

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



Interacción de *Pseudomonas aeruginosa* y la toxina killer producida por *Saccharomyces cerevisiae*.

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciada en Microbiología

Presenta:

Jennifer Andrea Uribe López

Dirigido por:

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Presidente

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Secretario

Dra. Verónica Morales Tlalpan

Asesora

Dr. Juan Campos Guillén

Asesor

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez

Asesora

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Agosto del 2023

México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Interacción de *Pseudomonas aeruginosa* y la toxina
killer producida por *Saccharomyces cerevisiae*.

por

Jennifer Andrea Uribe López

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNLIC-272750

Índice

Dedicatorias	11
Agradecimientos	12
Resumen	13
Summary	15
1. Introducción	17
2. Antecedentes	19
2.1 Generalidad de <i>P. aeruginosa</i>	19
2.2 La piocianina producida por <i>P. aeruginosa</i>	20
2.3 Generalidades de <i>S. cerevisiae</i> y la toxina <i>Killer</i>	21
2.4 Competencia entre <i>P. aeruginosa</i> y las levaduras	22
3. Justificación	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	24
6. Metodología	25
6.1 Condiciones de cultivo	25
6.2 Ensayos de inhibición en placa	27
6.3 Evaluación cualitativa del efecto de pH en caja	30
6.4 Ensayos de inhibición en medio líquido	31
6.5 Evaluación cualitativa del efecto de pH que puede generar <i>S. cerevisiae</i> sensible en medio líquido	34
7. Resultados	35
7.1.1 Ensayos de inhibición en placa	35
7.1.1 Ensayos de inhibición utilizando la cepa 1122 de <i>P. aeruginosa</i>	36

7.1.2 Ensayos de inhibición utilizando la cepa 757 de <i>P. aeruginosa</i>	38
7.2 Análisis microscópicos	41
7.2.1 Respuesta de <i>S. cerevisiae</i> sensible ante el estrés generado por <i>P. aeruginosa</i> 1122	42
7.2.2 Respuesta de <i>P. aeruginosa</i> 1122 ante el estrés generado por <i>S. cerevisiae</i> Killer y <i>S. cerevisiae</i> sensible	43
7.2.3 Respuesta de <i>S. cerevisiae</i> Killer ante el estrés generado por <i>P. aeruginosa</i> 1122	45
7.3 Evaluación cualitativa del efecto de pH en caja.....	48
7.4 Ensayos de inhibición en medio de cultivo líquido	50
7.4.1 Toxina K1 (Producida por <i>S. cerevisiae</i> Killer) puede afectar el crecimiento de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> 1122	51
7.4.2 Toxina K1 (Producida por <i>S. cerevisiae</i> Killer) puede afectar el crecimiento de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> 757	55
7.4.3 Toxina TP 1122 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 1122) puede afectar el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> Killer	59
7.4.4 Toxina TP 757 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 757) puede afectar el crecimiento de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> Killer	63
7.4.5 Toxina TP 1122 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 1122) puede afectar el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sensible	65
7.4.6 Toxina TP 757 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 757) puede afectar el crecimiento de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> sensible	69
7.5 Evaluación cualitativa del efecto de pH que puede generar <i>S. cerevisiae</i> sensible en medio de cultivo líquido	72
8. Discusión	73

9. Conclusión	81
10. Perspectivas	82
11. Referencias	84
12. Apéndices	88
S1 Estandarización de cuantos mg de <i>P. aeruginosa</i> se utilizaron como césped	88
S2 Valores obtenidos en las pruebas estadísticas <i>Anova</i> y prueba de Tukey de los experimentos de ensayos de inhibición en placa, utilizando <i>P. aeruginosa</i> 1122.....	88
S3 Valores obtenidos en las pruebas estadísticas <i>Anova</i> y prueba de Tukey de los experimentos de ensayos de inhibición en, utilizando <i>P. aeruginosa</i> 757	90
S4 Gráficas de regresión lineal del efecto que tiene <i>K1</i> sobre el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> 1122 en medio de cultivo YPD líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm)	93
S5 Gráficas de regresión lineal del efecto que tiene <i>K1</i> sobre el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> 1122 en medio de cultivo King A líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm)	94
S6 Gráficas de regresión lineal del efecto que el crecimiento celular de <i>S. cerevisiae</i> <i>Killer</i> en medio de cultivo YPD líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm)	95
S7 Gráficas de regresión lineal del efecto que el crecimiento celular de <i>S. cerevisiae</i> <i>Killer</i> en medio de cultivo King A líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm)	96
S8 Gráficas de regresión lineal del efecto que tiene TP 1122 sobre el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sensible en medio de cultivo YPD líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm)	97
S9 Gráficas de regresión lineal del efecto que tiene TP 1122 sobre el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sensible en medio de cultivo King A líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm)	98

S10 Gráficas de regresión lineal del efecto que tiene TP 757 sobre el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sensible en medio de cultivo YPD líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm)	99
S11 Única réplica del experimento césped <i>S. cerevisiae</i> vs spots de <i>P. aeruginosa</i> 1122 en medio de cultivo agar King A en diferentes pH.....	100

Índice de figuras

Fig.1 Preparación de células para la experimentación de ensayos de inhibición sobre placa	28
Fig.2 Descripción del diseño metodológico de los ensayos de inhibición en placa, en los medios de cultivo utilizados (agar MacConkey, TSA y agar YPD)	29
Fig.3 Descripción gráfica de la evaluación cualitativa del efecto de pH en caja sobre las cepas de <i>P. aeruginosa</i> en medio de cultivo King A y YPD	31
Fig.4 Ejemplificación de la metodología del ensayo de inhibición en medio líquido del tratamiento “Células de <i>S. cerevisiae</i> Killer pueden matar a <i>P. aeruginosa</i> “	34
Fig.5 Gráfico del proceso de colocación de sobrenadantes sobre tiras reactivas de pH.	35
Fig.6 Tamaño promedio de los halos de inhibición obtenidos en los ensayos de inhibición en placa, utilizando la cepa 1122 de <i>P. aeruginosa</i>	38
Fig.7 Tamaño promedio de los halos de inhibición obtenidos en los ensayos de inhibición en placa, utilizando la cepa 757 de <i>P. aeruginosa</i>	40
Fig.8 Patrones de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sensible ante el estrés de <i>P. aeruginosa</i> 1122.....	43
Fig.9 Spots de <i>P. aeruginosa</i> 1122 en diferentes medios de cultivo sobre césped de <i>S. cerevisiae</i> Killer y <i>S. cerevisiae</i> sensible	44
Fig.10 Estructuras de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> Killer ante el estrés generado por <i>P. aeruginosa</i> 1122 a las 24 hrs	45
Fig.11 Estructuras de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> Killer ante el estrés generado por <i>P. aeruginosa</i> 1122 a las 48 hrs	46

Fig.12 Estructuras de crecimiento de <i>S. cerevisiae Killer</i> ante el estrés generado por <i>P. aeruginosa</i> 1122 a los 8 días post experimento	47
Fig.13 Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en medio de cultivo agar King A en diferentes pH.....	49
Fig.14 Visualización microscópica de las colonias de <i>P. aeruginosa</i> que crecieron en medio King A en diferentes pH.....	50
Fig.15 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de <i>P. aeruginosa</i> 1122 al adicionar <i>K1</i> como tratamiento en medio de cultivo YPD líquido.....	52
Fig.16 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de <i>P. aeruginosa</i> 1122 al adicionar <i>K1</i> como tratamiento en medio de cultivo King A líquido	54
Fig.17 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de <i>P. aeruginosa</i> 757 al adicionar <i>K1</i> como tratamiento en medio de cultivo YPD líquido.....	57
Fig.18 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de <i>P. aeruginosa</i> 757 al adicionar <i>K1</i> como tratamiento en medio de cultivo King A líquido	58
Fig.19 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de <i>S. cerevisiae Killer</i> al adicionar TP 1122 (producida por <i>P. aeruginosa</i> 1122) como tratamiento en medio de cultivo YPD líquido	61
Fig.20 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de <i>S. cerevisiae Killer</i> al adicionar TP 1122 (producida por <i>P. aeruginosa</i> 1122) como tratamiento en medio de cultivo King A líquido	62
Fig.21 Promedio de las mediciones de absorbancia celular (OD 600) de <i>S. cerevisiae Killer</i> al adicionar TP 757 (producida por <i>P. aeruginosa</i> 757) como tratamiento en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido.....	64
Fig.22 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de <i>S. cerevisiae</i> sensible al adicionar TP 1122 (producida por <i>P. aeruginosa</i> 1122) como tratamiento en medio de cultivo YPD líquido	66

Fig.23 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *S. cerevisiae* sensible al adicionar TP 1122 (producida por *P. aeruginosa* 1122) como tratamiento en medio de cultivo King A líquido **67**

Fig.24 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *S. cerevisiae* sensible al adicionar TP 757 (producida por *P. aeruginosa* 757) como tratamiento en medio de cultivo YPD líquido **70**

Fig.23 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *S. cerevisiae* sensible al adicionar TP 757 (producida por *P. aeruginosa* 757) como tratamiento en medio de cultivo King A líquido. **71**

Índice de tablas

Tabla 1 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD. Líquido “Toxina K1 (Producida por <i>S. cerevisiae Killer</i>) puede afectar el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> 1122”	53
Tabla 2 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo King A. “Toxina K1 (Producida por <i>S. cerevisiae Killer</i>) puede afectar el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> 1122”	54
Tabla 3 Valores de p y el tipo de correlación que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido. “Toxina K1 (Producida por <i>S. cerevisiae Killer</i>) puede afectar el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> 1122”	55
Tabla 4 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD. “Toxina K1 (Producida por <i>S. cerevisiae Killer</i>) puede afectar el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> 757”	57
Tabla 5 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo King A. “Toxina K1 (Producida por <i>S. cerevisiae Killer</i>) puede afectar el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> 757”	58
Tabla 6 Valores de p y el tipo de regresión lineal que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido. “Toxina K1 (Producida por <i>S. cerevisiae Killer</i>) puede afectar el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> 757”	59
Tabla 7 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD. “Toxina TP 1122 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 1122) puede afectar el crecimiento de <i>S. cerevisiae Killer</i> ”	61
Tabla 8 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo King A. “Toxina TP 1122 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 1122) puede afectar el crecimiento de <i>S. cerevisiae Killer</i> ”	62

Tabla 9 Valores de p y el tipo de regresión lineal que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido. “Toxina TP 1122 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 1122) puede afectar el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> Killer”	63
Tabla 10 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD. “Toxina TP 1122 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 1122) puede afectar el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sensible”	66
Tabla 11 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo King A. “Toxina TP 1122 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 1122) puede afectar el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sensible”	68
Tabla 12 Valores de p y el tipo de regresión lineal que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido. “Toxina TP 1122 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 1122) puede afectar el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sensible”	68
Tabla 13 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD. “Toxina TP 757 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 757 puede afectar el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sensible”	70
Tabla 14 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo King A. “Toxina TP 757 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 757 puede afectar el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sensible”	71
Tabla 15 Valores de p y el tipo de regresión lineal y correlación que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido. “Toxina TP 757 (Producida por <i>P. aeruginosa</i> 757) puede afectar el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> sensible”	72
Tabla 16 Cambios de pH en medio de cultivo YPD y King A.....	73

Dedicatorias

A mis padres, a mi abuelita Rosi, y a mí misma. Lo logramos, nunca lo dudamos, pero es grato saber lo lejos que hemos llegado.

Agradecimientos

Agradezco plenamente a mis padres que siempre me han permitido tener todas las herramientas necesarias para crecer personal, profesional y académicamente, por motivarme día a día a ser cada vez mejor y nunca conformarme. A mi abuelita Rosi que siempre me ha acompañado desde niña en mi camino de la vida y por siempre apoyarme en la formación de quien soy ahora. Gracias también hermana, por ser mi compañera de desvelos, por ser mi amiga de clases en línea y la mejor influencia para distraerme cuando más lo necesitaba. Gracias a mi novio David que siempre me ha impulsado a crecer en lo más alto académica y profesionalmente; por brindarme siempre su apoyo en todas mis decisiones y por siempre recordarme lo capaz que soy de hacer y ser quien yo quiero ser.

Gracias al Dr. Saldaña por permitirme conocer el camino de la investigación desde los primeros semestres de la universidad; y por todo su apoyo, guía y motivación en cada etapa. Gracias a la Dra. Verónica por siempre guiarme en la planificación de mis experimentos y por motivarme a hacer crecer mi investigación con nuevas técnicas.

