre diferentes valores obtenidos (Sacher et al., 2011). Si un parámetro no es sensible ante algún cambio, este parámetro puede ser fijado. Es calculado como la derivada parcial de la variable medida con respecto al parámetro, como es mostrado en la Ecuación 3.9.

$$\overline{G}_{ij}(t) = \frac{\theta_j}{X_i} \frac{\partial X_i(t)}{\partial \theta_j} \quad (3.9)$$

La identificabilidad de parámetros correlación entre los términos en un intervalo de tiempo determinado. Es calculada mediante la matriz de correlación entre cada parámetro del modelo, utilizando la previamente calculada matriz de sensibilidad (Jacquez & Arbor, 1985). Si dos parámetros están altamente correlacionados, estos afectan en la variable medida de la misma manera, por lo que, uno de los dos puede ser fijado para que el otro sea una función dependiente del primero.

$$K_{ij} = \text{correlación}(G) \quad (3.10)$$

Finalmente, la significancia de los parámetros fue evaluada mediante la sensibilidad de éstos (cambio de un  $\pm 5\%$  del valor) y la influencia en las variables medidas. Para esto, se programó una rutina que aleatoriamente variara el parámetro un  $\pm 5\%$  utilizando una distribución uniforme, en 5000 iteraciones. Luego se calculó el promedio y la desviación estándar para cada ODE en el tiempo, para identificar los cambios.

### 3.4 Experimento de co-cultivo *batch* en biorreactor

Con el fin de validar el modelo propuesto, se realizaron 4 reactores *batch* en un biorreactor de 200 mL (*Mini-bio Applikon Biotechnology*, Países Bajos). Como medio de cultivo, se utilizó el medio mZMB1 con FOS (10 g/L) como fuente de carbono. Los *batch* fueron inoculados con las cuatro bacterias (Bi, Bv, Ec, La) a un OD<sub>630</sub> inicial de 0.05 (cada bacteria) en condiciones anaeróbicas. La temperatura fue fijada en 37 °C y el pH se mantuvo constante durante toda la fermentación a 5.5 utilizando inyección automática de NaOH 3N (control básico) y HCl 3N (control ácido). Para mantener el ambiente anaeróbico dentro del reactor, se inyectó N<sub>2</sub> (grado 99.99 % pureza) antes de iniciar la fermentación y durante la fase lag, esto se debe a que los gases que son liberados durante el crecimiento exponencial desplazan naturalmente el oxígeno dentro del fermentador. La agitación del cultivo se fijó en 180 rpm y para controlar el nivel de espuma en el reactor, se inyectó 100 µL de antiespumante de silicona (Polidimetilsiloxano) en el inóculo y si era necesario durante la fermentación.

La toma de muestras en el biorreactor fue cada 2 horas, donde 500 µL fueron descartados (por desecho) y 2 mL fueron extraídos como muestra. Inmediatamente, fueron centrifugados a 4000 x g por 5 minutos. El *pellet* fue guardado a -20 °C para posterior extracción de ADN y cuantificación vía qPCR. El sobrenadante fue guardado a -20 °C para una posterior cuantificación por método de Fenol-Ácido sulfúrico y HPLC.

### 3.5 Análisis de muestras

El análisis de las muestras tomadas del biorreactor, se divide en cuatro partes, como se muestra a continuación.

### 3.5.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante una adaptación del método descrito por (Anahtar, Bowman, & Kwon, 2016), realizada por el Dr. Daniel Medina. Este proceso es una extracción en pH básico. Primero es destruida la pared celular con piedras de vidrio y una solución de lisis en el equipo *Disruptor Genie* (Scientific Industries Inc., Bohemia, Nueva York). Para el proceso, son necesarios cuatro tubos con los compuestos que se observan en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1. Elementos utilizados en extracción de ADN, protocolo adaptado por Daniel Medina.

Tubo	Compuestos
SDS	100 $\mu$ L de Perlas de vidrio 210 $\mu$ L SDS 20% 250 $\mu$ L Fenol 240 $\mu$ L Cloroformo 10 $\mu$ L Alcohol isoamílico
CAi	480 $\mu$ L Cloroformo 20 $\mu$ L Alcohol isoamílico
FCAi	250 $\mu$ L Fenol 240 $\mu$ L Cloroformo 10 $\mu$ L Alcohol isoamílico
Extracción	350 $\mu$ L isopropanol (-20°C) 35 $\mu$ L Acetato de sodio 3M, pH 5.5

Se resuspende el pellet en 200  $\mu$ L *buffer* STE (200mM NaCl, 200mM Tris, 20mM EDTA) y se centrifuga a 6000 RPM para lavar las células. Posteriormente se resuspende en 500  $\mu$ L *buffer* STE+25  $\mu$ L *Lysozima* (20 mg/mL) y se incuba por 30 minutos a 37°C. Se agregan 500  $\mu$ L de esta mezcla al tubo SDS y se rompen las células en *Disruptor Genie* por 5 minutos.

Se centrifuga por 10 minutos a 9000 RPM y se transfieren 450  $\mu\text{L}$  de la fase menos densa al tubo FCAi. Se repite este paso y luego se transfieren 400  $\mu\text{L}$  de la fase menos densa al tubo CAi. Se centrifuga por 5 minutos a 9000 RPM y se transfieren 350  $\mu\text{L}$  de la fase menos densa al tubo de extracción. Esto se incuba *overnight* a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El ADN debe precipitar en este paso.

Posteriormente se lava el precipitado con etanol absoluto frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) dos veces y se resuspende el ADN en 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.

### **3.5.2 Cuantificación de especies bacterianas por qPCR**

Debido a que en el co-cultivo existen varias bacterias creciendo, la forma de identificar una en específico es analizando en particular el ADN de cada una. qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) es una herramienta que permite cuantificar la concentración de una especie en particular, mediante la interpolación del Ct de la muestra (Ciclo en que la fluorescencia de la amplificación por PCR supera el umbral de detección) en los Ct de concentraciones de ADN conocido.

Para esto, se utilizó *qPCR Power Up SYBR Green MasterMix* en *MicroAmp Fast Optical Plates*. La reacción de qPCR utilizada se muestra en la Tabla 3-2. Los partidores para la identificación de cada bacteria en el co-cultivo son mostrados en la Tabla 3-3. Finalmente, para cada placa fue realizado una curva estándar por triplicado, en la que se hicieron diluciones seriadas de ADN 1:10 desde 1  $\text{ng}/\mu\text{L}$  hasta  $10^{-6}$   $\text{ng}/\mu\text{L}$  en la reacción total de qPCR.

Tabla 3-2. Reacción qPCR realizada en *MicroAmp Fast Optical Plates* y analizadas en el equipo *AriaMx Real-Time PCR System*.

Compuesto	Concentración de trabajo	Volumen utilizado por pocillo ( $\mu\text{L}$ )
<i>SYBR GreenMaster Mix</i>	2X	5
Partidor F	10 $\mu\text{M}$	0.2
Partidor R	10 $\mu\text{M}$	0.2
ADN bacteriano	10 ng/ $\mu\text{L}$	1
Agua	-	3.6

Tabla 3-3. Partidores utilizados en la cuantificación de las especies bacterianas en el co-cultivo.

Bacteria	Fuente	Partidor	Secuencia (5' $\rightarrow$ 3')
<i>B. infantis</i>	Diseño propio. <i>ABC binding protein</i>	Blon_0883F	AGTTCGGCTCCAAAGACCTG
		Blon_0883R	CATGCCTCGATACGGTCGAA
<i>B. vulgatus</i>	Diseño propio	Bacte_F	GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT
		Bacte_R	CGGACGTAAGGGCCGTGC
<i>E. coli</i>	(Kassinen, Malinen, Krogus, Palva, & Rinttila, 2004)	Eco1457F	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAG
		Eco1652R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC
<i>L. acidophilus</i>	(Bartosch, Fite, Macfarlane, & McMurdo, 2004)	Lacto_F	TGGAAACAGRTGCTAATACCG
		Lacto_R	GTCCATTGTGGAAGATTCCC

Como *output* del software de qPCR, se entrega la eficiencia de los partidores (determinada mediante la curva estándar) y la concentración de la muestra en ng/ $\mu\text{L}$ .

### 3.5.3 Cuantificación de azúcares (método del Fenol-Ácido sulfúrico)

Se adaptó el protocolo de fenol-ácido sulfúrico descrito por (Tuomivaara, Yaoi, O'Neill, & York, 2015). Las muestras fueron diluidas de manera tal que hubiesen a lo más 100 µg de azúcar por pocillo en la muestra más concentrada (tiempo a las 0 horas). La reacción total se realizó en 150 µL finales en placas de 96 pocillos, de los cuales son 100 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98 %, 30 µL de muestra diluida fría (4 °C) y 20 µL de fenol al 5%. Se incubó a 95° por 5 minutos, se enfría y se mide la absorbancia a 490 nm en el lector de placas *Tecan M200 Pro*. Para el estándar se realizó en cantidades de 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 y 0 µg de FOS en los pocillos. El número de réplicas, tanto para el estándar como para las muestras a analizar es de triplicado.

Finalmente, mediante interpolación lineal en la curva estándar, se obtuvieron las concentraciones de azúcar en cada una de las muestras.

### 3.5.4 Cuantificación de acetato y lactato (HPLC)

Se utilizó el protocolo descrito por (Mendoza, Cañón, Contreras, Ribbeck, & Agosin, 2017) para la medición de ácido láctico y acético en el *Lachrom L-700 HPLC system* (Hitachi, Japón). Se utilizó una columna de intercambio iónico de ácidos orgánicos y carbohidratos *Aminex HPX-87H* (Bio-Rad, USA). Las condiciones de funcionamiento del proceso de cromatografía son: 35 °C, flujo de fase móvil de 0.450 mL/min (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM).

El estándar utilizado en el ensayo fueron diluciones seriadas de 1:4, comenzando desde 20 g/L hasta 4.883 mg/L. La preparación de cada muestra fue la siguiente: fueron mezclados 300 µL de muestra con 30 µL de ácido pivalico (50 g/L, control interno) y colocados en el HPLC. Los resultados obtenidos en el equipo fueron normalizados por el ácido pivalico, obteniéndose los resultados presentados posteriormente, como muestra la Ecuación 11.

$$C_{muestra} = \frac{A_{muestra}}{A_{pivalico}} \cdot \frac{C_{pivalico}}{m} \quad (3.11)$$

#### **4. RESULTADOS**

Con el objetivo de comprender y predecir las interacciones presentes en el microbioma intestinal infantil, se planteó y validó el modelo sugerido. Para cumplir el primer objetivo específico propuesto en este trabajo, fue requerida la construcción del modelo y planteamiento de las respectivas asunciones a las que el modelo pueda ayudar a predecir comportamientos. Se generaron funciones acorde a los crecimientos e inhibiciones según lo previamente reportado en literatura.

Posteriormente, el segundo objetivo fue la calibración del modelo con resultados previamente obtenidos en nuestro grupo de trabajo, por Aline Ovalle, 2016. En este proceso se fijaron los parámetros que serán utilizados en las respectivas simulaciones de cuatro bacterias y análisis respectivos de robustez del modelo.

Para cumplir el tercer objetivo de este trabajo, fue requerida la puesta en marcha de un biorreactor de 200 mL. Fueron realizados co-cultivos de cuatro bacterias de manera de extrapolar el modelo obtenido en placas de 96 pocillos. Utilizando estos resultados, se evaluó la respuesta del modelo y se determinó el error generado. Un último análisis para evaluar lo que potencialmente puede hacer el modelo fue el efecto ante un bacteriostático, o sustancia que inhibe el crecimiento de una bacteria en particular.

#### **4.1 Construcción de un modelo cinético de consorcios bacterianos en base a inhibiciones causadas por metabolitos intermediarios**

Fue construido un modelo tipo caja-negra, con el fin de predecir la abundancia de una población bacteriana (Figura 4-1). Este modelo consta con ecuaciones de consumo de sustrato, producción y consumo de acetato y lactato (SCFA). Las ecuaciones utilizadas se basan en ecuaciones diferenciales ordinarias de crecimiento microbiano, las que considera dentro de la cinética de Monod el factor de interacción. Como se muestra en la Figura 4-1-1, las interacciones fueron agregadas como un mecanismo de control tipo *feedback* en las ecuaciones de cada microorganismo. Como *input* para la determinación de los parámetros de cada bacteria, se requirió de información tanto en mono-cultivo, como co-cultivos pareados, esto se debe a la cantidad de parámetros que contiene el modelo. El código del modelo construido se encuentra en el Anexo E para el mono-cultivo y los cambios realizados en el co-cultivo se encuentran en el Anexo F.

Para simplificar el análisis, las siguientes suposiciones fueron realizadas:

- a) El término de inhibición fue agregado a la ecuación de Monod;
- b) El microorganismo preferirá el consumo de la fuente principal de carbonos (FOS en este estudio), por sobre otros intermediarios producidos durante la fermentación;
- c) La habilidad de producir o consumir un intermediario fue determinada desde sus vías metabólicas y literatura, esto fue después confirmado en los mono-cultivos.

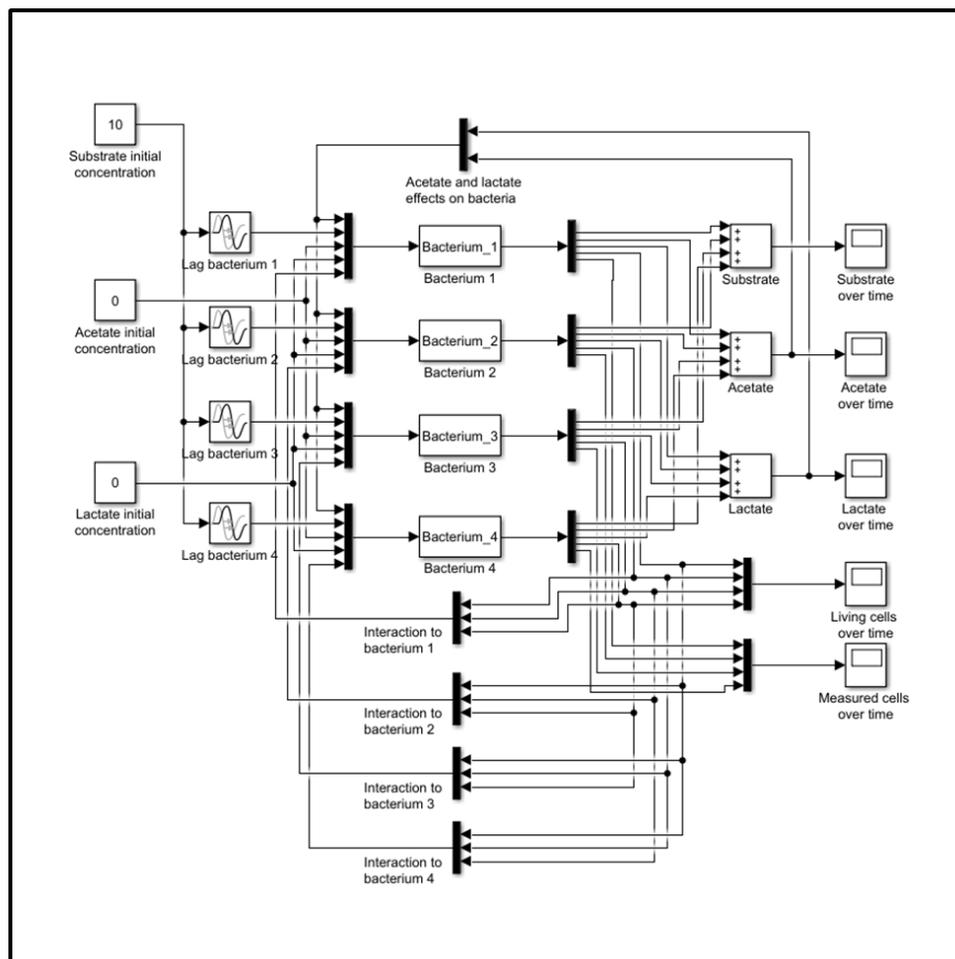


Figura 4-1. Representación general del modelo de consorcio bacteriano. Sustrato inicial, las concentraciones iniciales de producto (acetato y lactato), y las fase *lag* son agregadas como *inputs* del modelo. Crecimiento microbiano, consumo y producción de ácidos son considerados como interacción entre las otras bacterias. Como *output* del modelo, están las variables medidas, estas son la medición de ácidos, consumo de sustrato, células vivas y células totales en el tiempo.

## 4.2 Calibración del modelo en base a resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo de co-cultivos pareados

Con el fin de fijar los parámetros del modelo, primero se recurrió a determinar aquellos que eran poco sensibles e identificables en el mono-cultivo. Se asume que los parámetros fijados en el mono-cultivo debieran permanecer constantes en ambos análisis, pues el coeficiente de interacción debiese acarrear esta nueva inhibición o potenciamiento.

### 4.2.1 Parámetros fijados en mono-cultivo

El modelo de monocultivo consta de 5 ODEs, 17 parámetros y ecuaciones constitutivas con cinéticas de Monod, como previamente se ha descrito (Sacher et al., 2011) y explicado en mayor detalle en (Pinto, Medina, Pérez-correa, & Garrido, 2017). Los parámetros fueron obtenidos como fue descrito previamente en la sección de *fitting* de parámetros. Los resultados experimentales de un trabajo anterior fueron utilizados en este paso. Mono-cultivos en placas de 96-pocillos de *Bifidobacterium infantis* (Bi), *Bacteroides vulgatus* (Bv), *Escherichia coli* (Ec) y *Lactobacillus acidophilus* (La) fueron preparadas utilizando el medio mZMB1 con FOS como fuente de carbono. En el Anexo H se encuentra el código utilizado con el *toolbox* SSmGO en *Matlab*®.

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se encuentran los parámetros fijados iterativamente en el mono-cultivo, donde un promedio de 8 parámetros para cada bacteria fueron mantenidos en el co-cultivo. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**4-2 se encuentran los valores de error calculados en el mono-cultivo, donde se utilizaron los parámetros fijados y los encontrados finalmente para el cálculo con la función objetivo detallada previamente en materiales y métodos.

Tabla 4-1. Parámetros encontrados vía *Scatter Search* utilizando el *toolbox* SSmGO en *Matlab*® para monocultivo.

Descripción del parámetro	Unidad	<i>B. infantis</i>	<i>B. vulgatus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. acidophilus</i>
$K_d$	$h^{-1}$	-	0.0045	0.0001	-
$K_s$	$g$	0.0412	0.0203	0.0190	0.0027
$Y_{xs}$	$\frac{g_{biomass}}{g_{substrate}}$	0.4268	-	-	-
$I_l$	$g$	-	48.8576	-	-
$Y_{ax}$	$\frac{g_{biomass}}{g_{acetate}}$	-	5.1489	-	1
$Y_{lx}$	$\frac{g_{biomass}}{g_{lactate}}$	-	-	1	1.5487
$K_{sa}$	$g$	0.0874	-	-	1
$K_{sl}$	$g$	-	-	0	-
$\beta_{maxA}$	$h^{-1}$	-	-	0.2845	0
$\beta_{maxL}$	$h^{-1}$	-	0.0006	0	0.0011
$\mu_{maxA}$	$h^{-1}$	0	0	-	0
$\mu_{maxL}$	$h^{-1}$	0	-	0	0.0074
$Y_{xA}$	$\frac{g_{biomass}}{g_{acetate}}$	1	1	-	1
$Y_{xL}$	$\frac{g_{biomass}}{g_{lactate}}$	1	-	1	1

Tabla 4-2. Error calculado para datos de mono-cultivo.

Mono-culture	Valor de error calculado
Bi	8.90E+05
Bv	3.13E+02
Ec	2.73E+02
La	3.37E+04

#### 4.2.2 Parámetros encontrados en co-cultivos pareados

Inicialmente, el modelo de dos bacterias consta de 7 ODEs y 36 parámetros, de los cuales 17 corresponden por cada bacteria además de dos parámetros de interacción del co-cultivo. Luego del análisis realizado en mono-cultivo, con la menor cantidad de parámetros variables en la búsqueda de estos, se procedió a analizar los seis co-cultivos pareados, de la misma manera que en mono-cultivo. La diferencia en este punto, y como fue planteado previamente, es la indeterminación del espacio de soluciones posibles para el parámetro de interacción en el rango  $[-x(t), 0)$ , siendo  $x(t)$  la otra bacteria medida. Esto se debe a la construcción de la inhibición en la ecuación de Monod. Cuatro casos fueron probados, cada una de las combinaciones, de manera de encontrar el que generara menor error en la función objetivo.

La Figura 4-2 compara los consumos experimentales y los obtenidos del modelo con FOS como fuente de carbono, en la optimización de parámetros. Se observa que tanto para los resultados experimentales como los simulados ocurre un agotamiento de la fuente de carbono entre las 24 y 48 h. Una excepción es el co-cultivo de BvLa, en el cual a nivel experimental no hubo consumo total del sustrato. Este comportamiento no fue registrado por el modelo, pues ambas bacterias consumieron totalmente el sustrato en el mono-cultivo. Por lo que se asumió que esta regla debía aplicarse para la combinación.

A)

Tiempo (h)	BiBv	BiEc	BiLa	BvEc	BvLa	LaEc
0						
24	2.00	2.90	8.80	7.20	8.40	6.70
48	0.10	0.30	0.60	1.10	4.60	0
72	0	0	0.40	0.50	4.60	0

B)

Tiempo (h)	BiBv	BiEc	BiLa	BvEc	BvLa	LaEc
0						
24	0	4.09	8.88	6.40	0	0
48	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0

Figura 4-2. Consumo de FOS en el tiempo de co-cultivos pareados. A) Resultado experimental. B) Resultado ajustado con el modelo de co-cultivos.

La Figura 4-3 muestra los cambios porcentuales en abundancia de las especies en las seis combinaciones pareadas de los cuatro microorganismos utilizados (Bi – *Bifidobacterium infantis*, Bv – *Bacteroides vulgatus*, Ec – *Escherichia coli*, La – *Lactobacillus acidophilus*). En la mayoría de los casos, se observa que el modelo es capaz de predecir en buena medida los cambios de abundancia en todos los mono-cultivos. Experimentalmente, todos los cultivos con Ec tenían altas copias de DNA 16S, lo que indica una alta concentración inicial de esta bacteria. Sin embargo, durante los crecimientos con Bi y La, estos recuperaron en cierta medida sus porcentajes comparados con Ec, como es de esperar. Además, la información de co-cultivo permitió observar la dominancia de Bv sobre La y Bi durante el crecimiento de FOS, lo que también se ajustó correctamente.

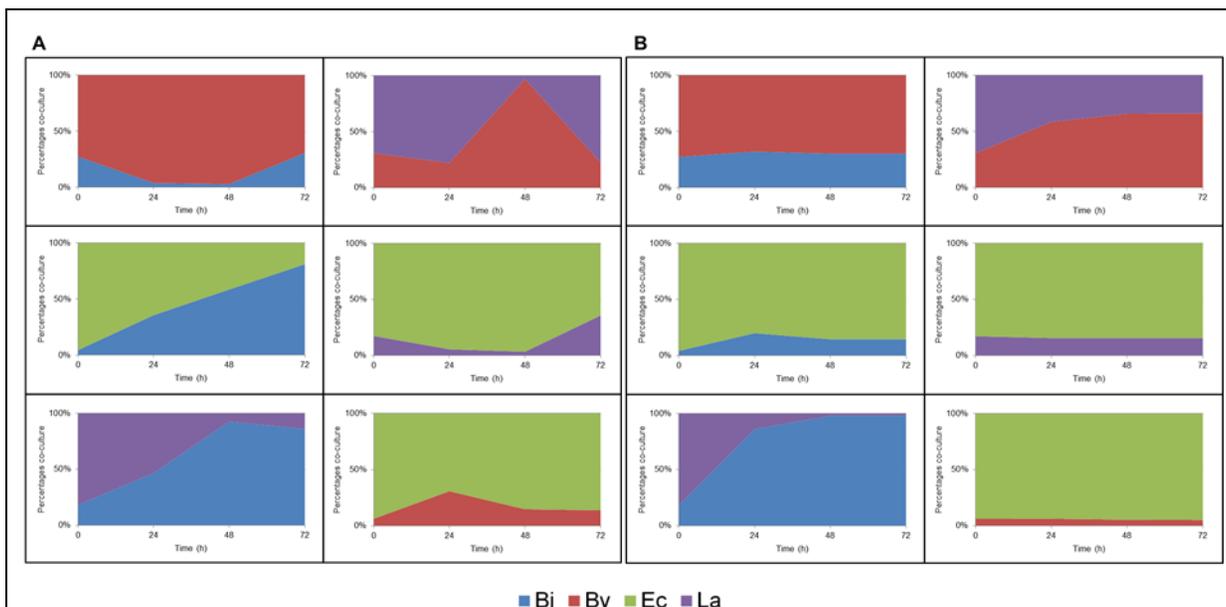


Figura 4-3. Cambios en población bacteriana en el crecimiento en FOS, expresado como porcentaje del co-cultivo en el tiempo. A) Datos experimentales de co-cultivos pareados. B) Ajuste el modelo en la abundancia de especies.

La Figura 4-4 muestra las concentraciones de acetato producidas en el tiempo. En la mayoría de los co-cultivos, el modelo se ajustó correctamente al comportamiento de la producción de acetato. Sin embargo, en los co-cultivos de combinaciones de Bi mostraron grandes concentraciones de acetato con respecto a los demás co-cultivos, y en algunos casos (Bi-La y Bi-Ec) los valores ajustados son más grandes que los observados. Además, el modelo fue capaz de ajustarse en cierta medida a la producción de acetato en BiEc, pero con un peak a distinto tiempo e intensidad, lo que indica que el crecimiento de Bi es clave para los análisis posteriores de sensibilidad e identificabilidad.

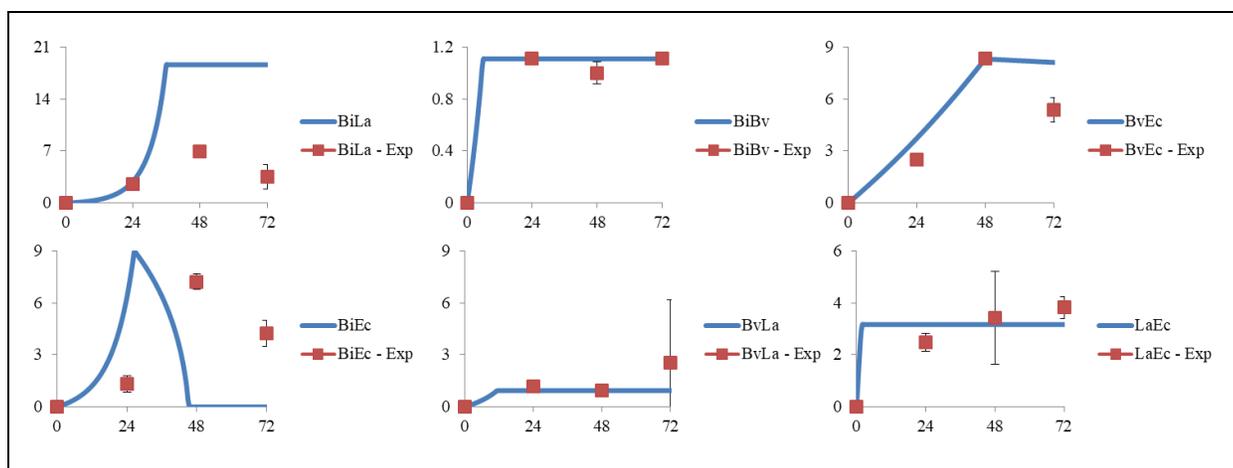


Figura 4-4. Concentración de acetato en los co-cultivos pareados. En color azul se observa el valor ajustado por el modelo, mientras que en rojo los valores experimentales. El eje de las abscisas es el tiempo en h, mientras que el eje de las ordenadas es la concentración de acetato en el medio en g/L.

La Figura 4-5 muestra las concentraciones de lactato producidas en el tiempo. Al igual que en acetato, se observa un buen ajuste del modelo a los datos experimentales. Los ajustes generados en las combinaciones Bi-Bv y Bv-La muestran que se produciría lactato. Sin embargo, las cantidades de lactato producidas eran despreciables, lo que no fue bien reproducido. Finalmente, el co-cultivo de Bv-Ec muestra una producción de lactato experimentalmente, pero por supuestos realizados y estructura del modelo no reprodujeron esta situación.

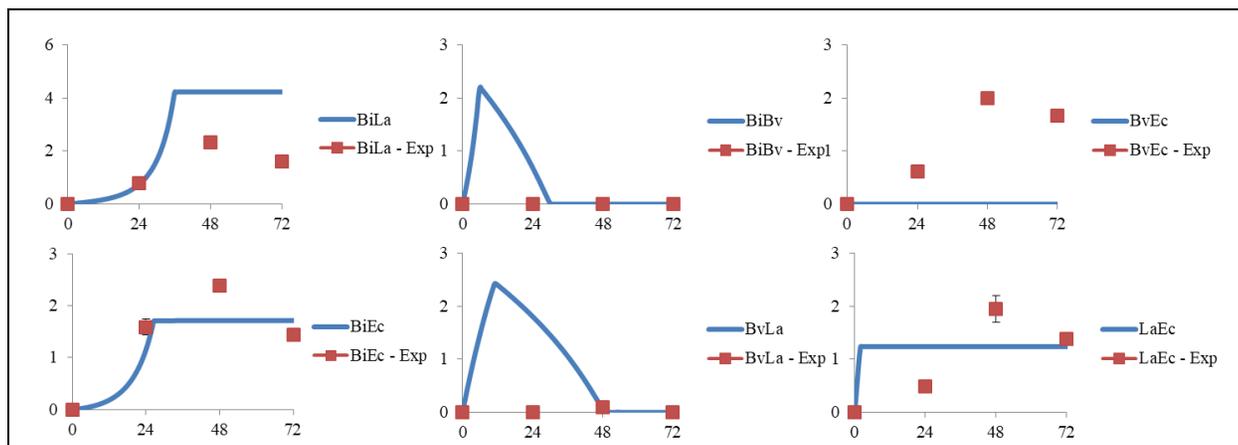


Figura 4-5. Concentración de Lactato en los co-cultivos pareados. En color azul se observa el valor ajustado por el modelo, mientras que en rojo los valores experimentales. El eje de las abscisas es el tiempo en h, mientras que el eje de las ordenadas es la concentración de lactato en el medio en g/L.

Cada parámetro determinado en el co-cultivo es mostrado en la Tabla 4-3, donde los marcados con (\*) son los previamente fijados en mono-cultivo. Además, los parámetros de interacción son mostrados en la Tabla 4-4, estos indican la influencia de la presencia de un microorganismo en la tasa de crecimiento del otro. Un valor positivo en el parámetro de interacción indica inhibición de la otra bacteria, mientras que un valor negativo indica que el crecimiento de la bacteria es beneficiado por la presencia de la otra. Valores cercanos a 0, sugieren una interacción más grande, mientras que valores cerca del límite (-100 o 100) indican que prácticamente no hay efecto. Finalmente, la Tabla 4-5 contiene el error obtenido en el análisis de co-cultivos pareados.

Tabla 4-3. Parámetros finales encontrados via *Scatter Search* para co-cultivos.

Descripción del parámetro	Unidad	<i>B. infantis</i>	<i>B. vulgatus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. acidophilus</i>
$K_d$	$h^{-1}$	0.0139	0.0045*	0.0001*	0.0461
$K_s$	$g$	0.0412*	0.0203*	0.0190*	0.0027*
$\mu_{max}$	$h^{-1}$	0.3344	0.3574	0.5063	0.4282
$Y_{xs}$	$\frac{g_{biomass}}{g_{substrate}}$	0.4268*	0.0054	0.8812	0.1561
$I_a$	$g$	29.9727	3.8514	3.4468	0.1723
$I_l$	$g$	14.8256	48.8576*	8.4569	17.4298
$M_s$	$\frac{g_{substrate}}{g_{biomass}} * h^{-1}$	0.0003	0.0001	0.0055	0.0001
$Y_{ax}$	$\frac{g_{biomass}}{g_{acetate}}$	2.0165	5.1489*	4.8884	1*
$Y_{lx}$	$\frac{g_{biomass}}{g_{lactate}}$	10.2774	10.5967	1*	1.5487*
$K_{sa}$	$g$	0.0874*	0.0231	8.6831	1*
$K_{sl}$	$g$	0.0615	6.2647	0*	0.3547
$\beta_{maxA}$	$h^{-1}$	0.4687	0.1322	0.2845*	0*
$\beta_{maxL}$	$h^{-1}$	0.1497	0.0006*	0*	0.0011*
$\mu_{maxA}$	$h^{-1}$	0*	0*	0.1139	0*
$\mu_{maxL}$	$h^{-1}$	0*	0.0242	0*	0.0074*
$Y_{xA}$	$\frac{g_{biomass}}{g_{acetate}}$	1*	1*	0.3076	1*
$Y_{xL}$	$\frac{g_{biomass}}{g_{lactate}}$	1*	0.0247	1*	1*

Tabla 4-4. Parámetros de interacción encontrados en la optimización de co-cultivos pareados.