De igual manera agradezco a mis compañeras del laboratorio y a mis mejores amigas de la universidad, Daniela y Perla, con quienes compartí grandes experiencias durante nuestra estancia en la universidad. Gracias por enseñarme que dar lo mejor de uno es la mejor versión que puedes ser.

Financiamiento del proyecto:

Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS-UAQ).

Laboratorios Nacionales-CONACyT 2021.

FONDEC- 2022.

SEP-CONACyT A1-S-26966. Gracias por el apoyo de la beca para realizar mi tesis de Licenciatura y por el apoyo al proyecto en general.

Resumen

La investigación de esta tesis se enfoca en estudiar cómo es que dos cepas diferentes de *P. aeruginosa* son afectadas por dos cepas de *S. cerevisiae*, pero principalmente por la toxina K1 producida por *S. cerevisiae* Killer. A la par también se estudió el efecto que tienen los metabolitos citotóxicos producidos por las dos cepas de *P. aeruginosa* sobre *S. cerevisiae* Killer y sensible.

Utilizando los metabolitos citotóxicos que secretan la levadura y la bacteria en su medio de cultivo, se evaluó cómo estos afectan el crecimiento de ambos macroorganismos, desarrollándose un efecto antagónico o una estimulación del mismo crecimiento. Los experimentos se realizaron en diferentes medios de cultivo y con dos cepas de *P. aeruginosa* para determinar si el ambiente en donde se desarrolla la competencia citotóxica y las capacidades metabólicas y genéticas de ambos microorganismos pueden desarrollar diferencias en su competencia, siendo beneficiado o afectado alguno de estos.

También se obtuvieron resultados microscópicos de la respuesta que tiene *P. aeruginosa* y *S. cerevisiae* ante el estrés que se generan cuando se ponen a competir las células de ambos microorganismos. Identificando posibles respuestas de quimiotaxis y de polaridad celular en *S. cerevisiae*, como también posibles deficiencias en el desarrollo de biopelículas de *P. aeruginosa*.

Todos los resultados sugieren que tanto *P. aeruginosa* como *S. cerevisiae* sí responden de manera muy específica dependiendo el medio en que se desarrolle la competencia, las capacidades metabólicas y su genética, el tipo de metabolito citotóxico que secretan y la concentración de metabolitos que se administra; generándose aumentos o disminución en el crecimiento en ambos microorganismos. La variación que se desencadena con todos estos

parámetros, permite identificar las condiciones más favorables según sea el fin que se quiera obtener para futuras investigaciones.

Finalmente, con los resultados que se han reportado en esta tesis, se abre el panorama a nuevas líneas de investigación que puedan ayudar a comprender cómo es el mecanismo de acción que tiene *K1* sobre *P. aeruginosa* y los metabolitos que secreta *P. aeruginosa* sobre *S. cerevisiae*; identificando blancos moleculares y procesos celulares que activen o inhiban la expresión de genes en estos microorganismos y cómo es que esto afecta o beneficia los procesos de patogenicidad y resistencia que tiene *P. aeruginosa*. Esto con el objetivo principal de llegar a considerar nuevas estrategias alternativas al uso de antibióticos y bactericidas considerados ya resistentes para *P. aeruginosa*.

Palabras clave: *S. cerevisiae*, *P. aeruginosa*, toxina *K1*, efecto antagónico, competencia citotóxica.

Summary

The research of this thesis focuses on studying how two different strains of *P. aeruginosa* are affected by two strains of *S. cerevisiae*, but mainly by the *K1* toxin produced by *S. cerevisiae Killer*. In parallel, the effect of cytotoxic metabolites produced by the two *P. aeruginosa* strains on *S. cerevisiae Killer* and sensitive *S. cerevisiae* was also studied.

Using the cytotoxic metabolites secreted by the yeast and the bacteria in their culture medium, it was evaluated how these affect the growth of both microorganisms, developing an antagonistic effect or stimulation of the same growth. The experiments were performed in different culture media and with two strains of *P. aeruginosa* to determine if the environment where cytotoxic competition develops and the metabolic and genetic capabilities of both microorganisms can develop differences in their competition, being benefited or affected one of them.

Microscopic results were also obtained on the response of *P. aeruginosa* and *S. cerevisiae* to the stress generated when the cells of both microorganisms compete. Identifying possible chemotaxis and cell polarity responses in *S. cerevisiae*, and possible deficiencies in the development of *P. aeruginosa* biofilms.

All the results suggest that both *P. aeruginosa* and *S. cerevisiae* do respond in a very specific way depending on the environment in which the competition takes place, the metabolic capacities and their genetics, the type of cytotoxic metabolite they secrete, and the concentration of metabolites administered; generating increases or decreases in growth in both microorganisms. The variation that is triggered by all these parameters allows the identification of the most favorable conditions according to the purpose to be obtained for future research.

Finally, with the results reported in this thesis, the panorama is open to new lines of research that can help to understand the mechanism of action that *K1* has on *P. aeruginosa* and the metabolites secreted by *P. aeruginosa* on *S. cerevisiae*; identifying molecular targets and cellular processes that activate or inhibit the expression of genes in these microorganisms and how this affects or benefits the pathogenicity and resistance processes of *P. aeruginosa*. The main objective is to consider new alternative strategies to the use of antibiotics and bactericides already considered resistant to *P. aeruginosa*.

Key words: *S. cerevisiae*, *P. aeruginosa*, *K1* toxin, antagonistic effect, cytotoxic competition.

Introducción

El desarrollo de antimicrobianos ha marcado un antes y un después en la historia, pues su aplicación ha reducido de manera importante la morbilidad y mortalidad de diversas enfermedades que anteriormente eran mortales y graves; además estos avances han permitido incentivar el desarrollo de nuevos tratamientos de enfermedades no necesariamente infecciosas, haciendo que la investigación médica y científica sea cada vez más eficiente e innovadora (Rice, 2008). Sin embargo, el mal e innecesario uso de los antibióticos ha causado que una amplia variedad de bacterias Gram negativas y positivas desarrollen mecanismos de resistencia a estos fármacos; haciendo que se desarrollen infecciones intratables o difíciles de tratar con antibióticos convencionales (Frieri et al., 2017).

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estimaron que en el 2016 en EE. UU. más de dos millones de personas son infectadas cada año con microorganismos multirresistentes y que al menos 13, 000 personas mueren a causa del desarrollo de estas infecciones (Akova, 2016). En el 2021 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que la resistencia a antibióticos es un grave problema de salud pública a nivel mundial; pues se reportó que cada año hay aproximadamente más de 700 muertes en todo el mundo debido a infecciones por bacterias resistentes a antimicrobianos, desarrollándose a su vez graves problemas y pérdidas económicas a nivel mundial (OMS, 2021).

Actualmente se ha catalogado a grupo de bacterias multirresistentes con gran importancia epidemiológica hospitalaria, debido a la capacidad que tienen de desarrollar infecciones nosocomiales graves y en algunos casos mortales debido a que su multirresistencia a los antibióticos se amplía cada vez más; las bacterias que pertenecen a este grupo son *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*

baumanni, *P.seudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter* y son denominadas “bacterias SKAPE”, por sus iniciales (Rice, 2008).

P. aeruginosa es un microorganismo patógeno y principal agente de infecciones nosocomiales con alta tasa de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística y pacientes inmunocomprometidos; esta bacteria posee un genoma de 5,5 - 7 Mbps aproximadamente, el cual le permite a la bacteria desarrollar una gran versatilidad metabólica y una amplia adaptabilidad a cambios ambientales. *P. aeruginosa* posee un gran arsenal de mecanismos de resistencia, incluyendo su resistencia intrínseca basada principalmente en la expresión de bombas de expulsión de antibióticos fuera de la célula y la producción de enzimas que inactivan a los fármacos; su resistencia adquirida basada en cambios por mutaciones y en la adquisición de genes mediante transferencia horizontal de genes de resistencia; y por último su resistencia adaptativa que se basa en la formación de biopelículas (*biofilms*) (Pang et al., 2019)

Estudiar alternativas a antimicrobianos para tratar infecciones por bacterias multirresistentes y principalmente del grupo SKAPE es una tarea de urgencia en la actualidad; en esta investigación se plantea estudiar si es posible que un metabolito citotóxico producido por *S. cerevisiae* puede inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*. También se invita a explorar nuevas áreas de investigación que estudien a nivel de transcriptoma qué genes de *P. aeruginosa* están siendo afectados por el metabolito citotóxico de la levadura y si estos están involucrados con algún proceso de resistencia de la bacteria.

Como parte del estudio también se evalúa si *S. cerevisiae* puede ser afectada de la misma manera por los metabolitos citotóxicos que *P. aeruginosa* secreta en el medio y la función que tiene el cambio de pH sobre la estimulación o inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa*.

2. Antecedentes

2.1 Generalidades de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa, considerada como microorganismo oportunista y poco exigente, pues tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes que le proporcionen pocos nutrientes y condiciones adversas (Skariyachan et al., 2018). Cuenta con un flagelo polar que le permite tener motilidad y no es formadora de espora (Azam & Khan, 2019); Se desarrolla en óptimas condiciones aeróbicas, sin embargo debido a que produce fenazinas, tiene la capacidad de sobrevivir en condiciones anaeróbicas actuando sobre el catabolismo de la glucosa (Ciemniecki & Newman, 2023).

Recientemente la Organización Mundial de la Salud determinó que esta bacteria es considerada como patógeno de prioridad crítica, principalmente debido a su multirresistencia a carbapenémicos, su alta incidencia en infecciones adquiridas en hospitales y su elevado nivel de mortalidad (OMS, 2021).

Las principales infecciones que puede llegar a causar o complicar *P. aeruginosa* en pacientes inmunocomprometidos, son las infecciones del tracto urinario e infecciones pulmonares; desarrollando enfermedades graves como la fibrosis quística (FQ) y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). También se ha relacionado con infecciones de cateterismo e intubación, debido a que el material y dispositivos médicos son contaminados; dando pauta a que los pacientes desarrollen bacteriemia y enfermedades como la neumonía asociada a ventilador (VAP), neumonía adquirida en el hospital (HAP) o también dermatitis (Azam & Khan, 2019; Mulcahy et al., 2014).

Esta bacteria cuenta con un gran arsenal de factores de virulencia que le permite desarrollar diferentes mecanismos que favorezca su sistema de infección, entre estos se encuentra la

capacidad que tiene para desarrollar biopelículas. La formación de las biopelículas es muy amplia en cuestión de expresión de diversos genes y la producción de diferentes proteínas, sin embargo se ha reportado que se componen principalmente de exopolisacáridos que regulan la formación estructural de la biopelícula, entre estos se encuentran *pel* que permite la propagación de células bacterianas y *psl* que es importante en la adhesión celular (Chew et al., 2014). También se involucran los diferentes sistemas de secreción que posee la bacteria, efectores *quorum sensing* y pigmentos con función de fenazina como la piocianina (Paz-Zarza et al., 2019).

2.2 La piocianina producida por *P. aeruginosa*

La piocianina es una herramienta muy versátil para *P. aeruginosa*, pues le ayuda a la bacteria a inhibir en cierto grado el crecimiento de otras bacterias; tiene la capacidad de difundirse fácilmente a través de las membranas celulares gracias a su bajo peso molecular; y además tiene una actividad redox clave para el metabolismo de *Pseudomonas*, pues influye desde la morfología de sus colonias hasta ser un ayudante importante en la dispersión y supervivencia del biofilm en condiciones limitadas de oxidantes (Jabłońska et al., 2023); sin embargo aunque *P. aeruginosa* tiene mecanismos que la protegen de la misma piocianina, este metabolito en altas concentraciones puede llegar a ser tóxico para la bacteria, causando su muerte y sobreviviendo solo algunas células persistentes (Meirelles & Newman, 2018).

Se han reportado novedosas aplicaciones de la piocianina, una de estas es el uso de este metabolito como bactericida para algunas bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; en esta investigación realizada en el 2016 se demostró que el efecto antibacteriano de la piocianina es dependiente de la cepa que se utilice para la obtención de la piocianina, la concentración de piocianina que se administre y que se necesita mayores concentraciones para inhibir bacterias Gram negativas (Justo S et al., 2016).

Otra aplicación diferente de este metabolito citotóxico de *P. aeruginosa* es su uso como anticancerígeno. En el 2022 se estudió la actividad redox y los efectos tóxicos que tiene la piocianina sobre las células de mamíferos, proponiendo a esta toxina como un potencial candidato para tratar el cáncer; pues observaron que la piocianina en células MCF-7 desencadena actividad apoptótica necrótica (Abdelaziz et al., 2022).