	<i>B. infantis</i>	<i>B. vulgatus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. acidophilus</i>

<i>B. infantis</i>	-	99.9993	16.3307	45.0553
<i>B. vulgatus</i>	-40.5290	-	0.1660	1.9998
<i>E. coli</i>	-37.5662	-57.1446	-	-26.6180
<i>L. acidophilus</i>	-70.2315	-32.7482	-99.9985	-

Tabla 4-5. Error calculado para datos de co-cultivo.

Co-cultivo	Valor de error calculado
Bi-Bv	1.42E+05
Bi-Ec	4.51E+03
Bi-La	8.34E+02
Bv-Ec	1.96E+05
Bv-La	1.80E+02
La-Ec	3.51E+02

### 4.3 Validación experimental del modelo

Con el objetivo de validar el modelo presentado, se probó la capacidad de predecir el caso del co-cultivo de las cuatro bacterias en conjunto. Esto fue realizado en

placas de 96 pocillos y en un reactor biológico de 200 mL con pH/oxígeno controlado. Fueron cuantificadas las mismas variables que en el caso de co-cultivos pareados. Con este modelo final de cuatro bacterias, se procedió a realizar análisis de identificabilidad y sensibilidad de parámetros.

Para simular el consorcio bacteriano de cuatro bacterias, se utilizaron los parámetros fijados previamente en mono-cultivo y los encontrados en los co-cultivos pareados.

#### **4.3.1 Co-cultivo de 4 bacterias en mono-cultivo**

Utilizando los resultados de Aline Ovalle, se probó el modelo utilizando el mismo punto de concentraciones iniciales y se simuló la cinética del modelo utilizando las cuatro bacterias interactuantes. Se observa una buena predicción realizada por el modelo para el consumo de FOS en el tiempo, como lo muestra la Figura 4-6. Los valores de  $L_a$ ,  $E_c$  y  $B_i$  fueron cercanamente predichos por el modelo. Bajo estas condiciones,  $B_i$  domina el co-cultivo de cuatro bacterias utilizando FOS como fuente de carbono, seguido de  $L_a$ , como lo es expuesto en la Figura 4-7.

A)		B)	
Tiempo (h)	BiBvEcLa (plates)	Tiempo (h)	BiBvEcLa (plates)
0		0	
24	0.354	24	5
48	0	48	0
72	0	72	0

Figura 4-6. Consumo de FOS en el tiempo de co-cultivos de cuatro bacterias en placas. A) Resultado experimental. B) Resultado ajustado con el modelo de co-cultivo de cuatro bacterias.

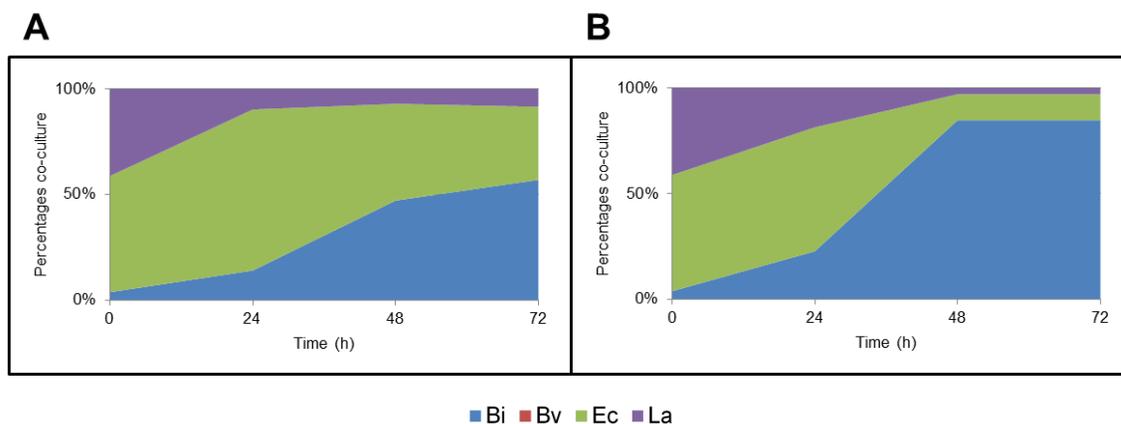


Figura 4-7. Cambios en población bacteriana en el crecimiento en FOS en placas, expresado como porcentaje del co-cultivo en el tiempo. A) Datos experimentales de co-cultivo de cuatro bacterias. B) Ajuste el modelo en la abundancia de especies.

Finalmente, los comportamientos de las concentraciones de acetato (Figura 4-8) y lactato (Figura 4-9) fueron predichos como una progresión similar en el tiempo. Sin embargo, hubo un problema en la cantidad, y eso puede deberse a lo sensible que es el modelo cuando Bi es la bacteria predominante del cultivo. En la Tabla 4-6 se encuentra el valor de la función objetivo calculado con los parámetros encontrados en co-cultivos pareados y la data experimental.

Tabla 4-6. Valor de la función objetivo en el co-cultivo de cuatro-bacterias en el cultivo en placas.

Co-cultivo de 4-bacterias Placas	Valor de la función objetivo
Bi-Bv-Ec-La	5.49E+03

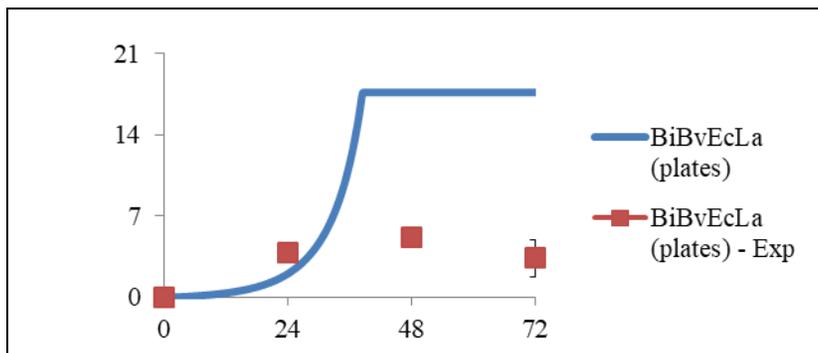


Figura 4-8. Concentración de acetato en el co-cultivo de cuatro bacterias en placas. En color azul se observa el valor ajustado por el modelo, mientras que en rojo los valores experimentales. El eje de las abscisas es el tiempo en h, mientras que el eje de las ordenadas es la concentración de acetato en el medio en g/L.

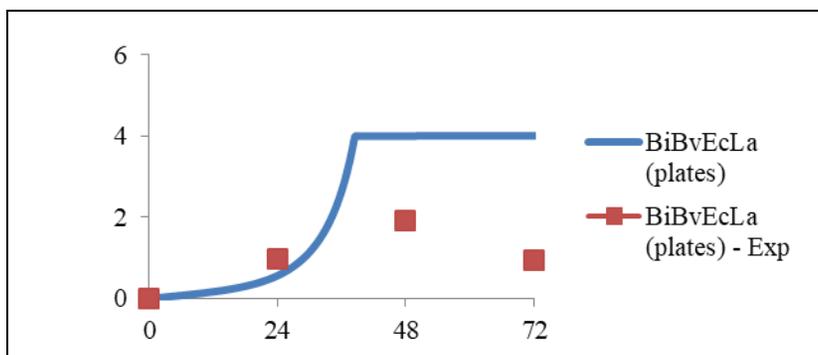


Figura 4-9. Concentración de lactato en los co-cultivo de cuatro bacterias en placas. En color azul se observa el valor ajustado por el modelo, mientras que en rojo los valores experimentales. El eje de las abscisas es el tiempo en h, mientras que el eje de las ordenadas es la concentración de lactato en el medio en g/L.

### 4.3.2 Co-cultivo de 4 bacterias en reactor biológico

Como segunda validación, se utilizó un reactor biológico de 200 mL pH/oxígeno controlado en el cual se midieron las mismas variables que en el cultivo en placas. Este sistema *batch* permite un ambiente controlado y más reproducible que lo reportado previamente en placas, además de proveer un crecimiento más rápido. El cultivo tardó menos de 24 horas en llegar al consumo total de FOS, como se observa en la Figura 10. Esto también es predicho por el modelo presentado. El modelo fue linealmente ajustado para comparaciones e integración en el modelo. Además, el punto inicial de la simulación fue lo que experimentalmente se obtuvo en el reactor.

Al igual que en microplacas, se observa la predominancia de Bi y La, y se mantuvo durante la fermentación, en la que el modelo fue capaz de predecir este cambio de población bacteriana de buena manera (Figura 11).

A)		B)	
Tiempo (h)	BiBvEcLa (bioreactor)	Tiempo (h)	BiBvEcLa (bioreactor)
0		0	
2		2	8.1134
4	7.1890	4	7.2583
6	6.0683	6	6.7863
8	2.4625	8	5.2402
10	0.5097	10	3.3023
12	0.6586	12	0.5613
24	0	24	0

Figura 4-10. Consumo de FOS en el tiempo de co-cultivos de cuatro bacterias en biorreactor. A) Resultado experimental. B) Resultado ajustado con el modelo de co-cultivo de cuatro bacterias.

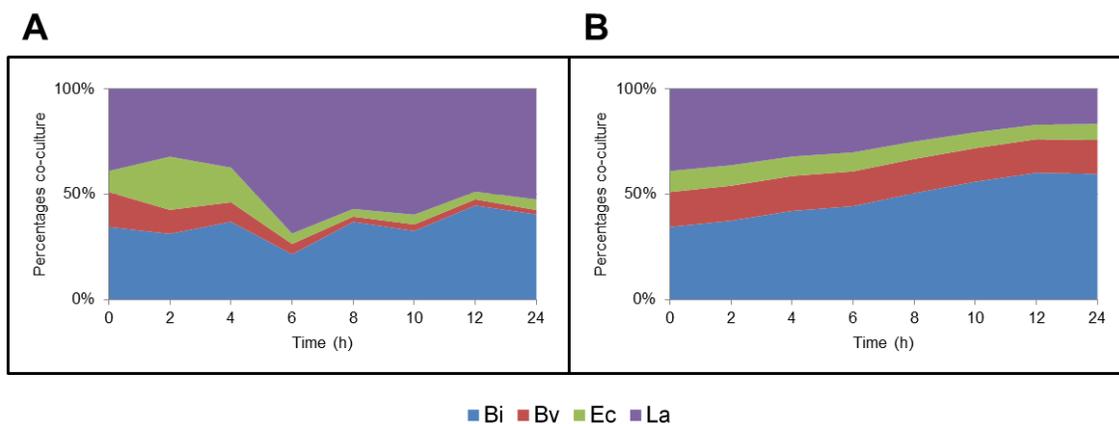


Figura 4-11. Cambios en población bacteriana en el crecimiento en FOS en biorreactor, expresado como porcentaje del co-cultivo en el tiempo. A) Datos experimentales de co-cultivo de cuatro bacterias. B) Ajuste el modelo en la abundancia de especies.

Finalmente, las predicciones de las concentraciones de acetato (Figura 12) y lactato (Figura 13) mostraron un comportamiento similar a lo experimental, la cinética se mantuvo constante. A diferencia de los resultados mostrados previamente, en este co-cultivo La fue un buen competidor con Bi durante el crecimiento en el biorreactor, lo que explica las altas concentraciones de lactato observadas en las muestras. En síntesis, los parámetros que definen la producción de lactato y acetato en Bi parecen ser importantes en el co-cultivo de cuatro-bacterias, ya que Bi es la bacteria predominante. Finalmente, en la Tabla 4-7 se encuentra el valor de la función objetivo calculado con los parámetros encontrados en co-cultivos pareados y la data experimental.

Tabla 4-7. Valor de la función objetivo en el co-cultivo de 4-bacterias en el cultivo en biorreactor.

Co-cultivo de 4-bacterias Biorreactor	Valor de la función objetivo
Bi-Bv-Ec-La	8.58E+01

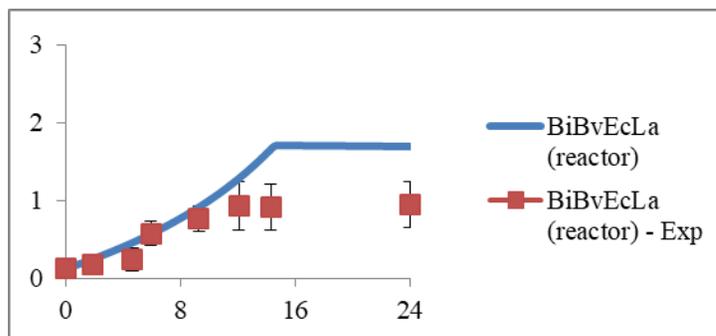


Figura 4-12. Concentración de acetato en el co-cultivo de cuatro bacterias en biorreactor. En color azul se observa el valor ajustado por el modelo, mientras que en rojo los valores experimentales. El eje de las abscisas es el tiempo en h, mientras que el eje de las ordenadas es la concentración de acetato en el medio en g/L.

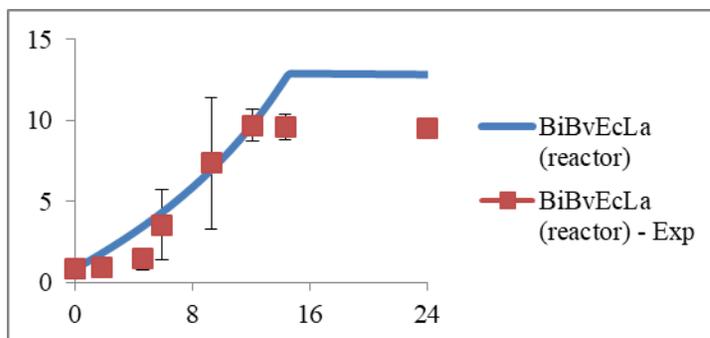


Figura 4-13 Concentración de lactato en los co-cultivo de cuatro bacterias en biorreactor. En color azul se observa el valor ajustado por el modelo, mientras que en rojo los valores experimentales. El eje de las abscisas es el tiempo en h, mientras que el eje de las ordenadas es la concentración de lactato en el medio en g/L.

### 4.3.3 Identificabilidad de parámetros

Este análisis fue realizado para encontrar correlaciones entre los parámetros del modelo. Es un análisis útil para reducir el número de parámetros a fijar, debido a que existe una función que define a uno con otro. Una forma de realizar este análisis y corroborar que un modelo es identificable, es mediante la matriz de covarianza. En la Figura 14, se muestra la matriz de covarianza de los 47 parámetros finales que poseía el modelo de cuatro bacterias. Se destacaron los valores con alta correlación (positiva o negativa). Se observan *clusters* o grupos de parámetros dentro de una misma bacteria que tienen una alta correlación.

Algunas correlaciones entre microorganismos fueron encontradas. Los parámetros de La ( $\mu_{max}$  – Tasa máxima de crecimiento,  $I_a$  – Constante de inhibición de acetato,  $I_l$  – Constante de inhibición de lactato) están inversamente correlacionados con los parámetros de las demás bacterias. En contraste,  $Y_{sx}$  es un parámetro que está directamente correlacionado entre todas las bacterias. Esto significa que los parámetros de La, Bv o Ec pueden ser fijados *a priori*, y luego el modelo debe ser re-evaluado para identificabilidad con un nuevo set de datos experimentales.



### 4.3.4 Sensibilidad de parámetros

Este análisis permite determinar la influencia de cada parámetro en cada ecuación diferencial del modelo. Como lo es mostrado en la Figura 15, los efectos de los parámetros iniciales son importantes en todas las ODE, esto se debe a que Bi es el microorganismo dominante en el consorcio. Específicamente, el segundo parámetro del modelo ( $\mu_{max}$  de Bi) tiene la mayor influencia en todos los demás microorganismos y sus ecuaciones metabólicas. Los parámetros 3 y 4 (constantes de inhibición de acetato y lactato de Bi) tienen influencia en las demás ecuaciones diferenciales, y al igual que el caso de  $\mu_{max}$  de Bi, ambos parámetros afectan directamente el crecimiento de Bi.

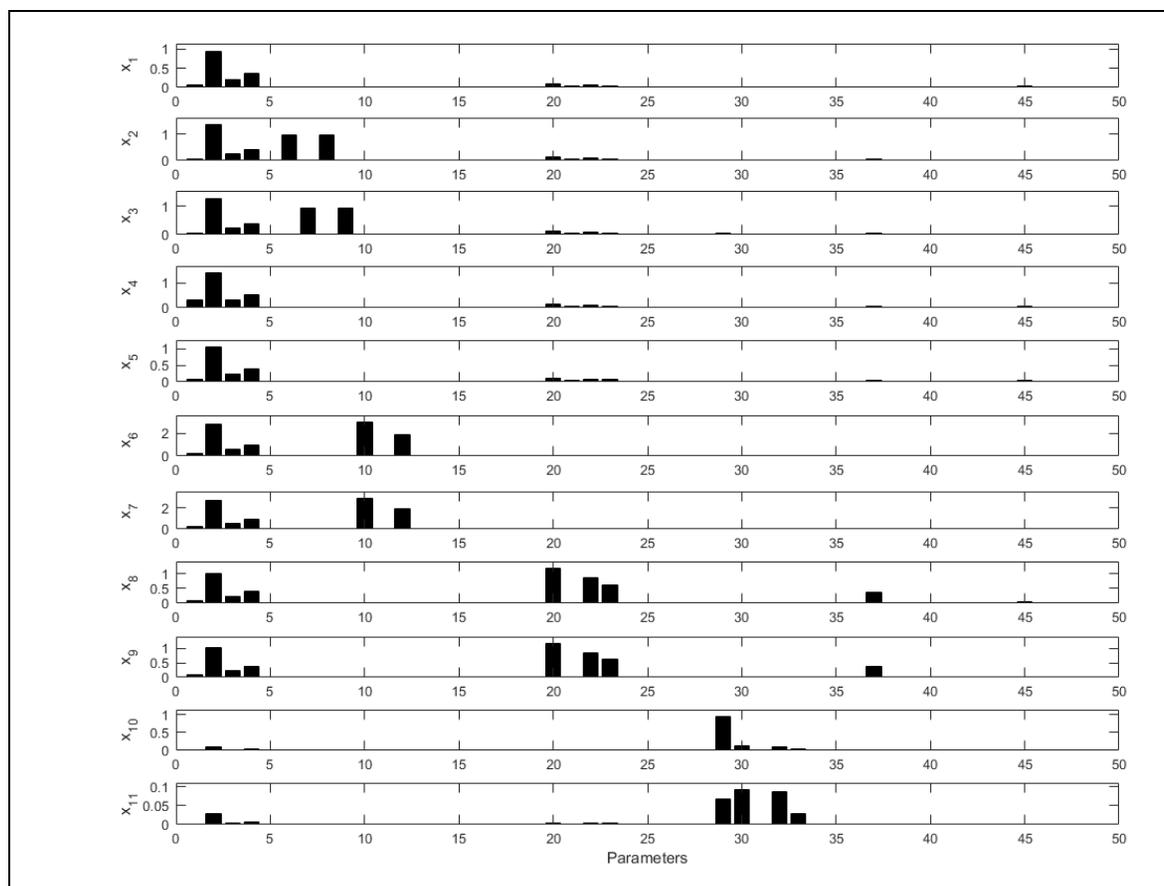


Figura 4-15. Sensibilidad global de los parámetros del modelo. La sensibilidad (eje Y) de cada parámetro (eje X) de cada ODE es mostrada.

Para observar particularmente los efectos de sensibilidad de cada uno de los parámetros del ensayo anterior, se realizaron 5000 simulaciones variando un 5% del parámetro estudiado. La Figura-16 muestra tres casos posibles del resultado obtenido. El cambio más grande, y correspondiendo al análisis de sensibilidad anterior, fue registrado por el parámetro  $\mu_{max}$  de Bi, el cual al cambiar un 5% de su valor, genera un cambio de alrededor de un 4% en el valor de la variable, indicando una gran necesidad de determinar este parámetro con exactitud. Otro caso posible encontrado en el estudio fue el cambio en la cinética de la variable medida, esto puede significar un retardo o adelantamiento de la cinética. La Figura-16B Se observa los cambios del consumo de FOS a causa de fluctuaciones en la constante de inhibición de lactato de Bi. Finalmente, la Figura-16C muestra el caso en que el parámetro no es sensible para la ecuación diferencial. Éste es el caso del rendimiento de producción de acetato de Ec, el cual incluso variando un 50% del parámetro no ejerce ningún cambio en la ecuación que corresponde el crecimiento de Bv.

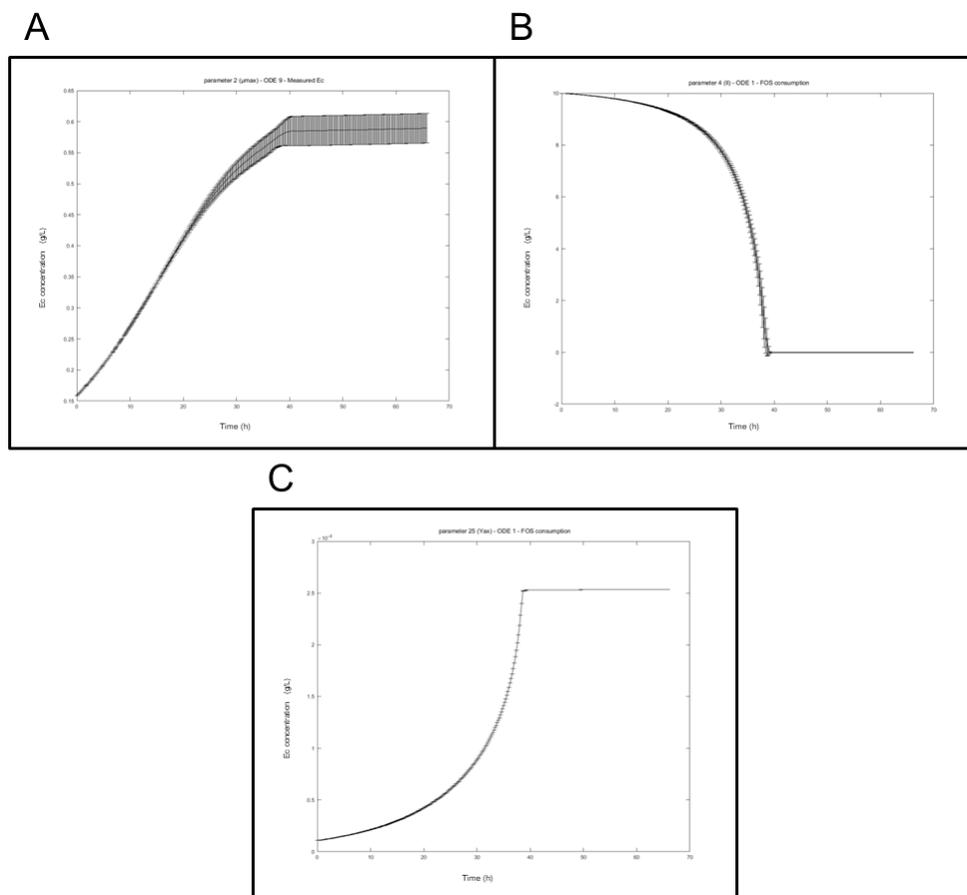


Figura 4-16. Variación de los valores de las ODE (en g/L) a causa de un cambio aleatorio de  $\pm 5\%$  en un parámetro en 5000 iteraciones. A) El peor escenario, parámetro 2 en la ODE de crecimiento de Ec, la cual cambia el valor final. B) Cambio de cinética, parámetro 4 en la ODE de consumo de FOS, la cual cambia la velocidad en la cual la ODE alcanza su valor final. C) Parámetro no sensible, parámetro 25 en la ODE de crecimiento de Bv

#### 4.4 Simulación caso bacteriostático

Como último análisis, para evaluar la capacidad predictiva del modelo se estudió el caso de la presencia de un bacteriostático en el medio de cultivo. La Figura-17 presenta la simulación de este caso (un bacteriostático, es una sustancia que afecta

el crecimiento bacteriano, inhibiéndolo parcial o totalmente, pero no produce muerte bacteriana) utilizando las condiciones iniciales del co-cultivo en placas. Como resultado se observa que en todo co-cultivo donde Bi es capaz de crecer, siempre predominará frente a las demás especies. Por otra parte, si Bi es inhibido, Ec predominará en el co-cultivo, y se debe a la cantidad de acetato que se está produciendo.

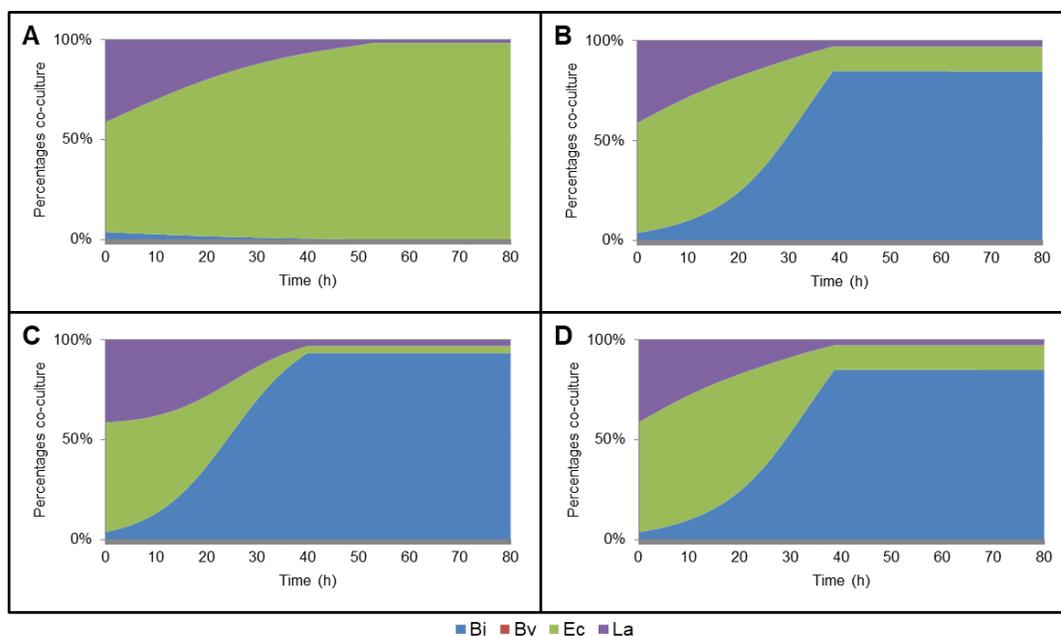


Figura 4-17. Co-cultivo de 4 bacterias bajo el efecto de una sustancia bacteriostática, con las concentraciones iniciales del cultivo en placas. A) No puede crecer *Bifidobacterium infantis*; B) No puede crecer *Bacteroides vulgatus*; C) No puede crecer *Escherichia coli*; D) No puede crecer *Lactobacillus acidophilus*.

## 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El microbioma intestinal es una comunidad compleja de microorganismos que regulan numerosas respuestas del individuo. Su directa conexión con nuestra salud, resalta la importancia de entender los fenómenos que rigen su composición y que llevan al microbioma a un estado alterado, o disbiosis (Cox et al., 2017). Por consiguiente, la determinación de factores claves en la instauración y mantención del microbioma intestinal ha sido la meta de numerosos estudios (Greenblum, Turnbaugh, & Borenstein, 2012; Kettle et al., 2015; Shashkova et al., 2016; Trosvik, Rudi, et al., 2010).

Uno de los principales factores reguladores del microbioma intestinal es la dieta del individuo, lo que define cuáles especies predominarán en este complejo arreglo de especies. El catabolismo y fermentación de polisacáridos complejos genera intermediarios metabólicos que pueden producir *cross-feeding* entre los microorganismos. En el estudio presentado, se evaluó si mediante un modelo matemático cinético basado en ecuaciones diferenciales ordinarias, que incorpora estas interacciones metabólicas, se puede replicar o predecir abundancias e interacciones en un consorcio simple de especies. Para esto, fueron escogidas cuatro bacterias representativas del microbioma intestinal infantil (*Bifidobacterium infantis*, *Bacteroides vulgatus*, *Escherichia coli* y *Lactobacillus acidophilus*), y utilizando datos de mono y co-cultivos pareados se diseñó, ajustó y posteriormente se validó el modelo. Para esto se utilizó un biorreactor, de manera de probar el poder predictivo del modelo en un ambiente controlado en pH (5.5) y en anaerobiosis. Como lo fue esperado, el crecimiento de las bacterias fue más rápido en el biorreactor que en microplacas (Figura 4-11, A).

El sistema fue estudiado usando FOS como fuente de carbono, un prebiótico presente en las fórmulas lácteas infantiles (Roberfroid et al., 2010). Aunque sea un oligosacárido de grado de polimerización variable entre 2 a 7 unidades de fructosa, todas las bacterias definidas para el consorcio eran capaces de crecer en este sustrato, incluso *E. coli* fue capaz de crecer consumiendo pequeñas trazas de mono o disacáridos presentes en FOS (Roberfroid et al., 2010). Además, otros mecanismos moleculares distintos para el

consumo de FOS han sido previamente descritos en otras bacterias como *L. acidophilus* (Barrangou, Altermann, Hutkins, Cano, & Klaenhammer, 2003). En la mayoría de los ajustes y predicciones realizados por el modelo, este fue capaz de replicar el comportamiento *in vitro* del consorcio, ya sea para co-cultivos pareados, como para el co-cultivo de cuatro bacterias. Esto se mantuvo para el caso de microplacas y el caso del biorreactor, un ambiente controlado y con una mayor representación biológica. Todo esto indica que el modelo fue capaz de predecir cambios en la abundancia bacteriana utilizando sólo información de co-cultivos pareados para la calibración. Este resultado indica que las interacciones metabólicas son un factor importante dictando la composición de un microbioma simple, y estas observaciones pueden eventualmente ser escaladas a microbiomas más complejos.

Se observó experimentalmente que en el mono-cultivo de Bi y en los co-cultivos donde Bi predomina, la cantidad producida de acetato y lactato están en la razón 3:2 (Garrido, Ruiz-moyano, Jimenez-espinoza, & Eom, 2013). Esto también se observó en el crecimiento dentro del biorreactor. La producción de acetato por Ec fue sobreestimada por el modelo (0.21 g de acetato producido por 1 g de FOS consumido). En general, se observó que Ec fue beneficiado por las actividades de los demás microorganismos, ya que la liberación al medio de mono y disacáridos permiten el crecimiento de esta bacteria (Tabla 4-4) (Ravcheev, Godzik, Osterman, & Rodionov, 2013; Vuoristo et al., 2015), además del efecto del acetato como fuente de carbono. Otra posibilidad del crecimiento de Ec es la fermentación de aminoácidos (Lulit & Strohl, 1990). Además, la producción de lactato por La determinada por el modelo fue de aproximadamente 0.63 g de lactato por 1 g de FOS consumido, rendimiento similar al reportado en literatura con lactosa como fuente de carbono (Fu & Mathews, 1999).

Por otra parte, en el sistema estudiado la presencia de La durante el crecimiento en FOS tiende a inhibir el crecimiento de todas las otras bacterias (Tabla 4-4, Figura 4-3). Esto se debe a que la producción de lactato por La es alta (Figura 4-5) y que además posee una tasa de crecimiento más lento que los otros miembros del consorcio.

En co-cultivos donde Bi era la bacteria predominante, se observó una sobreestimación de las concentraciones de acetato y lactato. Los parámetros pueden ser mejor ajustados al utilizar datos con mayor resolución y mediciones más frecuentes. Debido a que el modelo

en co-cultivos pareados define intervalos donde los parámetros son más sensibles, es posible determinar de manera más precisa mediante un aumento en el muestreo. Como se trata de un modelo cinético, los puntos donde el sustrato es completamente consumido y microorganismos cambian la preferencia de sustrato son críticos, lo que es necesario un aumento del muestreo entre las horas 24 y 36. Además, para los cultivos de Bv y Ec, las concentraciones fueron subestimadas por vías metabólicas características de sus géneros (Neis, Dejong, & Rensen, 2015; Vuoristo et al., 2015).