2.3 Generalidades de *S. cerevisiae* y la toxina *Killer*

El efecto *Killer* característico en *S. cerevisiae* fue descubierto por Bevan y Makower en 1963, describiendo que estas levaduras pueden clasificarse en cepas *Killer* (productoras de toxina), neutras (no productoras pero resistentes) y sensibles (no productoras y mueren ante la toxina) (Somers & Bevan, 1969). El fenotipo *Killer* es desarrollado debido a la infección de dos virus de dsRNA pertenecientes a la familia Totiviridae; uno de estos es denominado virus auxiliar L-A, este es el encargado de ayudar al mantenimiento y replicación del virus M (ScV-M1, ScV-M2, ScV-M28, ScV-Mlus) el cual codifica el tipo de toxina que se va a producir (*K1*, *K2*, *K28*, *Klus*) y otorga la inmunidad competente de la toxina (Schmitt & Breining, 2006; Orentaite et al., 2016).

En el mecanismo de acción de la toxina *K1* participa el virus L-A y el virus Sc.VM1. El genoma del virus L-A es dsRNA lineal de 4.6 kb y contiene dos marcos de lectura abiertos, ORF 1 que codifica a la proteína Gag, la cual es necesaria para la síntesis de la cápside y la estructura de algunas partículas virales; el otro marco de lectura abierto es ORF2 y este codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN indispensable para la replicación del genoma del virus. Por otro lado, el genoma del virus Sc.VM1 es dsRNA de 1.6 kb y contiene únicamente un marco de lectura abierto que codifica la preprotoxina (pptoX), el cual es el precursor de la toxina sin ser procesado y también es el que le confiere la inmunidad competente a la levadura *Killer* (Schmitt & Breining, 2006).

Resumiendo, en las levaduras *Killer* (productoras de la toxina *K1*), el transcrito (+) ssRNA que codifica la toxina se traduce en el citoplasma al precursor preprotoxina (pptox) sin procesar, este consiste en una señal N terminal (necesaria para la importación de pptox a la luz del retículo endoplasmático), una secuencia y potencialmente N-glicosilada y dos subunidades α y β de la toxina madura. Posteriormente a través de la vía secretora el precursor se procesa enzimáticamente; en el retículo endoplasmático se elimina la señal N terminal y en un apartado del aparato de Golgi tardío mediante las enzimas *Kex1p* y *Kex2p* se eliminan el resto de las subunidades, formándose así el complejo heterodímero α/β , siendo la toxina ya madura. Finalmente, la toxina madura puede unirse a su receptor diana presente en las células sensibles y actuar sobre éste (Schmitt & Breining, 2006).

Se ha reportado que uno de los blancos moleculares de *K1* en *S. cerevisiae* sensible, es el canal de potasio TOK1; la toxina al interactuar sobre el canal iónico, hace que se generen alteraciones desreguladas en la homeostasis de potasio en la célula, causando así la muerte de la célula afectada (Ahmed et al., 1999).

2.4 Competencia entre *P. aeruginosa* y las levaduras

Se han realizado muy pocas investigaciones sobre la competencia que tiene *S. cerevisiae* con *P. aeruginosa*, y se han estudiado con diferentes enfoques y metodologías. Rafat Zrieq en 2015 realizó una pantalla del genoma de *P. aeruginosa* cepa PA14, identificando proteínas efectoras que alteran algunos procesos celulares de *S. cerevisiae*, perjudicando su crecimiento; esto con el objetivo de poder conocer nuevos factores de virulencia de la bacteria que pudieran afectar a las células del huésped, usando a *S. cerevisiae* como modelo eucariota (Zrieq et al., 2015).

Por otro lado, Zahra Dehghan Zadeh en 2021 evaluó si *S. cerevisiae* S3 puede inhibir la expresión de algunos factores de virulencia de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*. En este

estudio pudieron determinar que el sobrenadante del preparado celular de las levaduras afecta de manera distinta la expresión de dos genes de *P. aeruginosa*; pues disminuye la expresión del gen *apl* (proteasa alcalina) y aumenta la expresión del gen *lasB* (elastasa). Por otro lado, observaron que el extracto de las células de levadura lisadas solo disminuye la expresión de ambos genes (*apl* y *lasB*) (Dehghanzadeh et al., 2021).

3. Justificación

Como se pudo apreciar en la introducción y antecedentes, *P. aeruginosa* es una bacteria de alto riesgo microbiológico y epidemiológico o a nivel hospitalario, debido a su capacidad de desarrollar diferentes enfermedades graves en pacientes inmunocomprometidos; a la capacidad que tiene de formar biofilms, principalmente en utensilios hospitalarios y quirúrgicos; y la multirresistencia que presenta ante una amplia variedad de antibióticos.

Existen evidencias del grupo de trabajo del Laboratorio de Biofísica de Membranas (FCN UAQ), que muestran que la toxina *K1* producida por *S. cerevisiae* *Killer* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes organismos procariontas. Se considera que estudiar la posibilidad de que *K1* pueda generar un efecto inhibitorio sobre *P. aeruginosa* es un paso muy importante, para poder considerar este mecanismo como una alternativa al uso de antibióticos para tratar infecciones causadas por esta bacteria, o bien también podría considerarse como una herramienta para eliminar los *biofilms* formados en superficies y utensilios hospitalarios y quirúrgicos.

De igual manera en el laboratorio se ha visto que *S. cerevisiae* sensible no productora de *K1*, tiene la capacidad de acidificar el medio en donde se desarrolla, usando este mecanismo como herramienta para competir con otros microorganismos; con esta información se estudiaría de manera preliminar si esta levadura podría tener la capacidad de afectar el

crecimiento de *P. aeruginosa*, modificando el pH del medio en donde se desarrolle la competencia.

Por otra parte, también se estudiaría si los metabolitos citotóxicos que producen estas dos cepas diferentes de *P. aeruginosa* pueden llegar a afectar el crecimiento de *S. cerevisiae*. Esto con el objetivo de dar pauta a investigaciones transcriptómicas de ambos microorganismos, para conocer cómo son afectados genéticamente por su interacción antagónica.

Finalmente, con herramientas microscópicas se podría conocer cómo es que se desarrolla la competencia entre ambos microorganismos en diferentes condiciones de cultivo; con el objetivo de evaluar la eficiencia de cada microorganismo para sobrevivir en condiciones favorables o no ante el estrés que pudieran ejercerse entre estos mismos.

Con todos estos estudios llevados a cabo en esta investigación, se abren nuevas áreas de investigación que estudien más acerca del comportamiento que tienen ambos microorganismos ante la respuesta de un estrés citotóxico entre ellos y si es posible utilizar esta información para el desarrollo de nuevas herramientas clínicas y biotecnológicas.

4. Hipótesis

1.- El crecimiento de *P. aeruginosa* es afectado por la toxina K1 producida por *S. cerevisiae*.

5. Objetivos

General

Caracterizar la interacción de *S. cerevisiae* y la toxina K1 producida por *S. cerevisiae* Killer con las células de *P. aeruginosa*, y también los metabolitos citotóxicos que secreta en el medio de cultivo *P. aeruginosa* sobre *S. cerevisiae*.

Particulares

- I. Caracterizar microscópicamente la respuesta del crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. cerevisiae* ante su competencia citotóxica en distintas condiciones de cultivo.
- II. Evaluar cuantitativamente en condiciones competitivas el efecto que tiene la toxina *K1* producida por *S. cerevisiae Killer* sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*.
- III. Evaluar cuantitativamente en condiciones competitivas el efecto que tienen los metabolitos citotóxicos producidos por *P. aeruginosa* en el medio de cultivo, sobre el crecimiento de *S. cerevisiae*.

6. Metodología

6.1 Condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas de *P. aeruginosa* 1122 (Resistente a: amikacina, cefepima, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, tobramicina); y la cepa 757 (Resistente a: imipenem y meropenem); Ambas cepas proporcionadas por el Dr. José Antonio Cervantes del Laboratorio de Biología Molecular de Microorganismos, Universidad Autónoma de Querétaro. De igual manera se usaron las cepas de *S. cerevisiae* 42300 (*Killer*, productora de toxina *K1*), y la cepa 5x47 (sensible a la toxina *K1*). La cepa 5x47 fue amablemente donada por la Dra. Rosa Esteban de la Universidad de Salamanca España.

Para la obtención de biomasa celular de las cepas de *P. aeruginosa*, estas fueron cultivadas en medio de cultivo King A líquido (20 g/L de peptona de gelatina, 1.4 g/L de cloruro de magnesio, 10 g/L de sulfato de potasio), manteniendo en agitación el cultivo durante 3 días a 37°C. Las cepas de *S. cerevisiae* fueron cultivadas en medio de cultivo YPD líquido (extracto

de levadura 1%, peptona de carne 2%, glucosa 2%), manteniendo en agitación el cultivo durante 3 días a 37°C.

Las células de *S. cerevisiae* 42300 (*Killer*, productora de toxina *K1*) fueron inducidas en medio de cultivo YPD inductor (7.5 g/L de Extracto de levadura, 5 g/L de peptona de gelatina, 52 g/L de glicerol, FeCl₃ 30 µM, MgSO₄ 2 mM, (NH₄)₂SO₄ 30 mM, KCl 10 mM y CaCl₂ 2 mM), para estimular de manera más eficiente la producción de toxina *K1*. El proceso de inducción se basó en sembrar en medio de cultivo YPD inductor, las células *Killer* obtenidas en el cultivo primario; posteriormente se dejaron incubando en agitación a 37°C durante 16 hrs., y finalmente pasando ese tiempo se separaron las células del medio inductor, obteniendo un sobrenadante donde se concentra la toxina *K1*. Debe tenerse en cuenta que en esta investigación se trabajó con este sobrenadante y no con la toxina *K1* purificada, pues aún no se ha desarrollado algún método para obtener esta toxina de manera pura.

Para saber cuánto medio inductor debe ponerse en las células *Killer* para realizar el proceso de inducción y cuánta toxina *K1* se produciría en el sobrenadante, se utilizó una regla ya estandarizada en el laboratorio que indica que 100 mg de células de *S. cerevisiae* produce 1,000 µl de toxina *K1*; bajo esta regla se determina la siguiente fórmula:

$$\frac{(mg\ células\ Killer\ inducidas)(1,000\ ul\ medio\ inductor)}{100\ mg\ células\ Killer} = X\ ul\ medio\ inductor$$

Para la obtención de las toxinas TP1122 y TP757 (producidas por *P. aeruginosa* 1122 y 757 respectivamente) en sus medios específicos; no se adicionó el medio inductor. Después de los 3 días de incubación del cultivo primario, las células se dejaron 16 horas más en incubación; después de este tiempo se separaron las células del medio y se recolectó todo el medio de cultivo concentrado con los metabolitos citotóxicos de *P. aeruginosa* (TP1122 y TP757).

6.2 Ensayos de inhibición en placa

Inicialmente se obtuvo biomasa celular de ambas cepas de *P. aeruginosa* (1122 y 757), de *S. cerevisiae* *Killer* y de *S. cerevisiae* sensible; esto mediante el procedimiento antes mencionado. Posteriormente se colectaron las células mediante la centrifugación del cultivo (5 min a 3000 rpm), separando el medio de cultivo del botón de células (**Fig. 1 A**).