El análisis del agente bacteriostático sugiere que Bi debe predominar si cualquier otra bacteria es inhibida. Sin embargo, cuando Bi es inhibida, La o Bv debieran crecer más que Ec, por las propiedades glicolíticas de estas bacterias (Ravcheev et al., 2013). Esto es una limitación del modelo, pues no considera funciones que describan la ruptura de carbohidratos complejos que genera Bv, o fermentación de aminoácidos para ser utilizados como fuente de carbono. Finalmente, trabajo a futuro corroborará estas hipótesis, mediante la adición experimental de antibióticos que permita determinar y predecir el comportamiento de estos sistemas.

## 6. PROSPECCIONES

Se espera que el modelo desarrollado en este trabajo sea el punto inicial en aproximaciones que permitan predecir el comportamiento del microbioma de acuerdo a variaciones en la dieta. Futuras investigaciones podrán incorporar nuevas variables y parámetros al sistema de ecuaciones, como fermentación de proteínas, utilización de cadenas cortas de oligosacáridos, y la evaluación del modelo en otros sustratos. Es posible que estas aproximaciones sean usadas cambiando la función objetivo actual, que es reducir el error respecto a datos experimentales, a poder maximizar la producción de ciertos ácidos o reducir la producción de compuestos tóxicos, mediante el diseño asociado a ingeniería del microbioma.

El análisis realizado del efecto del bacteriostático en el co-cultivo puede ser utilizado para determinar especies claves en la estabilidad de la población. Esto puede ser validado mediante co-cultivos con algún alterador del crecimiento para *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Escherichia* y *Lactobacillus*. En consiguiente, la búsqueda de estos inhibidores de crecimiento o metabolitos que puedan generar muerte bacteriana de una especie en particular, sería útil para eliminar especies que perjudiquen el crecimiento de especies potencialmente comensales de la población.

**BIBLIOGRAFIA**

- Anahtar, M. N., Bowman, B. A., & Kwon, D. S. (2016). Efficient Nucleic Acid Extraction and 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Community Characterization. *Journal of Visualized Experiments*, 15(110), 1–11. <http://doi.org/10.3791/53939>
- Arrieta, M., Stiemsma, L. T., Dimitriu, P. A., Thorson, L., Russell, S., Yurist-doutsch, S., ... Finlay, B. B. (2015). Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma, 7(307).
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., ... Jun, W. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host and Microbe*, 17(5), 690–703. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Bailey, L. C., Forrest, C. B., Zhang, P., Richards, T. M., Livshits, A., & Derusso, P. A. (2014). Association of Antibiotics in Infancy With Early Childhood Obesity, 19104(11), 1063–1069. <http://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.1539>
- Barrangou, R., Altermann, E., Hutkins, R., Cano, R., & Klaenhammer, T. R. (2003). Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*, 100(15).
- Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G. T., & McMurdo, M. E. T. (2004, junio). Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004>
- Batista, D., Carvalho, A. P., Costa, R., Coutinho, R., Dobretsov, S., Verstraete, W., ... Sherr, E. B. (2002). Comparative integrated omics: identification of key functionalities in microbial community-wide metabolic networks. *npj Biofilms and Microbiomes*, 57(6), 10–13. <http://doi.org/10.1038/npjbio>
- ChemAxon. (2016). Marvin 16.3.28. Recuperado a partir de <https://www.chemaxon.com/>
- Chervonsky, A. V. (2010). Influence of microbial environment on autoimmunity, 11(1), 28–36. <http://doi.org/10.1038/ni.1801>
- Cox, L. M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A. V., Leung, J. M., Cho, I., ... Blaser, M. J. (2017). Altering the Intestinal Microbiota during a Critical Developmental Window Has Lasting Metabolic Consequences. *Cell*, 158(4), 705–721. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.052>

- Dominguez-bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., & Hidalgo, G. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns, *107*(26), 11971–11975. <http://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Duncan, S. H., Louis, P., Thomson, J. M., & Flint, H. J. (2009). The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, *11*(8), 2112–2122. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01931.x>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Sargent, M., Gill, S. R., ... Relman, D. A. (2006). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora Paul, *308*(5728), 1635–1638.
- Egan, M., Motherway, M. O. C., Ventura, M., & van Sinderen, D. (2014). Metabolism of sialic acid by *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(14), 4414–4426. <http://doi.org/10.1128/AEM.01114-14>
- Egan, M., O'Connell Motherway, M., Kilcoyne, M., Kane, M., Joshi, L., Ventura, M., & van Sinderen, D. (2014). Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in a mucin-based medium. *BMC Microbiology*, *14*(1), 282. <http://doi.org/10.1186/s12866-014-0282-7>
- Egea, J. A., Rodríguez-Fernández, M., Banga, J. R., & Martí, R. (2007). Scatter search for chemical and bio-process optimization. *Journal of Global Optimization*, *37*(3), 481–503. <http://doi.org/10.1007/s10898-006-9075-3>
- Faith, J. J., Faith, J. J., McNulty, N. P., Rey, F. E., & Gordon, J. I. (2013). Response to Diet in Gnotobiotic Mice, *101*(2011). <http://doi.org/10.1126/science.1206025>
- Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(8), 538–550. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2832>
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., Vos, W. M. De, & Akkermans, A. D. L. (2002). Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates, *68*(1), 219–226. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.1.219>
- Fouhy, F., Ross, R. P., Fitzgerald, G., Stanton, C., Cotter, P. D., Food, E., & Authority, S. (2012). Knowledge , knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience ., (June), 203–220.
- Fu, W., & Mathews, A. P. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus*

plantarum : kinetic model and effects of pH , substrate , and oxygen, 3(February), 163–170.

Garrido, D., Ruiz-moyano, S., Jimenez-espinoza, R., & Eom, H. (2013). Utilization of galactooligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* isolates. *Food Microbiology*, 33(2), 262–270. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.003>

Gill, S., Pop, M., DeBoy, R., & Eckburg, P. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778), 1355–1359. <http://doi.org/10.1126/science.1124234>.Metagenomic

Greenblum, S., Turnbaugh, P. J., & Borenstein, E. (2012). Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and in flammatory bowel disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), 594–599. <http://doi.org/10.1073/pnas.1116053109> /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1116053109

Hastie, T., & Tibshirani, R. (1990). Generalized Additive Models. *Statistical Science*, 10(4), 354–363. <http://doi.org/10.2307/2246134>

Hecht, A. L., Casterline, B. W., Earley, Z. M., Goo, Y. A., Goodlett, D. R., & Wardenburg, J. B. (2016). Strain competition restricts colonization of an enteric pathogen and prevents colitis, 17(9), 1281–1291.

Hooper, L. V, Littman, D. R., Macpherson, A. J., & Program, M. P. (2015). Interactions between the microbiota and the immune system, 336(6086), 1268–1273. <http://doi.org/10.1126/science.1223490>.Interactions

Horz, H.-P. (2015). Archaeal Lineages within the Human Microbiome: Absent, Rare or Elusive? *Life*, 5(2), 1333–1345. <http://doi.org/10.3390/life5021333>

Hoskin-parr, L., Teyhan, A., Blocker, A., & Henderson, A. J. W. (2013). Antibiotic exposure in the first two years of life and development of asthma and other allergic diseases by 7 . 5 yr: A dose-dependent relationship, 24, 762–771. <http://doi.org/10.1111/pai.12153>

Jacquez, A., & Arbor, A. (1985). Numerical Parameter Identifiability and Estimability : Integrating Identifiability , Estimability , and Optimal Sampling Design, 227, 201–227.

Kanehisa, M. (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 34(90001), D354–D357. <http://doi.org/10.1093/nar/gkj102>

Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., Palva, A., & Rinttila, T. (2004). Development of an

extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR, 1166–1177. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x>

Kettle, H., Louis, P., Holtrop, G., Duncan, S. H., & Flint, H. J. (2015). Modelling the emergent dynamics and major metabolites of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, *17*(5), 1615–1630. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.12599>

Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2010). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. <http://doi.org/10.1073/pnas.1000081107>

Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, *19*(1), 29–41. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>

Lulit, G. W., & Strohl, W. R. (1990). Comparison of Growth , Acetate Production , and Acetate Inhibition of Escherichia coli Strains in Batch and Fed-Batch Fermentations, *56*(4), 1004–1011.

Magnúsdóttir, S., Heinken, A., Kutt, L., Ravcheev, D. A., Bauer, E., Noronha, A., ... Thiele, I. (2016). Generation of genome-scale metabolic reconstructions for 773 members of the human gut microbiota. *Nature Publishing Group*, *35*(1). <http://doi.org/10.1038/nbt.3703>

Marko Kalliomäki, Maria Carmen Collado, Seppo Salminen, E. I. (2008). Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight, (1), 534–538.

Matamoros, S., Gras-leguen, C., Vacon, L., Potel, G., & Cochetiere, M. D. La. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health, *21*(4), 167–173. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2012.12.001>

Mendoza, S. N., Cañón, P. M., Contreras, A., Ribbeck, M., & Agosin, E. (2017). Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Oenococcus oeni* to assess wine malolactic fermentation. *Frontiers in Microbiology*, *8*(March), 534. <http://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00534>

Mikkelsen, K. H., Knop, F. K., Frost, M., & Hallas, J. (2015). Use of Antibiotics and Risk of Type 2 Diabetes: A Population-Based Case-Control Study, (August), 1–8. <http://doi.org/10.1210/jc.2015-2696>

- Moens, F., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacterial inulin-type fructan degradation capacity determines cross-feeding interactions between bifidobacteria and *Faecalibacterium prausnitzii*. *International Journal of Food Microbiology*, *231*, 76–85. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.015>
- Neis, E. P. J. G., Dejong, C. H. C., & Rensen, S. S. (2015). The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism, 2930–2946. <http://doi.org/10.3390/nu7042930>
- Pinto, F., Medina, D. A., Pérez-correa, J. R., & Garrido, D. (2017). Modeling Metabolic Interactions in a Consortium of the Infant Gut Microbiome, *8*, 1–12. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02507>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, S., Manichanh, C., ... Yang, H. (2013). A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing, *464*(7285), 59–65. <http://doi.org/10.1038/nature08821.A>
- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*(5), 996–1047. <http://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>
- Rakoff-Nahoum, S., Foster, K. R., & Comstock, L. E. (2016). The evolution of cooperation within the gut microbiota. *Nature*, *533*(7602), 255–259. <http://doi.org/10.1038/nature17626>
- Ravcheev, D. A., Godzik, A., Osterman, A. L., & Rodionov, D. A. (2013). Polysaccharides utilization in human gut bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron*: comparative genomics reconstruction of metabolic and regulatory networks, 1–17.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., ... Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, *104*(S2), S1–S63. <http://doi.org/DOI: 10.1017/S0007114510003363>
- Rodriguez-Fernandez, M., Egea, J. a, & Banga, J. R. (2006). Novel metaheuristic for parameter estimation in nonlinear dynamic biological systems. *BMC bioinformatics*, *7*, 483. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-7-483>
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., ... Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life, *1*, 1–17.
- Rogowski, A., Briggs, J. A., Mortimer, J. C., Tryfona, T., Terrapon, N., Lowe, E. C., ... Bolam, D. N. (2015). Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large

- intestine. *Nature Communications*, 6(May), 7481. <http://doi.org/10.1038/ncomms8481>
- Sacher, J., Saa, P., Cárcamo, M., López, J., Gelmi, C. A., & Pérez-Correa, R. (2011). Improved calibration of a solid substrate fermentation model. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(5). <http://doi.org/10.2225/vol14-issue5-fulltext-7>
- Schnapp, S. R., Curtis, W. R., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (1991). Estimation of Growth Yield and Maintenance Coefficient of Plant Cell Suspensions. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(10), 1131–1136. <http://doi.org/10.1002/bit.260381003>
- Shashkova, T., Popenko, A., Tyakht, A., Peskov, K., Kosinsky, Y., Bogolubsky, L., ... Govorun, V. (2016). Agent based modeling of human gut microbiome interactions and perturbations. *PLoS ONE*, 11(2), 1–26. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0148386>
- Sivakumar, A., Srinivasaraghavan, T., Swaminathan, T., & Baradarajan, A. (1994). Extended monod kinetics for substrate inhibited systems. *Bioprocess Engineering*, 11(5), 185–188. <http://doi.org/10.1007/s004490050067>
- Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Chow, J., Wolf, B. W., ... Fahey, G. C. (2002). Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* Modify Gut Microbial Populations, Total Tract Nutrient Digestibilities and Fecal Protein Catabolite Concentrations in Healthy Adult Dogs 1, (September), 3721–3731.
- Tamburini, S., Shen, N., Wu, H. C., & Clemente, J. C. (2016). The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature Medicine*, 22(7), 713–722. <http://doi.org/10.1038/nm.4142>
- Theoklis, E., & Haynes, K. (2012). Antibiotic Exposure and IBD Development Among Children : A Population-Based Cohort Study, 77. <http://doi.org/10.1542/peds.2011-3886>
- Thiele, Ines; Palsson, B. (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat Protoc*, 5(1), 93–121. <http://doi.org/10.1038/nprot.2009.203.A>
- Thiele, I., Heinken, A., & Fleming, R. M. T. (2013). A systems biology approach to studying the role of microbes in human health. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(1), 4–12. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.001>
- Thiele, I., Vlassis, N., & Fleming, R. M. T. (2014). FASTGAPFILL: Efficient gap filling in metabolic networks. *Bioinformatics*, 30(17), 2529–2531. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu321>
- Thomson, P., Medina, D. A., & Garrido, D. (2017). Human milk oligosaccharides and

infant gut bi fi do bacteria : Molecular strategies for their utilization. *Food Microbiology*, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.001>

Trosvik, P., de Muinck, E. J., & Stenseth, N. C. (2015). Biotic interactions and temporal dynamics of the human gastrointestinal microbiota. *The ISME journal*, 9(3), 533–41. <http://doi.org/10.1038/ismej.2014.147>

Trosvik, P., Rudi, K., Strætkvern, K. O., Jakobsen, K. S., Næs, T., & Stenseth, N. C. (2010). Web of ecological interactions in an experimental gut microbiota, 12, 2677–2687. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02236.x>

Trosvik, P., Stenseth, N. C., & Rudi, K. (2010). Convergent temporal dynamics of the human infant gut microbiota. *The ISME Journal*, 4, 151–158. <http://doi.org/10.1038/ismej.2009.96>

Tuomivaara, S. T., Yaoi, K., O'Neill, M. A., & York, W. S. (2015). Generation and structural validation of a library of diverse xyloglucan-derived oligosaccharides, including an update on xyloglucan nomenclature. *Carbohydrate Research*, 402, 56–66. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.031>

Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Ley, R. E., Sogin, M. L., ... Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(32089), 480–484. <http://doi.org/10.1038/nature07540.A>

Vogt, S. L., Peña-Díaz, J., & Finlay, B. B. (2015). Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe*, 34, 106–115. <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.05.002>

Vuoristo, K. S., Mars, A. E., Sangra, J. V., Springer, J., Eggink, G., & Sanders, J. P. M. (2015). Metabolic engineering of the mixed - acid fermentation pathway of *Escherichia coli* for anaerobic production of glutamate and itaconate. *AMB Express*. <http://doi.org/10.1186/s13568-015-0147-y>

Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., ... Flint, H. J. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME Journal*, 5(2), 220–230. <http://doi.org/10.1038/ismej.2010.118>

Ward, T. (2014). The Information Theoretically Efficient Model ( ITEM ): A model for computerized analysis of large datasets, 1–54.

Wilson, M. (s. f.). *Microbial Inhabitants of Humans. Their ecology and role in health and disease.*

Wood, S. N. (2008). Fast stable direct fitting and smoothness selection for generalized additive models. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Statistical Methodology*, 70(3), 495–518. <http://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2007.00646.x>

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-bello, M. G., Contreras, M., ... Knights, D. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography, (Ivic). <http://doi.org/10.1038/nature11053>

Zhang, G., Mills, D. A., & Block, D. E. (2009). Development of Chemically Defined Media Supporting High-Cell-Density Growth of Lactococci, Enterococci, and Streptococci, 75(4), 1080–1087. <http://doi.org/10.1128/AEM.01416-08>

**ANEXOS**

## ANEXO A : SEMINARIO PRESENTADO EN COPEC-UC

El modelo propuesto en este trabajo fue presentado en el 12° Seminario Internacional de Copec-UC. Bioingeniería: Ciencia y tecnología para la vida.