Para saber cuántos mg de células se obtuvieron, primeramente, se pesó el tubo plástico de 1.5 ml donde posteriormente se colocaron las células que fueron obtenidas en el procedimiento anterior. Seguido de una nueva centrifugación (1 min a 13000 rpm) de las células y obtención de un botón celular más compacto, se retiró el poco medio que pudiera haber quedado en la muestra. Por último, se pesó nuevamente el tubo plástico y se restó el peso del tubo con el botón celular menos el peso inicial del tubo plástico. Y finalmente se hizo una preparación celular de 1 mg de células por 1 μ L de agua destilada estéril en los mismos tubos (**Fig. 1 B**).

$$\begin{aligned} \text{mg células} &= \text{Peso del tubo plástico de 1.5 ml con pellet celular} \\ &\quad - \text{Peso inicial del tubo plástico de 1.5 ml} \end{aligned}$$

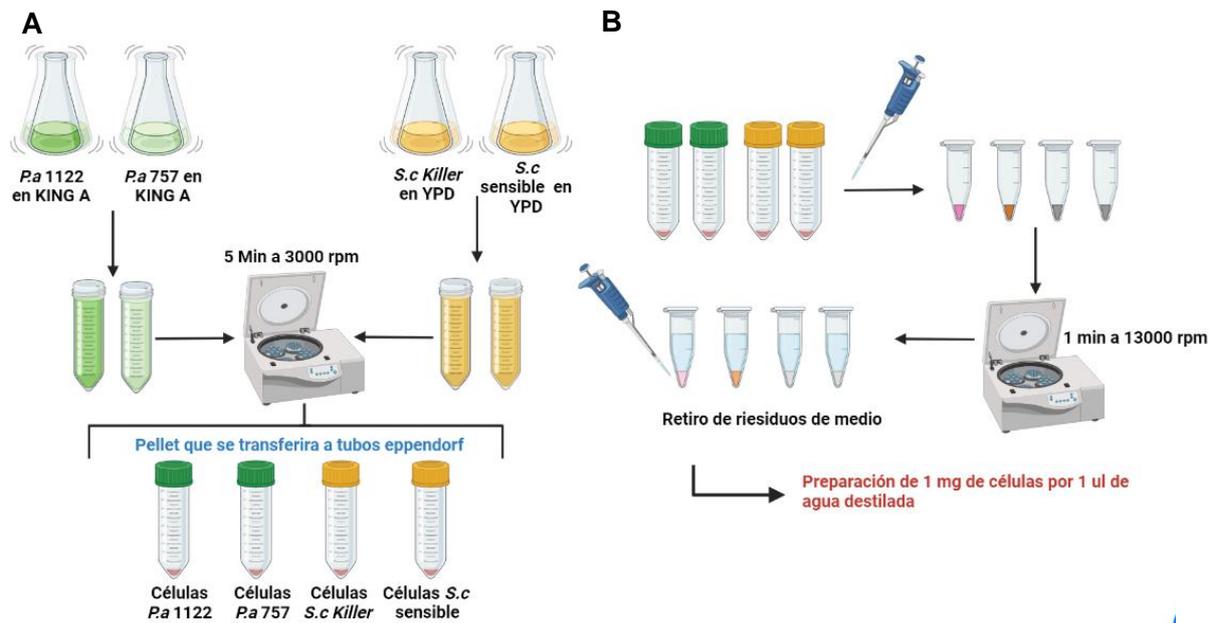


Fig. 1 Preparación de células para la experimentación de ensayos de inhibición en placa **A)** Descripción de la metodología para obtener de la biomasa celular el botón de células a utilizar para la preparación de la mezcla de células / agua destilada, necesaria para los experimentos siguientes; **B)** Procedimiento a realizar para la obtención de la mezcla de células-agua destilada.

Una vez ya teniendo la mezcla de células / agua destilada (1 mg de células por 1 µl de agua), se realizaron ensayos de inhibición en placa, utilizando tres medios de cultivo distintos; agar YPD, agar MacConkey y TSA (Tripteína Soya Agar). En cada uno de los medios de cultivo (en cajas Petri de 90x15 mm) se sembraron las condiciones según el experimento que se quisiera evaluar. Los céspedes de células se realizaron esparciendo los µl correspondientes de la mezcla de células / agua, sobre el agar de las cajas Petri, con la ayuda de una varilla de vidrio. (**Fig. 2**)

Condiciones experimentales:

- Células de *S. cerevisiae Killer* pueden inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*

Se sembraron como césped 5 mg de células de *P. aeruginosa*. Sobre el césped se colocaron 4 spots de células de *S. cerevisiae Killer*: 1 mg, 5 mg, 7 mg y 10 mg respectivamente.

- Células de *P. aeruginosa* pueden inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* Killer

Se sembraron como césped 5 mg de células de *S. cerevisiae* Killer. Sobre el césped se colocaron 4 spots de células de *P. aeruginosa*: 1 mg, 5 mg, 7 mg y 10 mg respectivamente.

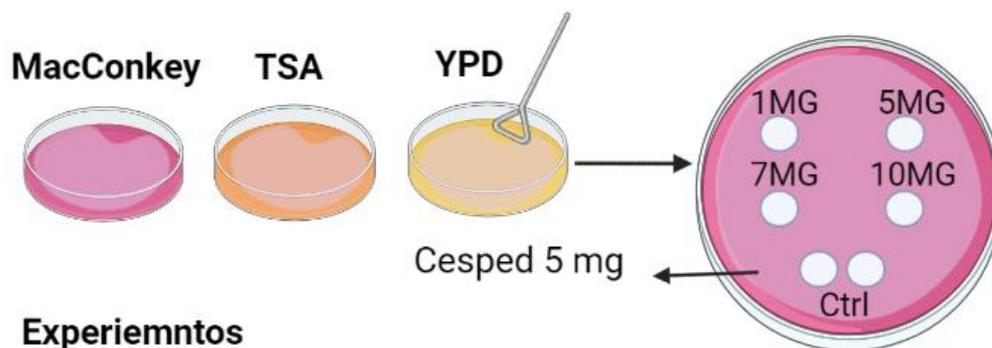
- Células de *S. cerevisiae* sensible pueden inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*

Se sembraron como césped 5 mg de células de *P. aeruginosa*. Sobre el césped se colocaron 4 spots de células de *S. cerevisiae* sensible: 1 mg, 5 mg, 7 mg y 10 mg respectivamente.

- Células de *P. aeruginosa* pueden inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible

Se sembraron como césped 5 mg de células de *S. cerevisiae* sensible. Sobre el césped se colocaron 4 spots de células de *P. aeruginosa*: 1 mg, 5 mg, 7 mg y 10 mg respectivamente.

*Nota: Se realizaron cada uno de estos experimentos con ambas cepas de *P. aeruginosa* por separado.



Experimentos

- *S. cerevisiae* Killer vs *P. aeruginosa*
- *P. aeruginosa* vs *S. cerevisiae* Killer
- *S. cerevisiae* sensible vs *P. aeruginosa*
- *P. aeruginosa* vs *S. cerevisiae* sensible

Fig. 2 Descripción del diseño metodológico de los ensayos de inhibición en placa, en los medios de cultivo utilizados (agar MacConkey, TSA y agar YPD).

Finalmente, las cajas fueron incubadas a 37° por 48 hrs. Se registraron los resultados obtenidos a las 24 hrs. y a las 48 hrs. después de realizar los experimentos. Se obtuvieron

resultados de análisis microscópicos, donde se pudo observar la formación de los halos de inhibición y los cambios que pudieron generarse en ambos lapsos de tiempo. De igual manera se obtuvieron fotografías microscópicas de cada halo de inhibición para la obtención de resultados de caracterización microscópica y de caja completa para realizar mediante el software *Image J* la medición de los halos de inhibición en cada caja. Por último, los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software *R studio*.

Cabe mencionar que se seleccionaron estos medios de cultivo debido a que se quería evaluar la competencia citotóxica y su resistencia poblacional en condiciones de crecimiento favorables o no tan favorables para cada microorganismo. Pues se sabe que el medio de cultivo agar MacConkey es un medio de cultivo selectivo para bacterias Gram negativas como lo es *P. aeruginosa*; el medio de cultivo agar TSA es un medio de cultivo general que favorece el crecimiento de microorganismos anaerobios, aerobios facultativos y estrictos; y finalmente el medio de cultivo agar YPD que es específico para levaduras.

6.3 Evaluación cualitativa del efecto de pH en caja

Posterior a la obtención de biomasa celular y preparación de la mezcla de células / agua. Se realizó la siembra de ambas cepas de *P. aeruginosa* en medio de cultivo agar King A en dos pH distintos: 4.5, 7 y 10.5. Las cajas Petri de cada medio se dividieron a la mitad, sembrando un césped de 4 mg y uno de 5 mg en una sola caja, y se incubaron por 24 y 48 hrs., a 37° C (**Fig. 3**). Esto con la finalidad de evaluar el efecto que tiene el pH sobre el crecimiento de cada una de las cepas de *P. aeruginosa* en un medio de cultivo específico para la bacteria. A su vez, se seleccionaron esta cantidad de mg de células para ver qué condiciones son las más eficientes para obtener un césped homogéneo de *P. aeruginosa* en este medio.

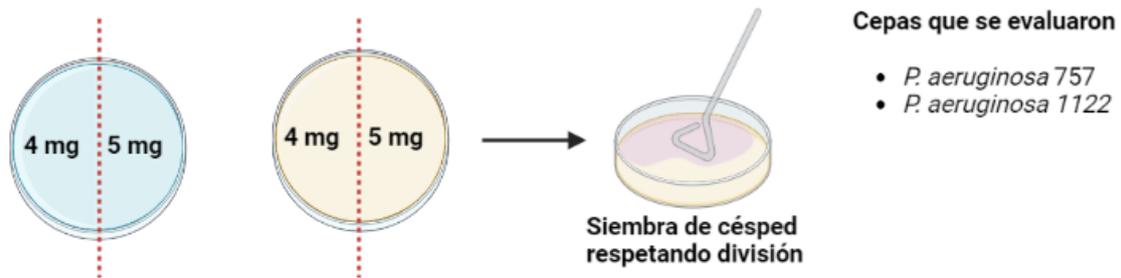


Fig. 3 Descripción gráfica de la evaluación cualitativa del efecto de pH en caja sobre las cepas de *P. aeruginosa* en medio de cultivo King A y YPD.

6.4 Ensayos de inhibición en medio de cultivo líquido

En estos experimentos se utilizaron los medios de cultivo YPD líquido y King A líquido, ambos medios en su pH neutro, y se agregaron en tubos cónicos 2 ml de cada medio. Posteriormente siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la obtención de biomasa celular y de la mezcla de células / agua, en los tubos cónicos con medio se sembraron las siguientes condiciones según el experimento a evaluar.

*Nota: Se realizaron cada uno de estos experimentos con ambas cepas de *P. aeruginosa* por separado

- Toxina *K1* (Producida por *S. cerevisiae* *Killer*) puede afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122

Tubo 1: 3 mg de células de *P. aeruginosa* 1122 + 0.1 mg de toxina *K1*

Tubo 2: 3 mg de células de *P. aeruginosa* 1122 + 1.0 mg de células de toxina *K1*

Tubo 3: 3 mg de células de *P. aeruginosa* 1122 + 10 mg de células de toxina *K1*

Tubo 4: 3 mg de células de *P. aeruginosa* 1122+ 100 mg de células de toxina *K1*

- Toxina *K1* (Producida por *S. cerevisiae* *Killer*) puede afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* 757

Tubo 1: 3 mg de células de *P. aeruginosa* 757 + 0.1 mg de toxina *K1*

Tubo 2: 3 mg de células de *P. aeruginosa* 757 + 1.0 mg de toxina K1

Tubo 3: 3 mg de células de *P. aeruginosa* 757 + 10 mg de toxina K1

Tubo 4: 3 mg de células de *P. aeruginosa* 757 + 100 mg de toxina K1

- Toxina TP 1122 (Producida por *P. aeruginosa* 1122) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* Killer

Tubo 1: 3 mg de células de *S. cerevisiae* Killer + 0.1 mg de TP 1122

Tubo 2: 3 mg de células de *S. cerevisiae* Killer + 1.0 mg de TP 1122

Tubo 3: 3 mg de células de *S. cerevisiae* Killer + 10 mg de TP 1122

Tubo 4: 3 mg de células de *S. cerevisiae* Killer + 100 mg de TP 1122

- Toxina TP 757 (Producida por *P. aeruginosa* 757) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* Killer

Tubo 1: 3 mg de células de *S. cerevisiae* Killer + 0.1 mg de TP 757

Tubo 2: 3 mg de células de *S. cerevisiae* Killer + 1.0 mg de TP 757

Tubo 3: 3 mg de células de *S. cerevisiae* Killer + 10 mg de TP 757

Tubo 4: 3 mg de células de *S. cerevisiae* Killer + 100 mg de TP 757

- Toxina TP 1122 (Producida por *P. aeruginosa* 1122) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible

Tubo 1: 3 mg de células de *S. cerevisiae* sensible + 0.1 mg de TP 1122

Tubo 2: 3 mg de células de *S. cerevisiae* sensible + 1.0 mg de TP 1122

Tubo 3: 3 mg de células de *S. cerevisiae* sensible + 10 mg de TP 1122

Tubo 4: 3 mg de células de *S. cerevisiae* sensible + 100 mg de TP 1122

- Toxina TP 757 (Producida por *P. aeruginosa* 757) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible

Tubo 1: 3 mg de células de *S. cerevisiae* sensible + 0.1 mg de TP 757

Tubo 2: 3 mg de células de *S. cerevisiae* sensible + 1.0 mg de TP 757

Tubo 3: 3 mg de células de *S. cerevisiae* sensible + 10 mg de TP 757

Tubo 4: 3 mg de células de *S. cerevisiae* sensible + 100 mg de TP 757

Como ya se mencionó en el apartado 6.1 Condiciones de cultivo; en esta investigación se trabajó con el sobrenadante concentrado de *K1* producido por *S. cerevisiae* *Killer*, y de TP producido por *P. aeruginosa*. Para saber cuántos μ l de sobrenadante concentrado de *K1* y TP corresponden a los mg que se quería administrar en cada tratamiento, se utilizó el siguiente calculo:

$$\frac{(\text{mg de K1 o TP})(\text{ul medio inductor o King A utilizado})}{\text{mg células Killer inducidas o células de P. aeruginosa}} = \text{ul concentrado de K1 o TP}$$

Después de hacer la preparación de cada tratamiento (o condición experimental), estos se dejaron incubar en agitación a 37°C durante 48 hrs. Pasado este tiempo se tomó 1 ml del tratamiento de cada tubo y se colocaron en tubos plásticos de 1.5 ml rotulados según correspondía cada tratamiento. Después se centrifugaron las muestras (1 min a 13000 rpm) y se colocaron 100 μ l del sobrenadante obtenido en placas de pocillos. Una vez teniendo la placa de pocillos con la muestra de cada tratamiento, se realizó la medición de absorbancia celular (a 600 nm) de todas las muestras, en el equipo *Varioskan (Thermo Fisher Scientific)* proporcionado en la unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología la UNAM, Campus Juriquilla (**Fig. 4**).