12° Seminario Internacional de Copec-UC  
Bioingeniería: Ciencia y tecnología para la vida



### Construcción de un modelo dinámico basado en interacciones metabólicas entre especies del microbioma intestinal infantil

**Francisco Pinto Chávez<sup>1</sup>, José Ricardo Pérez-Correa<sup>1</sup>, Daniel Garrido Cortés<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos, Escuela de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile, Av. Vicuña Mackenna 4860, Santiago, Chile. Tel: +56 2 2354-anexo. [fpinto@uc.cl](mailto:fpinto@uc.cl), [dgarrido@ing.puc.cl](mailto:dgarrido@ing.puc.cl)

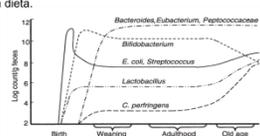
---

#### Resumen

La composición del microbioma intestinal, y cuáles son las fuerzas que determinan el ensamblaje del microbioma en el recién nacido y el adulto, pueden ser simuladas y estudiadas usando modelos matemáticos. Estos modelos se basan en composición metagenómica y principios ecológicos entre especies. Un elemento no considerado en estos elementos son las interacciones metabólicas, donde las bacterias liberan productos de degradación de azúcares, permitiendo que otras especies que crecen en oligosacáridos más simples, o donde ciertas bacterias liberan ácidos como acetato y lactato que son fermentados por otros microorganismos. Por otro lado estos metabolitos pueden inhibir el crecimiento de otras bacterias. Las interacciones microbianas pueden ser de competencia o cooperación, y se asume que alteran el crecimiento de cada microorganismo. En este estudio, se formuló un modelo dinámico basado en interacciones metabólicas que permite predecir la alteración en el microbioma intestinal por cambios en la dieta.

#### Introducción

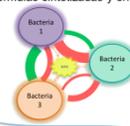
La composición del microbioma intestinal infantil depende principalmente de dos factores, el tipo de parto y la dieta del neonato. Su composición tiene un impacto directo en la fisiología y salud del ser humano. Durante la lactancia, la abundancia de oligosacáridos de leche materna (HMO) estimula y favorece el crecimiento del género *Bifidobacterium* [1]. Al finalizar la lactancia, ocurre un período de transición donde el género *Bacteroides* comienza a aumentar debido al consumo de polisacáridos de la dieta adulta (pectina, xilano, almidón, entre otros). El objetivo del presente trabajo es la formulación de un modelo dinámico basado en interacciones metabólicas que permita predecir la alteración en el microbioma intestinal por cambios en la dieta.



**Figura 1:** Predominancia de géneros bacterianos en el microbioma intestinal durante la vida humana [1].

#### Métodos

- Como modelo de estudio, se utilizó un modelo de consorcio bacteriano de crecimiento con inhibición y producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA).
- Las fuentes de carbono a comparar y analizar fueron FOS y 2FL, oligosacáridos presentes en fórmulas sintetizadas y en la leche materna.



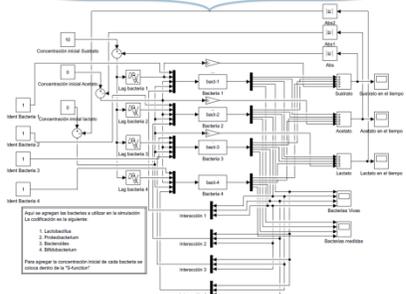
$$\frac{dX}{dt} = \mu X - k_d X + \left( \sum \mu_i X_i \right) + \alpha_i X_j$$

$$\frac{dX_{in}}{dt} = \mu X$$

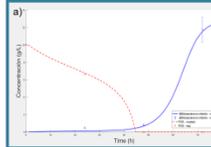
$$\frac{dP_i}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{P_i/X}}$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{S/X}}$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{(S + K_s) \left( 1 + \frac{I}{K_I} \right)}$$



#### Resultados



a)



b)

**Figura 3:** (a) Estimación de parámetros de 3 mono-cultivos en presencia de FOS como fuente de carbono para *Bifidobacterium infantis*, *Escherichia coli* y *Bacteroides vulgatus*. (b) Análisis de sensibilidad de parámetros del modelo.

#### Conclusiones

- El desarrollo de un modelo dinámico para cultivos *batch* de interacciones bacterianas nos permitió determinar las concentraciones de distintas especies bacterianas ante cambios en la dieta (2FL y FOS).
- Los fenómenos y correlaciones observadas durante la calibración del modelo corresponden a los comportamientos previamente reportados en literatura [2] [3] [4].

#### Perspectivas

- La construcción de un modelo dinámico basado en interacciones metabólicas entre especies del microbioma intestinal infantil nos permitirá optimizar el crecimiento de bacterias beneficiosas para la salud infantil.
- Nuestro modelo puede ser extrapolado al microbioma adulto, para determinar las interacciones de especies potencialmente beneficiosas en el tracto digestivo (por ejemplo especies productoras de butirato como lo son algunos miembros del género *Clostridium*, *Faecalibacterium* y *Eubacterium*).

**Agradecimientos**  
Fondecyt n° 11130518. Laboratorio Eduardo Agosin (PUC), Laboratorio Ricardo Pérez (PUC), Laboratorio Daniel Garrido (PUC)

**Referencias**  
[1] Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., ... Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl., 4578–4585.  
[2] Aline Oxville. Tesis de magister. Interacciones medidas por prebióticos en un consorcio modelo del microbioma intestinal infantil. Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos. Pontificia Universidad Católica de Chile., (2016).  
[3] Ward, R. E., Ninonuevo, M., Mills, D. A., Leblita, C. B., & German, J. B. (2007). In vitro fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(11), 1398–1405.  
[4] Yu, Z. T., Chen, C., & Newburg, D. S. (2013). Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology*, 23(11), 1281–1292.

## ANEXO B : SEMINARIO PRESENTADO EN CONGRESO CAMBRIDGE

Poster presentado en el Congreso 6th Exploring Human Host-Microbiome Interactions in Health and Disease. Cambridge, September 2017.



### MODELING METABOLIC INTERACTIONS IN A SIMPLE CONSORTIUM OF THE INFANT GUT MICROBIOME

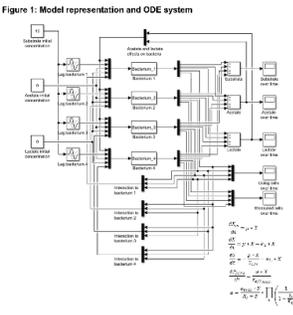
Francisco Pinto, Daniel A. Medina, Ricardo Pérez-Correa, **Daniel Garrido**<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos, Escuela Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile. dgarrido@ing.puc.cl



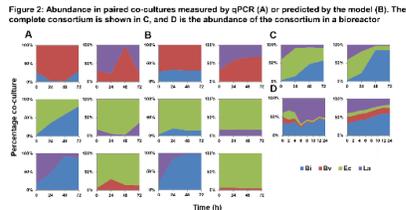
**Summary**

Microbial interactions in the gut microbiome are mediated by dietary substrates, especially complex polysaccharides. In this environment, breakdown products from larger carbohydrates and short chain fatty acids are commonly shared among gut microbes. Understanding the forces that guide microbiome development and composition is important to determine its role in health and in the application of the gut microbiome as a therapeutic tool. In this work we developed a mathematical model based on microbial growth equations incorporating metabolic sharing and inhibition. The model was based on experimental in vitro data from a simple bacterial consortium of four infant gut species, growing on fructooligosaccharides (FOS). In general, the model accurately predicted bacterial abundance in co-culture from mono-culture data. In addition, a good correlation was observed between the experimental data and predicted FOS consumption and acid production. In general, *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus* were dominant under those conditions. The model was further validated co-culturing the four-species in a bioreactor using FOS. Under these optimal conditions, the model was able to predict a predominance of the two aforementioned species, as well as substrate depletion and acetate and lactate concentrations. Finally, the model was tested for parameter identifiability and sensitivity. These results suggest that metabolic interactions greatly explain variations in microbial abundance and activities in the infant gut, and could be modeled using Monod equations including metabolic interactions. The model could be scaled to include data from larger consortia, or be applied to microbial communities where sharing metabolic resources is critical in shaping bacterial abundance. Moreover, the model could be useful in designing microbial consortia with desired properties such as higher acid production.

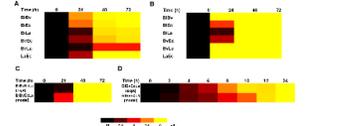
**Figure 1: Model representation and ODE system**



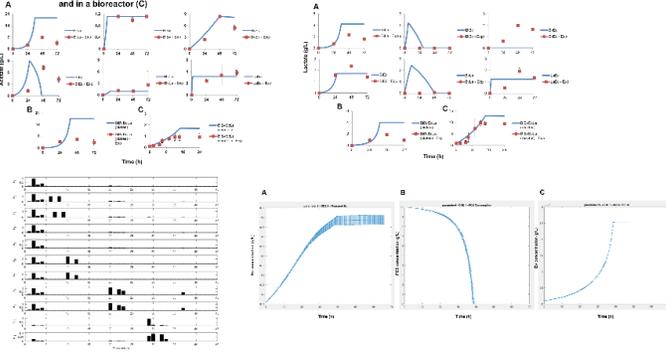
**Figure 2: Abundance in paired co-cultures measured by qPCR (A) or predicted by the model (B). The complete consortium is shown in C, and D is the abundance of the consortium in a bioreactor.**



**Figure 3: FOS consumption by the consortium (A), and estimated by the model (B). Experimental and predicted consumption in four-species consortium in microplates (C) and in a bioreactor (D).**



**Figure 4: Acetate and lactate experimental production by the consortium, and estimated by the model (A). Experimental and predicted consumption in four-species consortium in microplates (B) and in a bioreactor (C).**



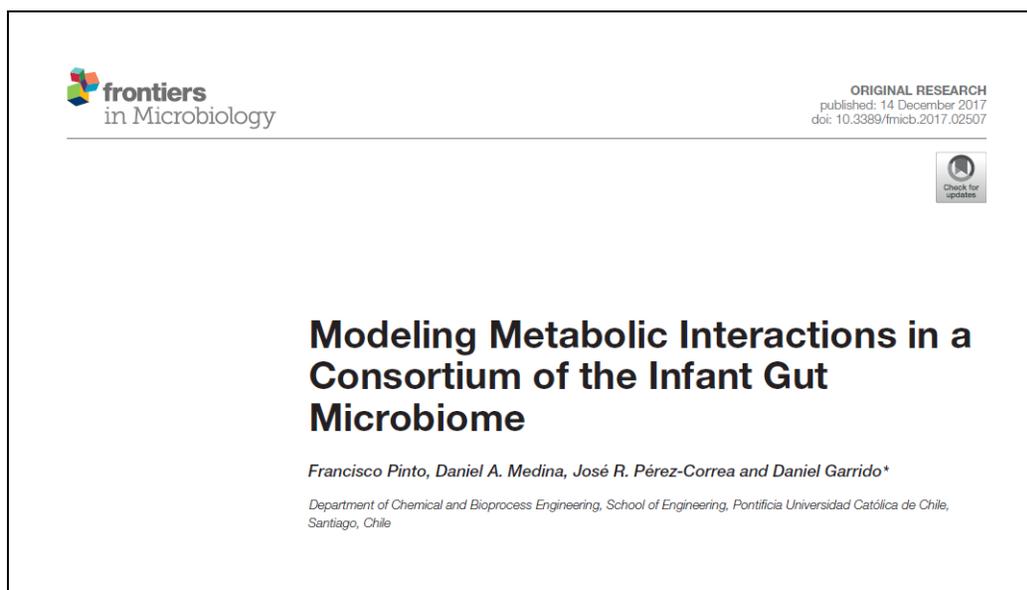
**Conclusions**

A four-species culture readily allowed good growth of all microbes under suitable in-vitro and in-vivo conditions. Metabolic interactions during growth of FOS are vital for the overall system in bioreactors and in the gut. The model was able to predict the same consumption pattern as observed in the bioreactor. The model was able to predict the same consumption pattern as observed in the bioreactor. The model was able to predict the same consumption pattern as observed in the bioreactor.

## ANEXO C : PUBLICACIÓN 1 – MODELING METABOLIC INTERACTIONS IN A CONSORTIUM OF THE INFANT GUT MICROBIOME

Publicación realizada para optar al grado de distinción máxima.

Estado actual: Publicación aceptada y publicada. doi: 10.3389/fmicb.2017.02507



**ANEXO D : PUBLICACIÓN – PREBIOTICS MEDIATE MICROBIAL  
INTERACTIONS IN A CONSORTIUM OF THE INFANT GUT  
MICROBIOME**

Publicación en colaboración.

Estado actual: Aceptada y publicada. doi: 10.3390/ijms18102095.



International Journal of  
*Molecular Sciences*



*Article*

## **Prebiotics Mediate Microbial Interactions in a Consortium of the Infant Gut Microbiome**

**Daniel A. Medina, Francisco Pinto, Aline Ovalle, Pamela Thomson and Daniel Garrido \* **

Department of Chemical and Bioprocess Engineering, School of Engineering, Pontificia Universidad Católica de Chile, Av. Vicuña Mackenna 4860, Santiago 7820436, Chile; [damedinas@uc.cl](mailto:damedinas@uc.cl) (D.A.M.); [mpinto@uc.cl](mailto:mpinto@uc.cl) (F.P.); [amovalle@uc.cl](mailto:amovalle@uc.cl) (A.O.); [ptm\\_thomson@hotmail.com](mailto:ptm_thomson@hotmail.com) (P.T.)

\* Correspondence: [dgarridoc@ing.puc.cl](mailto:dgarridoc@ing.puc.cl); Tel.: +56-22-354-1143

Received: 1 September 2017; Accepted: 2 October 2017; Published: 4 October 2017

## ANEXO E : CÓDIGO MATLAB® DE LAS ECUACIONES DEL MODELO GENERAL DE MONO-CULTIVO BACTERIANO

El código utilizado y programado en *Matlab*® para el crecimiento de una bacteria utilizado en el mono-cultivo.

```
function sys=monocult(t,x,k)
sys = zeros(5,1);

%x(1) Sustrato
%x(2) Acetato
%x(3) Lactato
%x(4) Bacteria viva
%x(5) Bacteria total

%Parámetros

%k(1) kd, tasa de muerte
%k(2) ks, Constante de saturación media
%k(3) mumax, tasa específica de crecimiento máxima
%k(4) Yxs, Rendimiento de de biomasa en sustrato
%k(5) Ia, Constante inhibición por acetato
%k(6) Il, Constante inhibición por lactato
%k(7) ms, tasa de mantención por sustrato
%k(8) Yax, Rendimiento de acetato en sustrato
%k(9) Ylx, Rendimiento de lactato en sustrato
%k(10) ksa, Constante de saturación media de acetato
%k(11) ksl, Constante de saturación media de lactato
%k(12) betamaxA, tasa de producción máxima de acetato
%k(13) betamaxL,tasa de producción máxima de lactato
%k(14) mumaxA, tasa específica de crecimiento con A de fuente de C
%k(15) mumaxL, tasa específica de crecimiento con L de fuente de C
%k(16) YxA, Rendimiento de biomasa en A como fuente de C
%k(17) YxL, Rendimiento de biomasa en L como fuente de C

%Ecuaciones constitutivas
mu = k(3)*x(1)/((k(2)+x(1))*(1+(x(2)/k(5)))*(1+(x(3)/k(6)))); %Crecimiento con S como
fuente de C, Acetato y Etanol como inhibidores
mua = k(14)*x(2)/((k(2)+x(2))*(1+(x(2)/k(5)))*(1+(x(3)/k(6)))); %Crecimiento con Acetato
como fuente de C
mul = k(15)*x(3)/((k(2)+x(3))*(1+(x(2)/k(5)))*(1+(x(3)/k(6)))); %Crecimiento con Lactato
como fuente de C
betaA = k(12)*x(1)/(k(10)+x(1)); %Producción de Acetato con S de sustrato
betaL = k(13)*x(1)/(k(11)+x(1)); %Producción de Lactato con S de sustrato

%Ecuaciones diferenciales
if x(1) > 0.000001
sys(1) = -mu*x(4)/k(4) - k(7)*x(4);
%consumo de bacteria 1
sys(2) = betaA*x(4)/k(8);
%acetato bacteria 1
sys(3) = betaL*x(4)/k(9);
%lactato bacteria 1
sys(4) = mu*x(4)-k(1)*x(4);
% bacteria 1 Viva
sys(5) = mu*x(4);
else
sys(1) = 0;
%consumo de bacteria 1
sys(2) = -mua*x(4)/k(16);
%acetato bacteria 1
sys(3) = -mul*x(4)/k(17);
%lactato bacteria 1
sys(4) = mul*x(4)+mua*x(4)-k(1)*x(4);
% bacteria 1 Viva
sys(5) = mul*x(4)+mua*x(4);
% bacteria 1 Medida
end
```