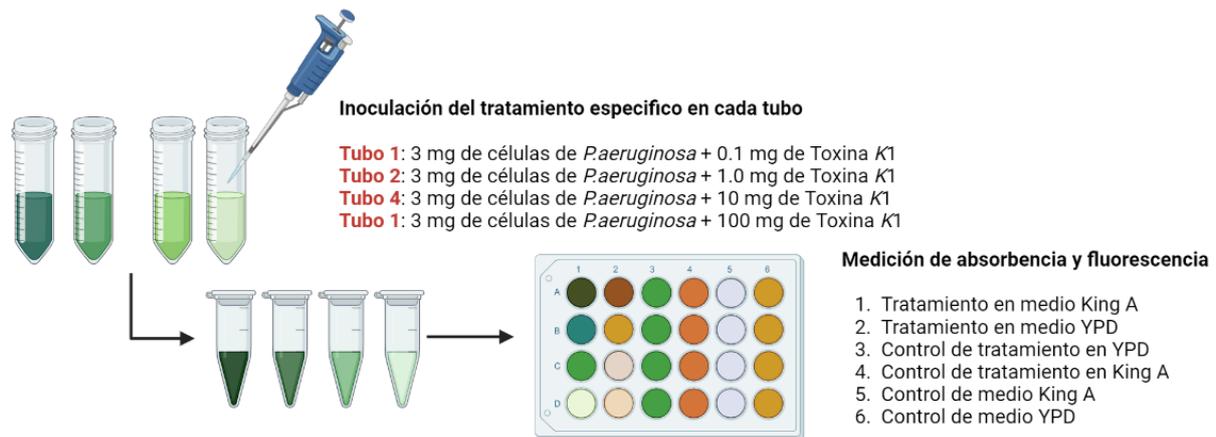


Fig. 4 Ejemplificación de la metodología del ensayo de inhibición en medio líquido del tratamiento “Células de *S. cerevisiae* Killer pueden matar a *P. aeruginosa* “. Las placas con todas las muestras se midieron a 600 nm en el equipo *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*) para la obtención de resultados.

6.5 Evaluación cualitativa del efecto de pH que puede generar *S. cerevisiae* sensible en medio líquido

Aplicando la misma metodología de los ensayos de inhibición en medio líquido, se realizó un experimento utilizando 3 mg de células de *P. aeruginosa* y 100 mg de *S. cerevisiae* sensible. Se utilizaron ambas cepas de *P. aeruginosa* (757 y 1122) para poder caracterizar si las dos cepas son afectadas de la misma manera o se presentan diferencias en los resultados.

Finalmente utilizando el sobrenadante de los tratamientos obtenidos en el último paso de la metodología 6.4 y con el uso de tiras reactivas de pH se hizo la interpretación de un posible cambio de pH generado en los medios post experimento de los ensayos en medio líquido para conocer si *S. cerevisiae* sensible es capaz de cambiar el pH en presencia de *P. aeruginosa*, y saber cómo sería afectada cada cepa de *P. aeruginosa* dependiendo el cambio de pH. (**Fig.**

5)



Fig. 5 Gráfico del proceso de colocación de sobrenadantes sobre tiras reactivas de pH. Se realizó este procedimiento con cada uno de los tratamientos y sus correspondientes controles, para la obtención de datos estadísticos.

7. Resultados

7.1 Ensayos de inhibición en placa

Para poder conocer el efecto inhibitorio que puede tener cada microorganismo sobre el otro y su respuesta para sobrevivir en distintas condiciones de cultivo, se realizaron los experimentos de inhibición en placa ya antes descritos en la metodología 6.2, en los cuales se pusieron a competir a *S. cerevisiae* Killer (42300 K+) y sensible (5X47 K-) contra *P. aeruginosa* 1122 y 757. En la **Fig. 6** y **7** se muestran los resultados. Las gráficas muestran en el eje y el tamaño promedio de los halos de inhibición que se formaron (en cm²) y en el eje x los medios de cultivo utilizados y mg de células que se pusieron en cada spot (esta información se visualiza en la leyenda).

Por otra parte, para determinar estadísticamente si los resultados eran significativos, se realizó un *Anova* por cada condición experimental (descritas en la metodología 6.2), y posteriormente se aplicó una prueba de Tukey para observar las comparaciones significativas entre los mg de células en los spots y los medios de cultivo utilizados.

En la mayoría de los resultados se pudo observar que existe una variación entre el tamaño del halo de inhibición formado con respecto a la cantidad de mg de células utilizadas para cada spot celular, indicando que el efecto inhibitorio desarrollado es dosis dependiente y es característicamente mayor o menor conforme a la competencia que desarrolla cada microorganismo. Cabe mencionar que no en todos los medios de cultivo se observó el comportamiento esperado de que el halo de inhibición fuera de mayor tamaño conforme se aumentaran los mg de células en cada spot; con esto se sugiere realizar mayor número de réplicas para poder estandarizar mejor los resultados y así mismo disminuir el error estándar observados en las gráficas.

7.1.1 Ensayos de inhibición utilizando la cepa 1122 de *P. aeruginosa*

En la **Fig. 6 A** se muestran los resultados obtenidos en el experimento “Células de *S. cerevisiae Killer* pueden inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122”. Se puede observar que la levadura sí tiene un efecto inhibitorio sobre la bacteria. Se desarrollaron halos de inhibición más grandes en el medio de cultivo agar MacConkey, siendo el medio de cultivo TCA y agar YPD muy similares en sus resultados (MAC>TCA=YPD). Se obtuvo en el *Anova* un valor de $p=0.00324$ y valores significativos en la prueba de Tukey (**S. 2**), confirmando que el efecto inhibitorio *Killer* sobre *P. aeruginosa* 1122 es significativamente diferente dependiendo de la concentración de mg de células de *S. cerevisiae Killer* que se utilicen y el medio de cultivo en que se desarrolle la competencia.

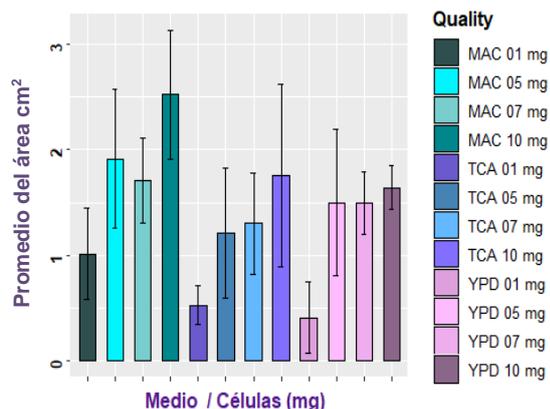
En los resultados del experimento “Células de *P. aeruginosa* 1122 pueden inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae Killer*” (**Fig. 6 B**) se observa que la bacteria sí inhibe el crecimiento de la levadura, sin embargo, esta inhibición es ligeramente menor que la que *S. cerevisiae Killer* desarrolla sobre *P. aeruginosa* 1122. El *Anova* reflejó un valor de p no significativo ($p=0.13$), lo cual determina que la inhibición que desarrolla *P. aeruginosa* 1122 sobre *S. cerevisiae Killer* no es significativamente diferente dependiendo el medio en que se desarrolle

la competencia (MAC=TCA=YPD), ni por la cantidad de mg de células que se pongan a competir.

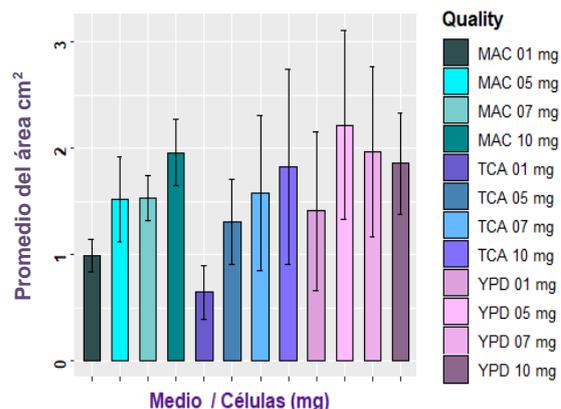
Para conocer si también se puede inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* con una cepa de levadura no productora de toxina, se realizó el experimento “Células de *S. cerevisiae* sensible pueden inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122”. En la **Fig. 6 C** se muestran los resultados obtenidos; en estos se observan que *S. cerevisiae* sensible también puede inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122, y lo hace de manera muy similar que *S. cerevisiae* Killer. El tamaño de los halos de inhibición formados en los tres medios de cultivo es muy parecido (MAC=TCA=YPD), y el *Anova* lo confirmó con un valor de p no significativo ($p= 0.283$). Con esto podemos determinar que aun siendo favorables o no las condiciones de cultivo para la levadura, el efecto inhibitorio que tiene *S. cerevisiae* sobre *P. aeruginosa* 1122 no es distinto entre estas condiciones.

Finalmente, con los resultados del experimento “Células de *P. aeruginosa* 1122 pueden inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible” (**Fig. 6 D**), se puede observar que sí hay una diferencia muy notoria entre el tamaño de halo que se obtiene principalmente dependiendo el medio utilizado y al igual dependiendo de la cantidad de mg que se usen para la evaluar la competencia. En el gráfico podemos notar que en el medio YPD el tamaño de los halos de inhibición formados por la bacteria son mucho más pequeños que los halos de inhibición formados en los medios de cultivo agar MacConkey y TSA (MAC>TSA>YPD), lo cual es de esperarse porque estos últimos dos medios son específicos para bacterias, favoreciendo así el crecimiento y desarrollo de *P. aeruginosa* 1122 sobre el desarrollo de la levadura. En el *Anova* se obtuvo un resultado significativo ($p= 3.33e-06$ ***) y en la prueba de Tukey valores significativos. (**S2**) Concluyendo en este caso, que el efecto que tiene *P. aeruginosa* 1122 sobre *S. cerevisiae* sensible es significativamente distinto dependiendo del medio de cultivo en que se desarrolle la competencia y los mg de células que se utilicen de los microorganismos.

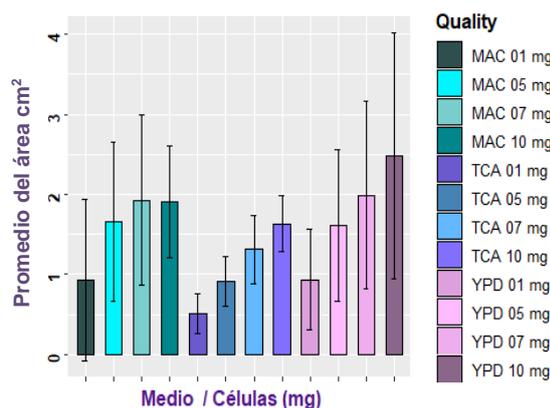
A Halos de inhibición *P. aeruginosa* 1122 vs *K+*



B Halos de inhibición *K+* vs *P. aeruginosa* 1122



C Halos de inhibición *P. aeruginosa* 1122 vs *K-*



D Halos de inhibición *K-* vs *P. aeruginosa* 1122

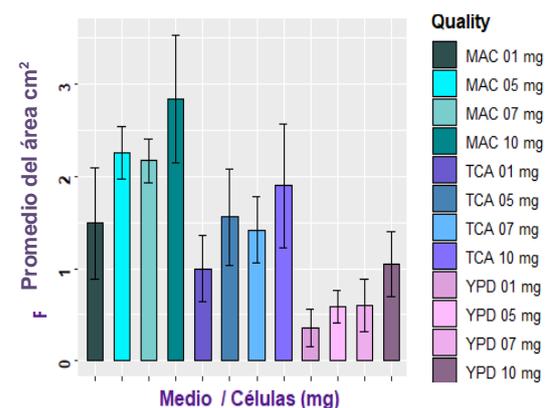


Fig. 6 Tamaño promedio de los halos de inhibición obtenidos en los ensayos de inhibición en placa, utilizando la cepa 1122 de *P. aeruginosa*. Como se muestra en la leyenda, se utilizaron tres medios de cultivo diferentes en cada experimento: el medio de cultivo agar MacConkey, agar YPD y TSA; los céspedes en cada caja Petri fueron realizados con 5 mg de células, y los mg de células utilizados en los spots fueron de 1 mg, 5 mg, 7 mg y 10 mg de células. Las condiciones de incubación fueron a 37 °C por 48 hrs. La medición de los halos de inhibición se realizó con el software *Image J* y se utilizó el programa *R studio* para los análisis estadísticos. **A)** Halos de inhibición formados por *S. cerevisiae* Killer sobre césped de *P. aeruginosa* 1122; **B)** Halos de inhibición formados por *P. aeruginosa* 1122 sobre césped de *S. cerevisiae* Killer; **C)** Halos de inhibición formados por *S. cerevisiae* sensible sobre césped de *P. aeruginosa* 1122; **D)** Halos de inhibición formados por *P. aeruginosa* 1122 sobre césped de *S. cerevisiae* sensible.

7.1.2 Ensayos de inhibición utilizando la cepa 757 de *P. aeruginosa*

Utilizando el mismo procedimiento estadístico y gráfico, en los resultados obtenidos utilizando la cepa 757 de *P. aeruginosa* (**Fig. 7**) se ve de manera evidente que el comportamiento competitivo y citotóxico de ambos microorganismos es muy diferente con respecto a los

resultados obtenidos con la cepa 1122; lo cual nos indica que estos experimentos realizados pueden ser diferentes dependiendo la cepa de *P. aeruginosa* con la que se esté trabajando.

En el experimento “Células de *S. cerevisiae Killer* pueden inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa 757*” (**Fig. 7 A**), se puede observar que el efecto inhibitorio de *S. cerevisiae Killer* sobre la bacteria es mayormente favorecido en los medios de cultivo TSA y agar YPD (MAC<TSA=YPD), lo cual es de esperarse debido a que el medio YPD es específico para levaduras, y el medio TSA es un medio de cultivo general y puede llegar a favorecer a la levadura con sus nutrientes.

De igual manera podemos observar que la inhibición es dosis dependiente, pues en los tres medios de cultivo se obtuvo un mayor efecto inhibitorio utilizando como tratamiento 10 mg de células de levaduras sobre las células de *P. aeruginosa 757*. Finalmente, como era de esperarse, en los análisis estadísticos se obtuvo en el *Anova* un valor de $p= 1.43e-09$ ***, con comparaciones significativas de la prueba de Tukey (**S3**).

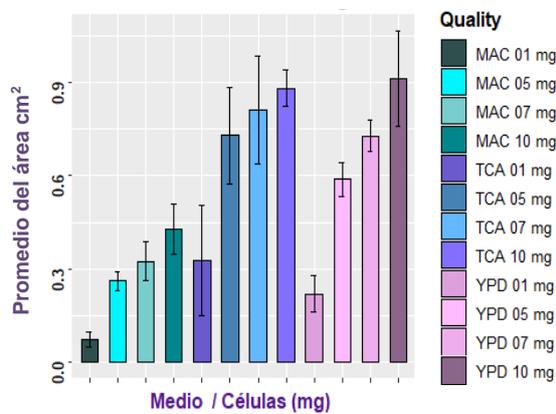
Como condición contraria, en el experimento “Células de *P. aeruginosa 757* pueden inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae Killer*” se observa justamente la respuesta contraria al experimento pasado, pues el efecto inhibitorio dado por *P. aeruginosa 757* es mayormente favorecido en el medio de cultivo agar MacConkey a diferencia de los otros dos medios (MAC>TSA=YPD); esto puede ser debido a que este medio de cultivo es específico para enterobacterias, poniendo a favor todas las condiciones de crecimiento y desarrollo de la bacteria y no de la levadura. Se obtuvieron de igual manera resultados significativos en el *Anova* ($p= 1.07e-10$ ***) y en la prueba de Tukey (**S3**).

En el experimento “Células de *S. cerevisiae* sensible pueden inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa 757*” (**Fig. 7 C**) se obtuvo en el *Anova* un valor de $p= 9e-16$ ***, y en la prueba de Tukey valores significativos (**S3**). Mostrando nuevamente que la levadura es mayormente

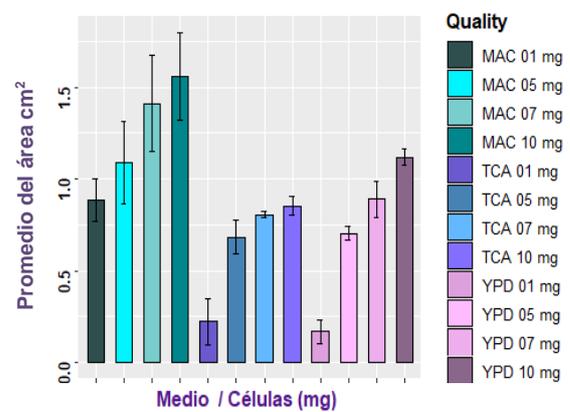
favorecida en los medios YPD y TSA a comparación del medio MacConkey (MAC<TSA<YPD), pues se forman halos de inhibición de mayor tamaño en estos dos primeros medios.

Y, por último, en el experimento “Células de *P. aeruginosa* 757 pueden inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible” (Fig. 7 D), se puede observar que el efecto inhibitorio generado por la bacteria es beneficiado casi de manera homogénea entre los tres medios, pero aun así es ligeramente mayor en los medios MacConkey y TSA, y la diferencia del tamaño del halo con respecto a la concentración de células que se administra es muy notoria. En los análisis estadísticos se obtuvo un Anova con valor de $p=1.06e-05$ *** y en la prueba de Tukey valores significativos (S3).

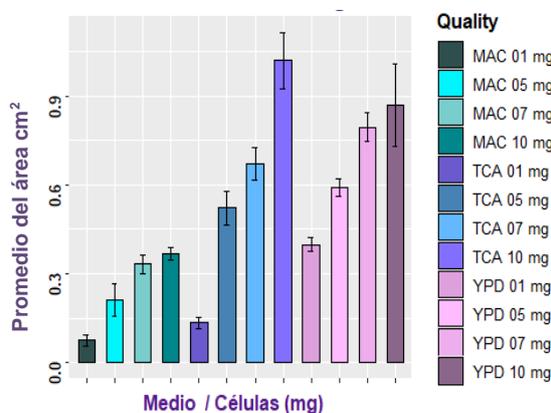
A Halos de inhibición *P. aeruginosa* 757 vs *K+*



B Halos de inhibición *K+* vs *P. aeruginosa* 757



C Halos de inhibición *P. aeruginosa* 757 vs *K-*



D Halos de inhibición *K-* vs *P. aeruginosa* 757

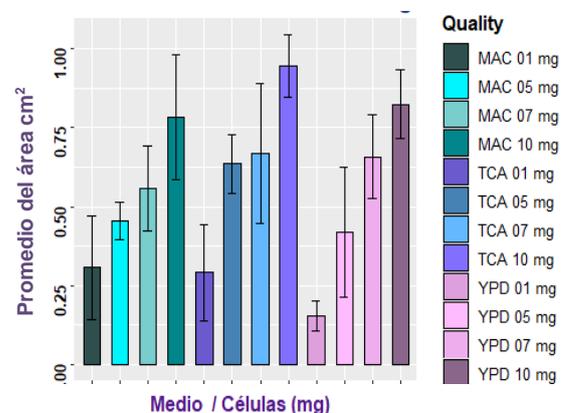


Fig. 7 Tamaño promedio de los halos de inhibición obtenidos en los ensayos de inhibición en placa, utilizando la cepa 757 de *P. aeruginosa*. Como se muestra en la leyenda, se utilizaron tres medios de cultivo diferentes en cada experimento: el medio de cultivo agar MacConkey, agar YPD y TSA; los céspedes en cada caja Petri fueron realizados con 5 mg de células, y los spots fueron de 1 mg, 5 mg, 7 mg y 10 mg de células. Las condiciones de incubación fueron a 37 °C por 48 hrs. La medición de los halos de inhibición

se realizó con el software *Image J* y se utilizó el programa *R studio* para los análisis estadísticos. **A)** Halos de inhibición formados por *S. cerevisiae Killer* sobre césped de *P. aeruginosa* 757; **B)** Halos de inhibición formados por *P. aeruginosa* 757 sobre césped de *S. cerevisiae Killer*; **C)** Halos de inhibición formados por *S. cerevisiae* sensible sobre césped de *P. aeruginosa* 757; **D)** Halos de inhibición formados por *P. aeruginosa* 757 sobre césped de *S. cerevisiae* sensible.

7.2 Análisis microscópicos

Se revisaron los spots y los céspedes de los experimentos de inhibición en placa y se tomaron fotografías de los resultados a las 48 hrs. posterior a la realización del experimento; a excepción el experimento de “las células de *S. cerevisiae Killer* pueden inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122”, pues en este experimento se vio la necesidad de registrar fotografías a las 24 hrs., 48 hrs. y 8 días después, debido al cambio de resultados conforme transcurría el tiempo.

Con esto se pudo obtener datos interesantes sobre la respuesta que tiene cada microorganismo ante el estrés que se le genera por competencia antagónica en los diferentes medios. Aunque los resultados de halos de inhibición no variaron mucho entre los tres medios de cultivo, se pudo observar que algunas respuestas competitivas (que se muestran a continuación en los resultados microscópicos) sí variaban dependiendo el medio de cultivo utilizado; de igual manera se llega a notar de manera más predominante la respuesta competitiva en los spots de 10 mg, a diferencia de la de 1 mg. Por ello se decidió tomar fotografías de los resultados en los spots de 10 mg de células del microorganismo correspondiente.

Todos los resultados microscópicos se observaron en un microscopio MVX10 marca Olympus y se capturaron las imágenes con una CCD XM10 Olympus; Las imágenes se procesaron utilizando *software* de captura *Cells Sence* 2021 distribuido por Olympus.

7.2.1 Respuesta de *S. cerevisiae* sensible ante el estrés generado por *P. aeruginosa* 1122

Antes de estandarizar los mg a utilizar en la siembra de césped y spots, se realizó un experimento piloto para conocer si había una inhibición entre estos dos microorganismos; al revisar la caja del medio de cultivo agar YPD a las 48 hrs. se observa que *S. cerevisiae* sensible en césped toma un patrón de crecimiento debajo del spot de *P. aeruginosa* 1122 de una forma particularmente radial; a partir de donde se termina el halo de inhibición se rompe este patrón y las levaduras crecen sin ningún orden en específico; esto sugiere que la levadura ante el estrés que le causa la bacteria puede estar desarrollando como respuesta este patrón de crecimiento (**Fig. 8 A**).

Una vez estandarizado que en el experimento se sembrarían 5 mg de células de *S. cerevisiae* sensible como césped y se colocarían 10 mg de células de *P. aeruginosa* 1122 como uno de los spots en medio de cultivo agar YPD, se pudo observar que debajo del spot de la bacteria se forman colonias puntiformes y algunas aglomeradas, las cuales podrían corresponder a las células del césped de *S. cerevisiae* sensible (**Fig. 8 B**); sin embargo, para confirmar que esas colonias puntiformes corresponden a la levadura y no a *P. aeruginosa* 1122 es necesario realizar más análisis.

Por otro lado, se realizó un control del césped de *S. cerevisiae* sensible en medio de cultivo agar YPD (**Fig. 8 C**); el crecimiento de las levaduras control se desarrolló de manera homogénea en toda la caja y sin un patrón de crecimiento característico, ni similar al obtenido en los resultados antes mencionados. Esto indica que la respuesta competitiva entre estos dos macroorganismos en medio de cultivo agar YPD, desarrolla cambios en el crecimiento de ambos macroorganismos, ya sea por el efecto citotóxico que puede generar la bacteria, por la competencia de nutrientes y espacio en el medio o por algún mecanismo de defensa que aún no conocemos que puede desarrollar *S. cerevisiae* sensible.