## ANEXO F : CÓDIGO MATLAB® DE LAS ECUACIONES DEL MODELO DE CO-CULTIVO BACTERIANO PAREADO

El código utilizado y programado en *Matlab*® para el crecimiento de dos bacterias utilizado en el co-cultivo pareado. A diferencia del anterior, la ecuación de crecimiento se modifica agregando un nuevo inhibidor o potenciador de crecimiento según su signo. Además, se muestran condiciones para que las ecuaciones diferenciales no se indeterminen durante la búsqueda de parámetros.

```
function sys=cocult(t,x,k)
sys = zeros(7,1);

%x(1) Sustrato
%x(2) Acetato
%x(3) Lactato
%x(4) Bacteria viva 1
%x(5) Bacteria total 1
%x(6) Bacteria viva 2
%x(7) Bacteria total 2

%Parámetros

%k(1)_1 kd, tasa de muerte
%k(2)_1 ks, Constante de saturación media
%k(3)_1 mumax, tasa específica de crecimiento máxima
%k(4)_1 Yxs, Rendimiento de de biomasa en sustrato
%k(5)_1 Ia, Constante inhibición por acetato
%k(6)_1 Il, Constante inhibición por lactato
%k(7)_1 ms, tasa de mantención por sustrato
%k(8)_1 Yax, Rendimiento de acetato en sustrato
%k(9)_1 Ylx, Rendimiento de lactato en sustrato
%k(10)_1ksa, Constante de saturación media de acetato
%k(11)_1ksl, Constante de saturación media de lactato
%k(12)_1betamaxA, tasa de producción máxima de acetato
%k(13)_1betamaxL,tasa de producción máxima de lactato
%k(14)_1mumaxA, tasa específica de crecimiento con A de fuente de C
%k(15)_1mumaxL, tasa específica de crecimiento con L de fuente de C
%k(16)_1YxA, Rendimiento de biomasa en A como fuente de C
%k(17)_1YxL, Rendimiento de biomasa en L como fuente de C

%k(18)_2 kd, tasa de muerte
%k(19)_2 ks, Constante de saturación media
%k(20)_2 mumax, tasa específica de crecimiento máxima
%k(21)_2 Yxs, Rendimiento de de biomasa en sustrato
%k(22)_2 Ia, Constante inhibición por acetato
%k(23)_2 Il, Constante inhibición por lactato
%k(24)_2 ms, tasa de mantención por sustrato
%k(25)_2Yax, Rendimiento de acetato en sustrato
%k(26)_2Ylx, Rendimiento de lactato en sustrato
%k(27)_2ksa, Constante de saturación media de acetato
%k(28)_2ksl, Constante de saturación media de lactato
%k(29)_2betamaxA, tasa de producción máxima de acetato
%k(30)_2betamaxL,tasa de producción máxima de lactato
%k(31)_2mumaxA, tasa específica de crecimiento con A de fuente de C
%k(32)_2mumaxL, tasa específica de crecimiento con L de fuente de C
%k(33)_2YxA, Rendimiento de biomasa en A como fuente de C
%k(34)_2YxL, Rendimiento de biomasa en L como fuente de C

%k(35) efecto de la bacteria 1 en 2
%k(36) efecto de la bacteria 2 en 1

% Relaciones para que no se produzcan NaN en la iteración (problemas con el SSM)
% si el efecto de la otra bacteria supera las 100 veces,se queda en 100 veces como máximo

if ((x(6)/k(36)) <= -0.99)
    u = -0.99;
else
    u = x(6)/k(36);
```

```

end

if ((x(4)/k(35)) <= -0.99)
    v = -0.99;
else
    v = x(4)/k(35);
end

%Ecuaciones constitutivas

mul      = k(3)*x(1)/((k(2)+x(1))*(1+(x(2)/k(5))))*(1+(x(3)/k(6)))*(1+u); %Crecimiento con S
como fuente de C, Acetato y Etanol como inhibidores
mua1     = k(14)*x(2)/((k(2)+x(2))*(1+(x(2)/k(5))))*(1+(x(3)/k(6)))*(1+u); %Crecimiento con
Acetato como fuente de C
mul1     = k(15)*x(3)/((k(2)+x(3))*(1+(x(2)/k(5))))*(1+(x(3)/k(6)))*(1+u); %Crecimiento con
Lactato como fuente de C
betaA1   = k(12)*x(1)/(k(10)+x(1)); %Producción de Acetato con S de sustrato
betaL1   = k(13)*x(1)/(k(11)+x(1)); %Producción de Lactato con S de sustrato

mu2      = k(20)*x(1)/((k(19)+x(1))*(1+(x(2)/k(22))))*(1+(x(3)/k(23)))*(1+v); %Crecimiento con
S como fuente de C, Acetato y Etanol como inhibidores
mua2     = k(31)*x(2)/((k(19)+x(2))*(1+(x(2)/k(22))))*(1+(x(3)/k(23)))*(1+v); %Crecimiento con
Acetato como fuente de C
mul2     = k(32)*x(3)/((k(19)+x(3))*(1+(x(2)/k(22))))*(1+(x(3)/k(23)))*(1+v); %Crecimiento con
Lactato como fuente de C
betaA2   = k(29)*x(1)/(k(27)+x(1)); %Producción de Acetato con S de sustrato
betaL2   = k(30)*x(1)/(k(28)+x(1)); %Producción de Lactato con S de sustrato

%Ecuaciones diferenciales

if x(1) > 0.000001

sys(1) = -mul*x(4)/k(4) -mu2*x(6)/k(21) - k(7)*x(4)-k(24)*x(6);
        %consumo de bacterias
sys(2) = betaA1*x(4)/k(8) + betaA2*x(6)/k(25);
        %acetato bacterias
sys(3) = betaL1*x(4)/k(9) + betaL2*x(6)/k(26);
        %lactato bacterias
sys(4) = mul*x(4)-k(1)*x(4); %+k(35)*x(6);
        % bacteria 1 Viva
sys(5) = mul*x(4);
        % bacteria 1 Medida
sys(6) = mu2*x(6)-k(18)*x(6); %+k(36)*x(4);
        % bacteria 2 Viva
sys(7) = mu2*x(6);
        % bacteria 2 Medida
else
sys(1) = 0;
        %consumo de bacterias
sys(2) = -mua1*x(4)/k(16) -mua2*x(6)/k(33);
        %acetato bacterias
sys(3) = -mul1*x(4)/k(17) -mul2*x(6)/k(34);
        %lactato bacterias
sys(4) = mul1*x(4) + mua1*x(4) - k(1)*x(4);
        % bacteria 1 Viva
sys(5) = mul1*x(4)+mua1*x(4);
        % bacteria 1 Medida
sys(6) = mul2*x(6) + mua2*x(6) - k(18)*x(6);
        % bacteria 2 Viva
sys(7) = mul2*x(6)+mua2*x(6);
        % bacteria 2 Medida
end

```

## ANEXO G : CÓDIGO MATLAB® DE LAS ECUACIONES DEL MODELO DE CONSENSO BACTERIANO – 4 BACTERIAS

El código utilizado y programado en *Matlab*® para el crecimiento de 4 bacterias utilizado en el consorcio bacteriano. A diferencia de los anteriores, la ecuación de crecimiento de cada bacteria se modifica agregando todas las demás como inhibidores o potenciadores crecimiento según su signo. Además, se muestran condiciones para que las ecuaciones diferenciales no se indeterminen durante la búsqueda de parámetros.

```
function sys=consenso(t,x,k)
sys = zeros(11,1);

%x(1) Sustrato
%x(2) Acetato
%x(3) Lactato
%x(4) Bacteria viva 1 - Bi
%x(5) Bacteria total 1 - Bi
%x(6) Bacteria viva 2 - Bv
%x(7) Bacteria total 2 - Bv
%x(8) Bacteria viva 3 - Ec
%x(9) Bacteria total 3 - Ec
%x(10) Bacteria viva 4 - La
%x(11) Bacteria total 4 - La

%Parámetros

%k(1)_1 kd, tasa de muerte
%k(2)_1 ks, Constante de saturación media
%k(3)_1 mumax, tasa específica de crecimiento máxima
%k(4)_1 Yxs, Rendimiento de de biomasa en sustrato
%k(5)_1 Ia, Constante inhibición por acetato
%k(6)_1 Il, Constante inhibición por lactato
%k(7)_1 ms, tasa de mantención por sustrato
%k(8)_1 Yax, Rendimiento de acetato en sustrato
%k(9)_1 Ylx, Rendimiento de lactato en sustrato
%k(10)_1 ksa, Constante de saturación media de acetato
%k(11)_1 ksl, Constante de saturación media de lactato
%k(12)_1 betamaxA, tasa de producción máxima de acetato
%k(13)_1 betamaxL,tasa de producción máxima de lactato
%k(14)_1 mumaxA, tasa específica de crecimiento con A de fuente de C
%k(15)_1 mumaxL, tasa específica de crecimiento con L de fuente de C
%k(16)_1 YxA, Rendimiento de biomasa en A como fuente de C
%k(17)_1 YxL, Rendimiento de biomasa en L como fuente de C

%k(18)_2 kd, tasa de muerte
%k(19)_2 ks, Constante de saturación media
%k(20)_2 mumax, tasa específica de crecimiento máxima
%k(21)_2 Yxs, Rendimiento de de biomasa en sustrato
%k(22)_2 Ia, Constante inhibición por acetato
%k(23)_2 Il, Constante inhibición por lactato
%k(24)_2 ms, tasa de mantención por sustrato
%k(25)_2 Yax, Rendimiento de acetato en sustrato
%k(26)_2 Ylx, Rendimiento de lactato en sustrato
%k(27)_2 ksa, Constante de saturación media de acetato
%k(28)_2 ksl, Constante de saturación media de lactato
%k(29)_2 betamaxA, tasa de producción máxima de acetato
%k(30)_2 betamaxL,tasa de producción máxima de lactato
%k(31)_2 mumaxA, tasa específica de crecimiento con A de fuente de C
%k(32)_2 mumaxL, tasa específica de crecimiento con L de fuente de C
%k(33)_2 YxA, Rendimiento de biomasa en A como fuente de C
%k(34)_2 YxL, Rendimiento de biomasa en L como fuente de C

%k(35)_3 kd, tasa de muerte
%k(36)_3 ks, Constante de saturación media
%k(37)_3 mumax, tasa específica de crecimiento máxima
```

```

%k(38)_3 Yxs, Rendimiento de de biomasa en sustrato
%k(39)_3 Ia, Constante inhibición por acetato
%k(40)_3 Il, Constante inhibición por lactato
%k(41)_3 ms, tasa de mantención por sustrato
%k(42)_3 Yax, Rendimiento de acetato en sustrato
%k(43)_3 Ylx, Rendimiento de lactato en sustrato
%k(44)_3 ksa, Constante de saturación media de acetato
%k(45)_3 ksl, Constante de saturación media de lactato
%k(46)_3 betamaxA, tasa de producción máxima de acetato
%k(47)_3 betamaxL, tasa de producción máxima de lactato
%k(48)_3 mumaxA, tasa específica de crecimiento con A de fuente de C
%k(49)_3 mumaxL, tasa específica de crecimiento con L de fuente de C
%k(50)_3 YxA, Rendimiento de biomasa en A como fuente de C
%k(51)_3 YxL, Rendimiento de biomasa en L como fuente de C

%k(52)_4 kd, tasa de muerte
%k(53)_4 ks, Constante de saturación media
%k(54)_4 mumax, tasa específica de crecimiento máxima
%k(55)_4 Yxs, Rendimiento de de biomasa en sustrato
%k(56)_4 Ia, Constante inhibición por acetato
%k(57)_4 Il, Constante inhibición por lactato
%k(58)_4 ms, tasa de mantención por sustrato
%k(59)_4 Yax, Rendimiento de acetato en sustrato
%k(60)_4 Ylx, Rendimiento de lactato en sustrato
%k(61)_4 ksa, Constante de saturación media de acetato
%k(62)_4 ksl, Constante de saturación media de lactato
%k(63)_4 betamaxA, tasa de producción máxima de acetato
%k(64)_4 betamaxL, tasa de producción máxima de lactato
%k(65)_4 mumaxA, tasa específica de crecimiento con A de fuente de C
%k(66)_4 mumaxL, tasa específica de crecimiento con L de fuente de C
%k(67)_4 YxA, Rendimiento de biomasa en A como fuente de C
%k(68)_4 YxL, Rendimiento de biomasa en L como fuente de C

%k(69) Efecto b1 en b2
%k(70) Efecto b1 en b3
%k(71) Efecto b1 en b4
%k(72) Efecto b2 en b1
%k(73) Efecto b2 en b3
%k(74) Efecto b2 en b4
%k(75) Efecto b3 en b1
%k(76) Efecto b3 en b2
%k(77) Efecto b3 en b4
%k(78) Efecto b4 en b1
%k(79) Efecto b4 en b2
%k(80) Efecto b4 en b3

%%Ecuaciones constitutivas

mu1 =
k(3)*x(1)/((k(2)+x(1))*(1+(x(1)/k(5)))*(1+(x(1)/k(6)))*(1+(x(6)/k(72)))*(1+(x(8)/k(75)))*(1+(x(10)/k(78)))); %Crecimiento con S como fuente de C, Acetato y Etanol como inhibidores
mual =
k(14)*x(2)/((k(2)+x(2))*(1+(x(2)/k(5)))*(1+(x(2)/k(6)))*(1+(x(6)/k(72)))*(1+(x(8)/k(75)))*(1+(x(10)/k(78)))); %Crecimiento con Acetato como fuente de C
mull =
k(15)*x(3)/((k(2)+x(3))*(1+(x(3)/k(5)))*(1+(x(3)/k(6)))*(1+(x(6)/k(72)))*(1+(x(8)/k(75)))*(1+(x(10)/k(78)))); %Crecimiento con Lactato como fuente de C
betaA1 = k(12)*x(1)/(k(10)+x(1)); %Producción de Acetato con S de sustrato
betaL1 = k(13)*x(1)/(k(11)+x(1)); %Producción de Lactato con S de sustrato

mu2 =
k(20)*x(1)/((k(19)+x(1))*(1+(x(1)/k(22)))*(1+(x(1)/k(23)))*(1+(x(4)/k(69)))*(1+(x(8)/k(76)))*(1+(x(10)/k(79)))); %Crecimiento con S como fuente de C, Acetato y Etanol como inhibidores
mua2 =
k(31)*x(2)/((k(19)+x(2))*(1+(x(2)/k(22)))*(1+(x(2)/k(23)))*(1+(x(4)/k(69)))*(1+(x(8)/k(76)))*(1+(x(10)/k(79)))); %Crecimiento con Acetato como fuente de C
mul2 =
k(32)*x(3)/((k(19)+x(3))*(1+(x(3)/k(22)))*(1+(x(3)/k(23)))*(1+(x(4)/k(69)))*(1+(x(8)/k(76)))*(1+(x(10)/k(79)))); %Crecimiento con Lactato como fuente de C
betaA2 = k(29)*x(1)/(k(27)+x(1)); %Producción de Acetato con S de sustrato
betaL2 = k(30)*x(1)/(k(28)+x(1)); %Producción de Lactato con S de sustrato

mu3 =
k(37)*x(1)/((k(36)+x(1))*(1+(x(1)/k(39)))*(1+(x(1)/k(40)))*(1+(x(4)/k(70)))*(1+(x(6)/k(73)))*(1+(x(10)/k(80)))); %Crecimiento con S como fuente de C, Acetato y Etanol como inhibidores
mua3 =
k(48)*x(2)/((k(36)+x(2))*(1+(x(2)/k(39)))*(1+(x(2)/k(40)))*(1+(x(4)/k(70)))*(1+(x(6)/k(73)))*(1+(x(10)/k(80)))); %Crecimiento con Acetato como fuente de C
mul3 =

```

```

k(49)*x(3)/((k(36)+x(3))*(1+(x(3)/k(39)))*(1+(x(3)/k(40)))*(1+(x(4)/k(70)))*(1+(x(6)/k(73)))*(1+(x(10)/k(80)))); %Crecimiento con Lactato como fuente de C
betaA3 = k(46)*x(1)/(k(44)+x(1)); %Producción de Acetato con S de sustrato
betaL3 = k(47)*x(1)/(k(45)+x(1)); %Producción de Lactato con S de sustrato

mu4 =
k(54)*x(1)/((k(53)+x(1))*(1+(x(1)/k(56)))*(1+(x(1)/k(57)))*(1+(x(4)/k(71)))*(1+(x(6)/k(74)))*(1+(x(8)/k(77)))); %Crecimiento con S como fuente de C, Acetato y Etanol como inhibidores
mua4 =
k(65)*x(2)/((k(53)+x(2))*(1+(x(2)/k(56)))*(1+(x(2)/k(57)))*(1+(x(4)/k(71)))*(1+(x(6)/k(74)))*(1+(x(8)/k(77)))); %Crecimiento con Acetato como fuente de C
mul4 =
k(66)*x(3)/((k(53)+x(3))*(1+(x(3)/k(56)))*(1+(x(3)/k(57)))*(1+(x(4)/k(71)))*(1+(x(6)/k(74)))*(1+(x(8)/k(77)))); %Crecimiento con Lactato como fuente de C
betaA4 = k(63)*x(1)/(k(61)+x(1)); %Producción de Acetato con S de sustrato
betaL4 = k(64)*x(1)/(k(62)+x(1)); %Producción de Lactato con S de sustrato

%Ecuaciones diferenciales

if x(1) > 0.00001

sys(1) = -mul*x(4)/k(4) -mu2*x(6)/k(21) -mu3*x(8)/k(38) -mu4*x(10)/k(55) - k(7)*x(4) -k(24)*x(6) -
k(41)*x(8) -k(58)*x(10);
%consumo de bacterias
sys(2) = betaA1*x(4)/k(8) + betaA2*x(6)/k(25) + betaA3*x(8)/k(42) + betaA4*x(10)/k(59);
%acetato bacterias
sys(3) = betaL1*x(4)/k(9) + betaL2*x(6)/k(26) + betaL3*x(8)/k(43) + betaL4*x(10)/k(60);
%lactato bacterias
sys(4) = mul*x(4) -k(1)*x(4); %+k(35)*x(6);
% bacteria 1 Viva
sys(5) = mul*x(4);
% bacteria 1 Medida
sys(6) = mu2*x(6) -k(18)*x(6); %+k(36)*x(4);
% bacteria 2 Viva
sys(7) = mu2*x(6);
% bacteria 2 Medida
sys(8) = mu3*x(8) -k(35)*x(8); %+k(35)*x(6);
% bacteria 3 Viva
sys(9) = mu3*x(8);
% bacteria 3 Medida
sys(10) = mu4*x(10) -k(52)*x(10); %+k(36)*x(4);
% bacteria 4 Viva
sys(11) = mu4*x(10);
% bacteria 4 Medida

else
sys(1) = 0;
%consumo de bacterias
sys(2) = -mua1*x(4)/k(16) -mua2*x(6)/k(33) -mua3*x(8)/k(50) -mua4*x(10)/k(67);
%acetato bacterias
sys(3) = -mul1*x(4)/k(17) -mul2*x(6)/k(34) -mul3*x(8)/k(51) -mul4*x(10)/k(68);
%lactato bacterias
sys(4) = mul1*x(4) + mua1*x(4) - k(1)*x(4);
% bacteria 1 Viva
sys(5) = mul1*x(4) + mua1*x(4);
% bacteria 1 Medida
sys(6) = mul2*x(6) + mua2*x(6) - k(18)*x(6);
% bacteria 2 Viva
sys(7) = mul2*x(6) + mua2*x(6);
% bacteria 2 Medida
sys(8) = mul3*x(8) + mua3*x(8) - k(35)*x(8);
% bacteria 1 Viva
sys(9) = mul3*x(8) + mua3*x(8);
% bacteria 1 Medida
sys(10) = mul4*x(10) + mua4*x(10) - k(52)*x(10);
% bacteria 2 Viva
sys(11) = mul4*x(10) + mua4*x(10);
% bacteria 2 Medida

```

## ANEXO H : CÓDIGO MATLAB® DE LA BÚSQUEDA DE PARÁMETROS UTILIZANDO EL PAQUETE SSMGO PARA MONOCULTIVO

El código utilizado y programado en *Matlab*® para la búsqueda de parámetros en el modelo de monocultivo bacteriano. Se definieron las condiciones de *lower* y *upper bounds* para encontrar cada uno de los 17 parámetros de cada bacteria.

```
function [J,g,R]=optmonocult(x,texp,yexp)

toleranc = odeset('RelTol',1e-6,'AbsTol',1e-6);
%tspan = texp;
InitCond = [10 0 0 0.09 0.09]; %[$_0 | A_0 | L_0 | X_0 | X_m0]
[tout,yout] = ode23s(@monocult,texp,InitCond,toleranc,x);

%matriz de importancia...costos. Se cambian pesos de las columnas si se quiere una aproximación
más
%cercana a una ecuación diferencial en particular
R = ([yout(:,1:3),yout(:,5)]-yexp)/max(yexp,2);
%R(:,1) = R(:,1)*5;
%R(:,2) = R(:,2)*2;
%R(:,3) = R(:,3)*1;
%R(:,4) = R(:,4)*1;

%error...un escalar, no un vector
J = sum(sum(R.^2));
R = reshape(R,numel(R),1);
g = 0;
end

clear mex;
clear all;
close all;
clc;

%===== PROBLEM SPECIFICATIONS =====

problem.f='optmonocult';
% k(1)..k(17)
problem.x_U=[100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100];
problem.x_L=[0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001 0.000001];
problem.x_0 = (problem.x_U-problem.x_L).*rand(1,17)+problem.x_L ;

x0 = problem.x_0
opts.maxeval=20000;
opts.maxtime=2000;
opts.local.nl = 20000;
opts.local.tol=2;
%opts.local.solver='fmincon';
%opts.local.solver='fminsearch';
%opts.local.solver='solnp';
opts.local.finish='fminsearch';
opts.local.solver='fminsearch';

%===== DATA =====

[Datos] = xlsread('bact.xlsx');
texp = Datos(:,1);
yexp = Datos(:,2:8);

%===== OPTIMIZATION =====
Results=ssm_kernel(problem,opts,texp,yexp);
%Results=ess_kernel(problem,opts,texp,yexp);

%===== Results =====
x = Results.xbest;
tspan = 1:0.1:80;
```

```

InitCond = [10 0 0 3.33397E-05 3.33397E-05];%[S_0 | A_0 | L_0 | X_0 | X_m0]
[tout,yout]= ode113(@la,tspan,InitCond,[],x);

figure

hold on

yyaxis left

plot(tout,yout(:,1),'Color',[0 0 0.4],'DisplayName','FOS - modelo','LineWidth',2);
plot(texp,yexp(:,1),'d','Color',[0 0 0.4],'LineWidth',1,'MarkerSize',6,'DisplayName','FOS -
exp');
plot(tout,yout(:,3),'Color',[0 0.8 0.6],'DisplayName','Lactato - modelo','LineWidth',2);
errorbar(texp,yexp(:,3),yexp(:,6),'d','Color',[0 0.8 0.6],'MarkerSize',6,'DisplayName','Lactato
- exp');

xlabel('Time (h)','fontSize',24); ylabel('Concentración (g/L)','fontSize',24);

axis([0 80 0 12]);

yyaxis right

plot(tout,yout(:,5),'Color',[1 0 0],'DisplayName','\it bacteria - modelo','LineWidth',2);
errorbar(texp,yexp(:,4),yexp(:,7),'d','Color',[1 0 0],'MarkerSize',6,'DisplayName','\it bacteria
- exp');
ylabel('Concentración (g/L)','fontSize',24);
axis([0 80 0 .8]);

hold off

legend('show')

yexpa = yexp(:,1:4);
yexpb = [[1;1;1;1],yexp(:,5:7)];

[tout,yout3]= ode113(@bact,texp,InitCond,[],x);
R = ([yout3(:,1:3),yout3(:,5)]-yexpa)./yexpb;
%R(:,1) = R(:,1)*5;
%R(:,2) = R(:,2)*5;
%R(:,3) = R(:,3)*5;
%R(:,4) = R(:,4)*5;
J Egea = sum(sum(R.^2))

```

## ANEXO I : CÓDIGO MATLAB® DE LA BÚSQUEDA DE PARÁMETROS UTILIZANDO EL PAQUETE SSMGO PARA CO-CULTIVO PAREADO

El código utilizado y programado en *Matlab*® para la búsqueda de parámetros en los modelos de co-cultivos bacterianos pareados. Se definieron las condiciones de *lower* y *upper bounds* para encontrar cada uno de los 34 parámetros de las bacterias más los dos parámetros de interacción. Esta rutina era utilizada para cada uno de las 4 opciones en las que los parámetros de interacción pudiesen estar.

```
function [J,g,R]=optcocult(x,texp,yexp)

toleranc = odeset('RelTol',1e-6,'AbsTol',1e-6);
tspan = texp;
InitCond = [10 0 0 0.022910321 0.022910321 0.061205935 0.061205935]; % [S_0
| A_0 | L_0 | X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] BiBv
%InitCond = [10 0 0 0.031125711 0.031125711 0.703040132 0.703040132]; % [S_0 | A_0 | L_0
| X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] BiEc
%InitCond = [10 0 0 0.016361585 0.016361585 0.074042949 0.074042949]; % [S_0 | A_0 | L_0
| X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] BiLa
%InitCond = [10 0 0 0.045321803 0.045321803 0.684907455 0.684907455]; % [S_0 | A_0 | L_0
| X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] BvEc
%InitCond = [10 0 0 0.026151931 0.026151931 0.059057874 0.059057874]; % [S_0 | A_0 | L_0
| X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] BvLa
%InitCond = [10 0 0 0.140645242 0.140645242 0.671280331 0.671280331]; % [S_0 | A_0 | L_0
| X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] EcLa

[tout,yout]= ode15s(@cocult,tspan,InitCond,toleranc,x);

yexpa = yexp(:,1:5);
yexpb = [[1;1;1;1],yexp(:,6:9)];

%Elimina parámetros que no permite integración de las ecuaciones diferenciales
if length(yout(:,1)) < length(yexp(:,1))
    yout = zeros(4,7);
end
%matriz de importancia...costos. Se cambian pesos de las columnas si se quiere una aproximación
más
%cercana a una ecuación diferencial en particular
R = ([yout(:,1:3),yout(:,5),yout(:,7)]-yexpa)./yexpb;
%R(:,1) = R(:,1)*2; %FOS
%R(:,2) = R(:,2)*4; %Acetato
%R(:,3) = R(:,3)*1; %Lactato
%R(:,4) = R(:,4)*2; %B1
%R(:,5) = R(:,5)*5; %B2

%error...un escalar, no un vector
J = sum(sum(R.^2));
R = reshape(R,numel(R),1);
g = 0; %restricciones
end

clear mex;
clear all;
close all;
%warning off;
clc;
[parametros] = xlsread('kcocult');

%===== PROBLEM SPECIFICATIONS =====
problem.f='optcocult';
```

```

% k(1)..k(36)

%para definir el upper y lower bound, se hacen 4 iteraciones:
%1.- ambos negativos
%2.- ambos positivos
%3.- 1° positivo y 2° negativo
%4.- 1° negativo y 2° positivo
%Negativo significa de -100 a -0.000001
%Positivo significa de 0.000001 a 100
%Finalmente se elige la que tiene menor R^2 c:
problem.x_L= [parametros(:,3)',-100,0.000001];
problem.x_U= [parametros(:,2)',-0.000001,100];
%Esto lo único que hace es pararse en un punto aleatorio de lo definido en
%el upper y lower bound...Cuando termine el SSM, favor de anotar el punto
%inicial de la iteración :)
problem.x_0= (problem.x_U-problem.x_L).*rand(1,36)+problem.x_L ;
x0 = problem.x_0

%opts.local.solver='fmincon';
opts.local.solver='fminsearch';
%opts.local.solver='solnp';

opts.maxeval=20000;
opts.maxtime=2000;
opts.local.n1 = 20000;
opts.local.tol=2;
opts.local.finish='fminsearch';
%opts.local.finish='solnp';
%===== DATA =====

[Datos] = xlsread('cocult.xlsx');

texp = Datos(:,1);
yexp = Datos(:,2:10);
yexpa = yexp(:,1:5);
yexpb = yexp(:,6:9);

%===== OPTIMIZATION =====
Results=ssm_kernel(problem,opts,texp,yexp);
%Results=ess_kernel(problem,opts,texp,yexp);

%===== Results =====
x = Results.xbest;
tspan = 0:0.1:80;
InitCond = [10 0 0 0.022910321 0.022910321 0.061205935 0.061205935]; % [S_0
| A_0 | L_0 | X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] BiBv
%InitCond = [10 0 0 0.031125711 0.031125711 0.703040132 0.703040132]; % [S_0 | A_0 | L_0
| X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] BiEc
%InitCond = [10 0 0 0.016361585 0.016361585 0.074042949 0.074042949]; % [S_0 | A_0 | L_0
| X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] BiLa
%InitCond = [10 0 0 0.045321803 0.045321803 0.684907455 0.684907455]; % [S_0 | A_0 | L_0
| X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] BvEc
%InitCond = [10 0 0 0.026151931 0.026151931 0.059057874 0.059057874]; % [S_0 | A_0 | L_0
| X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] BvLa
%InitCond = [10 0 0 0.140645242 0.140645242 0.671280331 0.671280331]; % [S_0 | A_0 | L_0
| X1_0 | X1_m0 | X2_0 | X2_m0] EcLa

[tout,yout]= odel5s(@bibv,tspan,InitCond,[],x);

figure

hold on

yyaxis left
plot(tout,yout(:,5),'Color',[1 0 0],'DisplayName','\it Bacteria 1 - modelo','LineWidth',2);
errorbar(texp,yexpa(:,4),yexpb(:,3),'d','Color',[1 0 0],'MarkerSize',6,'DisplayName','\it
Bacteria 1 - exp');
plot(tout,yout(:,7),'Color',[0 0.6 0],'DisplayName','\it Bacteria2 - modelo','LineWidth',2);
errorbar(texp,yexpa(:,5),yexpb(:,4),'d','Color',[0 0.6 0],'MarkerSize',6,'DisplayName','\it
Bacteria 2 - exp');
plot(tout,yout(:,1),'Color',[0 0 0.4],'DisplayName','FOS - modelo','LineWidth',2);
plot(texp,yexpa(:,1),'d','Color',[0 0 0.4],'LineWidth',1,'MarkerSize',6,'DisplayName','FOS -
exp');
xlabel('Time (h)','fontsize',24); ylabel('Concentración bacterias y FOS (g/L)','fontsize',24);
axis([0 80 0 10.5]);

yyaxis right
plot(tout,yout(:,3),'Color',[1 0.8 0.6],'DisplayName','Lactato - modelo','LineWidth',2);

```

```

plot(texp,yexpa(:,3),'d','Color',[1 0.8 0.6],'MarkerSize',6,'DisplayName','Lactato - exp');
plot(tout,yout(:,2),'Color',[0 0.8 0.6],'DisplayName','Acetato - modelo','LineWidth',2);
errorbar(texp,yexpa(:,2),yexpb(:,1),'d','Color',[0 0.8
0.6],'MarkerSize',6,'DisplayName','Acetato - exp');
ylabel('Concentración SCFA (g/L)','fontsize',24);
axis([0 80 0 10]);

hold off

legend('show')

yexpa = yexp(:,1:5);
yexpb = yexp(:,6:9);
yexpb = [[1;1;1;1],yexpb];

[tout,yout3]= ode113(@cocult,texp,InitCond,[],x);
R = ([yout3(:,1:3),yout3(:,5),yout3(:,7)]-yexpa)./yexpb;
%R(:,1) = R(:,1)*5;
%R(:,2) = R(:,2)*5;

%R(:,3) = R(:,3)*5;
%R(:,4) = R(:,4)*5;
J Egea = sum(sum(R.^2))

```