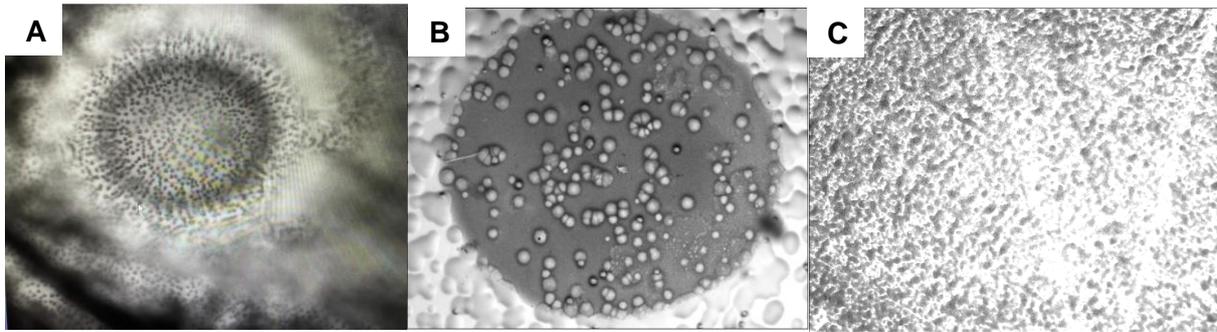


Fig. 8 Patrones de crecimiento de *S. cerevisiae* sensible ante el estrés de *P. aeruginosa* 1122. Se muestra el crecimiento característico que tiene el césped de células de *S. cerevisiae* sensible en medio de cultivo agar YPD; las condiciones de incubación fueron a 37°C por 48 hrs.; **A)** Césped de *S. cerevisiae* sensible debajo de un spot de *P. aeruginosa* 1122; experimento sin estandarizar. El crecimiento de la levadura es en forma radial; **B)** Césped de *S. cerevisiae* sensible debajo de un spot de *P. aeruginosa* 1122, experimento estandarizado a 5 mg células en césped y 10 mg en spot. Se desarrollan colonias puntiformes y aglomeradas debajo del spot de *P. aeruginosa* 1122; **C)** Césped control de *S. cerevisiae* sensible. El crecimiento de la levadura es homogénea y uniforme en toda la caja.

7.2.2 Respuesta de *P. aeruginosa* 1122 ante el estrés generado por *S. cerevisiae* Killer y *S. cerevisiae* sensible

Como ya se mencionó anteriormente, el estrés que se genera entre ambos microorganismos se puede caracterizar con la forma en qué crece cada uno, ya sea en césped o en *spots*; en este caso se visualiza que *P. aeruginosa* 1122 tiene diferente respuesta en el crecimiento de su spot dependiendo si se desarrolla una competencia sobre un césped de *S. cerevisiae* Killer o *S. cerevisiae* sensible y del medio de cultivo que se utilice (**Fig. 9**).

P. aeruginosa 1122 en medio de cultivo agar MacConkey parece desarrollar *swarming* a partir de donde acaba el *spot* expandiendo su crecimiento hacia afuera; sin embargo, cuando crece sobre césped de *S. cerevisiae* Killer el spot crece de forma más plana, a diferencia de cuando crece sobre *S. cerevisiae* sensible, pues en este último caso el spot sobresale más del medio y tiene mayor crecimiento.

En medio de cultivo TSA el desarrollo del *swarming* es menor a diferencia del que se desarrolla en medio de cultivo agar MacConkey; y el tamaño del spot sobre el césped de *S. cerevisiae Killer* es más grande a comparación del que crece sobre el césped de *S. cerevisiae* sensible. Por último, en medio de cultivo agar YPD parece no desarrollarse *swarming*, y es más pequeño el spot y menos denso el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122 sobre el césped de *S. cerevisiae Killer*.

Estos resultados indican que *S. cerevisiae Killer* productora de toxina *K1* y *S. cerevisiae* sensible no productora de toxina, disminuyen el desarrollo del *swarming* de *P. aeruginosa* 1122 y que ambas cepas de levadura lo hacen mediante mecanismos distintos, ya sea por la producción de *K1* o no. Al igual indican que este efecto puede ser distinto en su efectividad dependiendo las condiciones de cultivo en que se desarrolle la competencia entre la bacteria y la levadura.

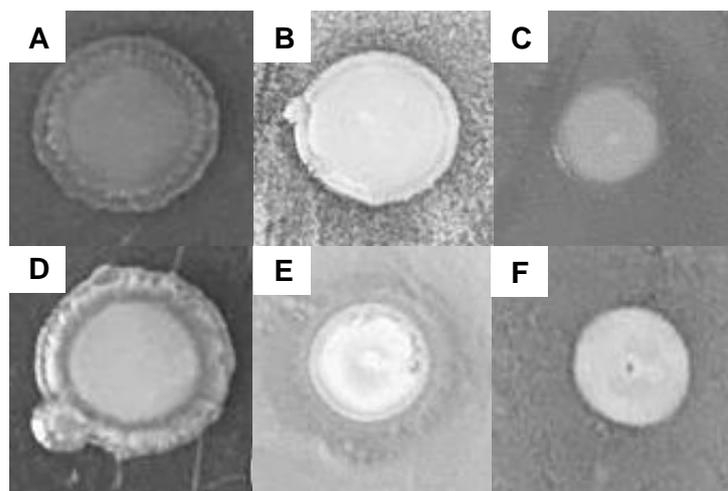


Fig. 9 Spots de *P. aeruginosa* 1122 en diferentes medios de cultivo sobre césped de *S. cerevisiae Killer* y *S. cerevisiae* sensible. Estos resultados son la representación de una de las 3 réplicas de spots de 10 mg de células de *P. aeruginosa* 1122 sobre céspedes de 5 mg de células de *S. cerevisiae*. Todos los experimentos se incubaron a 37°C durante 48 hrs. **A)** Spot de *P. aeruginosa* 1122 sobre césped de *S. cerevisiae Killer* en medio de cultivo agar MacConkey; **B)** Spot de *P. aeruginosa* 1122 sobre césped de *S. cerevisiae Killer* en medio de cultivo agar TSA; **C)** Spot de *P. aeruginosa* 1122 sobre césped de *S. cerevisiae Killer* en medio de cultivo agar YPD; **D)** Spot de *P. aeruginosa* 1122 sobre césped de *S. cerevisiae* sensible en medio de cultivo agar MacConkey; **E)** Spot de *P. aeruginosa* 1122 sobre césped de *S. cerevisiae* sensible en medio de cultivo agar TSA; **F)** Spot de *P. aeruginosa* 1122 sobre césped de *S. cerevisiae* sensible en medio de cultivo agar YPD.

7.2.3 Respuesta de *S. cerevisiae* Killer ante el estrés generado por *P. aeruginosa* 1122

Este experimento presenta diferentes resultados conforme pasa el tiempo después de realizarlo. A las 24 hrs. posterior de realizar el experimento, el spot de *S. cerevisiae* Killer desarrolla a su alrededor una “corona” formada por las mismas levaduras, las cuales se acomodan formando estructuras verticales únicamente alrededor del spot (**Fig. 10 A, B y C**). El spot control que se realizó para comparar los resultados del experimento no muestra diferencia con el resultado obtenido a las 24 hrs; por lo cual la “corona” que se encuentra alrededor del spot puede corresponder al crecimiento exponencial del spot de la levadura, lo cual indicaría que el crecimiento de *S. cerevisiae* Killer a las 24 no es afectado por las células de *P. aeruginosa*, 1122 o bien que la levadura tiene la capacidad de desarrollar crecimiento poblacional ante el estrés que le causa la bacteria durante las primeras 24 hrs. después de la interacción de estos dos microorganismos en el medio de cultivo agar YPD.

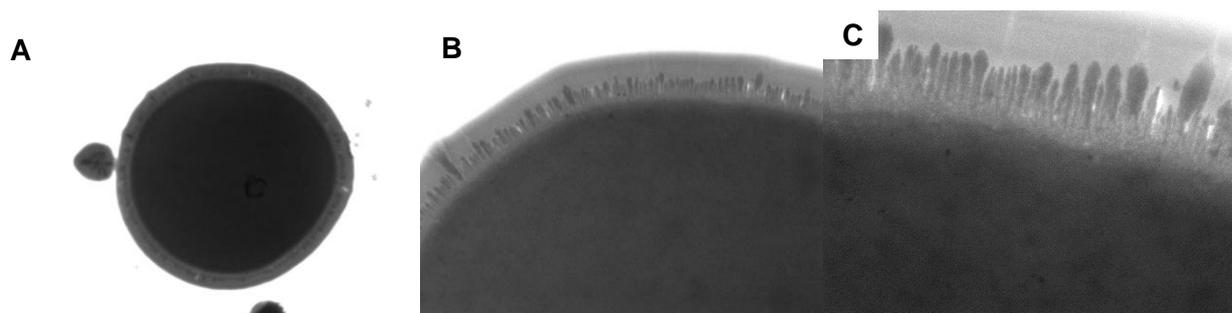


Fig. 10 Estructuras de crecimiento de *S. cerevisiae* Killer ante el estrés generado por *P. aeruginosa* 1122 a las 24 hrs. Se muestra el resultado del crecimiento característico (por arriba del spot) que tiene el spot de 10 mg de células de *S. cerevisiae* Killer en medio de cultivo agar YPD, sobre un césped de 5 mg de células de *P. aeruginosa* 1122; las condiciones de incubación fueron a 37°C por 24 hrs. **A)** Formación de “corona” alrededor del spot completo de *S. cerevisiae* Killer que crece sobre césped de *P. aeruginosa* 1122 a las 24 hrs.; **B)** Patrón de crecimiento de *S. cerevisiae* Killer formando estructuras verticales que conforman la “corona” (acercamiento del spot de la Figura A; **C)** Doble acercamiento del spot de la Figura A, visualizando a detalle las estructuras verticales que conforman la “corona”.

A las 48 hrs. después de la realización del experimento, estas estructuras alrededor del spot son más largas, gruesas y no tan definidas como se aprecian a las 24 hrs; además se desarrollan estructuras en forma de pétalos, las cuales crecen formando un círculo dentro del

área del spot y son visibles únicamente por debajo del spot (**Fig. 11 A, B y C**). El spot control de *S. cerevisiae Killer* a las 48 hrs. también presenta la presencia de estas estructuras dentro del área del spot, sin embargo, es muy evidente que la cantidad de estas estructuras es mucho menor que en los spots del experimento y se encuentran más a la periferia del área del spot (**Fig. 11 D, E y F**).

Se desconoce la razón de la presencia de estas estructuras en los spots de *S. cerevisiae Killer* y lo que son realmente, sin embargo, es importante hacer notar que únicamente se observaron en el medio de cultivo agar YPD y con esta cepa (42300), pues no se identificaron en los spots de *S. cerevisiae* sensible. Estas observaciones pudieran indicar que estas estructuras están relacionadas con la producción de K1, y que la competencia con *P. aeruginosa* puede estar alterando este proceso, aumentando la cantidad de estas estructuras alrededor de todo el spot.

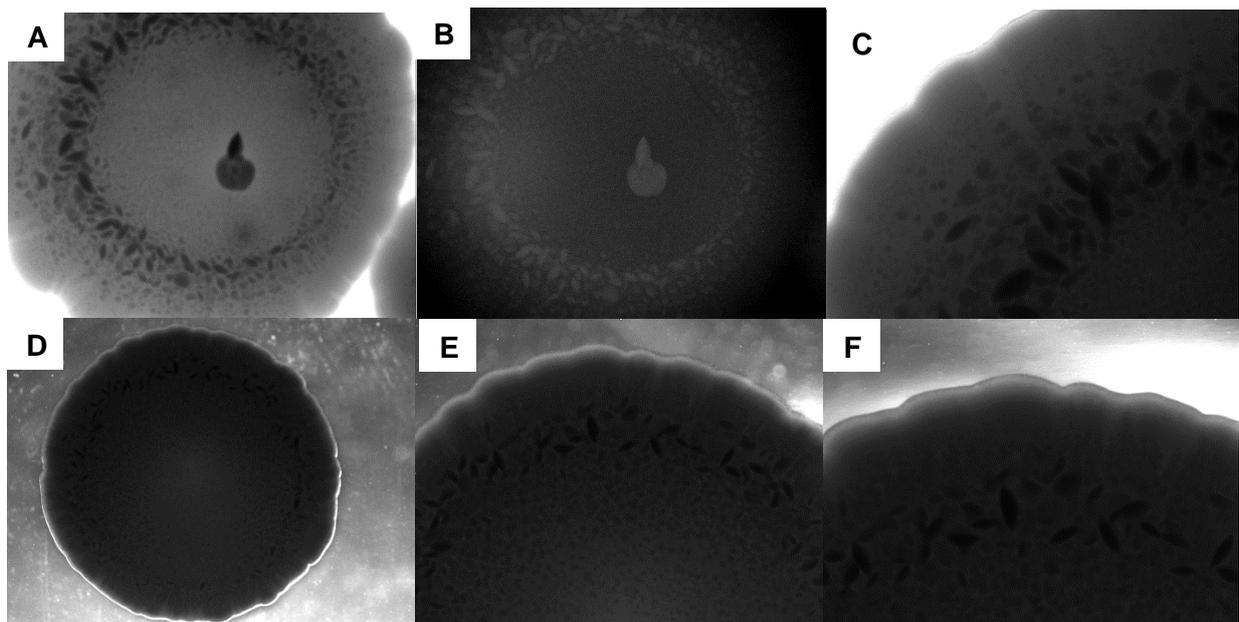
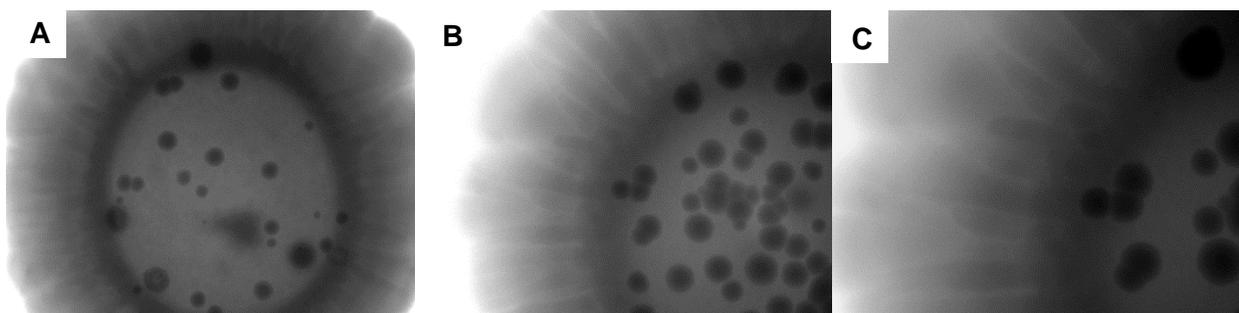


Fig. 11 Estructuras de crecimiento de *S. cerevisiae Killer* ante el estrés generado por *P. aeruginosa* 1122 a las 48 hrs. Se muestra el resultado del crecimiento característico (por debajo del spot) que tiene el spot de 10 mg de células de *S. cerevisiae Killer* en medio de cultivo agar YPD, sobre un césped de 5 mg de células de *P. aeruginosa* 1122; las condiciones de incubación fueron a 37°C por 48 hrs. **A)** Formación de estructuras en forma de “pétalos” en el interior del área del *spot* completo de *S. cerevisiae Killer*; **B)** Acercamiento del spot de la Figura A; **C)** Doble acercamiento del spot de la Figura A, haciendo énfasis en las estructuras en forma de “pétalos” que crecen en el interior del área del *spot* completo de *S. cerevisiae Killer*; **D)** Spot control de *S. cerevisiae Killer*, identificando menor cantidad de las estructuras

en formas de “pétalos”; **E)** Acercamiento del spot de la figura **D**; **E)** Doble acercamiento del spot de la figura **D**, haciendo énfasis en las estructuras en formas de “pétalos”.

Y finalmente los resultados fueron nuevamente revisados 8 días después de hacer el experimento, con la finalidad de revisar si los resultados obtenidos anteriormente presentaron cambios importantes; y en esta nueva revisión se identificó que las estructuras descritas en la **Fig. 12**, son mucho más abundantes y alargadas (hasta más largas que las observadas a las 48 hrs.) (**Fig. 12 A, B y C**); además las estructuras en forma de “pétalos” parecen estar aglomeradas justamente por debajo de donde comienza el crecimiento de estas estructuras alargadas alrededor del spot. Por otro lado, en el control del spot de *S. cerevisiae Killer*, estas estructuras son mucho más cortas en comparación a las que se desarrollan en el experimento a los 8 días después de realizarlo. (**Fig. 12 D, E y F**).

En conclusión, los resultados obtenidos a lo largo de las 28, 48 hrs. y 8 días, indican que *P. aeruginosa* 1122 estimula el crecimiento de estas estructuras identificadas en los spots de *S. cerevisiae Killer*. No se pudo identificar qué son exactamente estas estructuras y la razón de su desarrollo; por lo cual se invita a realizar investigaciones sobre el transcriptoma de ambos microorganismos en competencia, para poder comprender los procesos genéticos y metabólicos que están siendo alterados para que se desencadene la formación de las estructuras identificadas, pues es evidente que la competencia de *P. aeruginosa* 1122 y *S. cerevisiae Killer* en medio de cultivo agar YPD desencadena cambios en el crecimiento de ambos microorganismos.



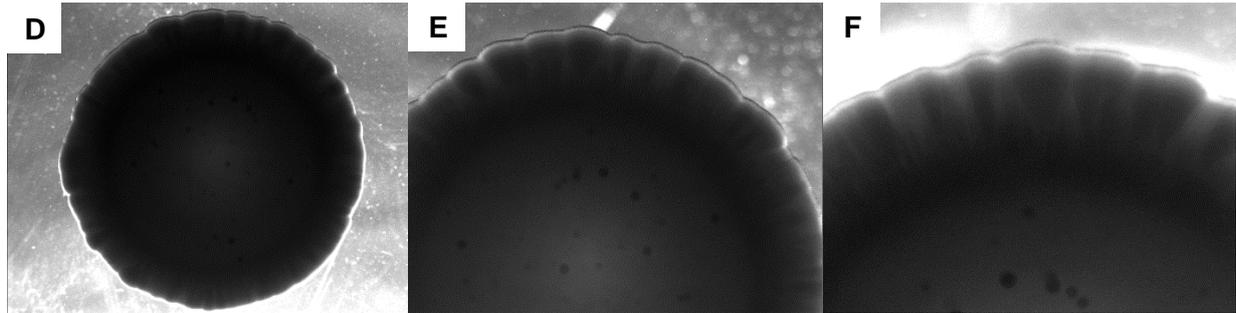


Fig. 12 Estructuras de crecimiento de *S. cerevisiae Killer* ante el estrés generado por *P. aeruginosa* 1122 a los 8 días post experimento. Se muestra que las estructuras identificadas a las 24 hrs. en el spot de *S. cerevisiae Killer* son más largas y abundantes 8 días después. en comparación las que se observan en el spot control. Las condiciones del experimento fueron 10 mg de células en el spot de *S. cerevisiae Killer* sobre 5 mg de células de *P. aeruginosa* 1122 como césped, en medio de cultivo agar YPD. Para la obtención de estos resultados las cajas Petri con los experimentos y el control fueron resguardadas en el refrigerador a 4 °C durante 8 días después de la revisión de las 48 hrs., posterior al resguardo se tomaron estas fotografías y se registraron los datos obtenidos; **A)** Crecimiento y aumento de la cantidad de las estructuras alargadas identificadas a las 24hr., en el interior del spot de *S. cerevisiae Killer* 8 días después de la realización del experimento; **B)** Visualización con mayor detalle de las estructuras alargadas descritas en el la Fig. A; **C)** Acercamiento de la Fig. C; **D)** Spot control de *S. cerevisiae Killer*, identificando menor cantidad de las estructuras alargadas descritas en la Figura A; **E)** Acercamiento del spot de la Figura D; **E)** Doble acercamiento del spot de la Figura D.

7.3 Evaluación cualitativa del efecto de pH en caja

En los resultados que se obtuvieron para conocer el pH más favorable para cada una de las cepas de *P. aeruginosa*, observamos que a las 48 hrs. el crecimiento de la cepa 1122 es mayormente favorecido por el pH alcalino y neutro, pues podemos observar que en el pH 4.5 el crecimiento se desarrolla de forma puntiforme y no es homogéneo en toda el área de siembra (**Fig.13 A**), en el pH neutro como era de esperarse (son las condiciones generales de crecimiento para *Pseudomonas*), se obtiene un crecimiento homogéneo y es evidente la identificación de la producción de piocianina al virar el medio a tonalidades azules (**Fig.13 B**), y por último en el pH 10.5 además de tener un crecimiento bastante homogéneo y abundante, se genera una mayor concentración de piocianina en el medio, virándolo a color verde fluorescente (**Fig.13 C**); por el contrario, el crecimiento de la cepa 757 es mayormente favorecido por el pH ácido y neutro, pues podemos observar que en el pH 4.5 el crecimiento

es mucho más homogéneo que en el pH 10 (**Fig.13 D y E**), pues en este último además de que el crecimiento es puntiforme, es poco abundante; y como era de esperarse el pH neutro es el más óptimo para crecer esta bacteria en medio King A (**Fig.13 F**).

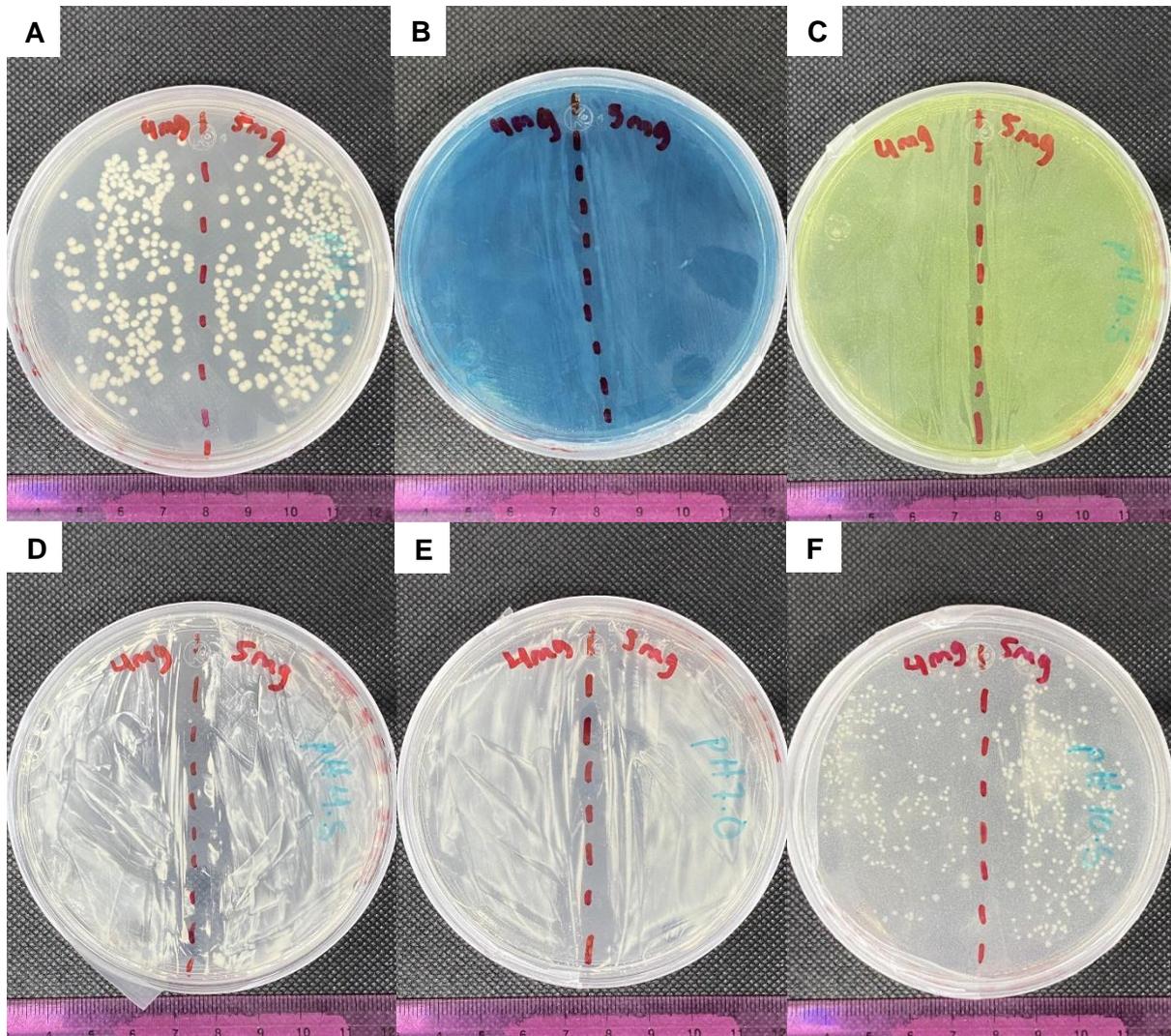


Fig. 13 Crecimiento de *P. aeruginosa* en medio de cultivo agar King A en diferentes pH. Ambas cepas de *P. aeruginosa* crecen de manera diferente siendo favorecidas por un pH ácido o alcalino según sea el caso; la cepa 1122 tiende a tener un crecimiento más abundante en un pH alcalino de 10.5 y la cepa 757 tiene un crecimiento más abundante en un pH ácido de 4.5; siendo el pH neutro una condición óptima para el crecimiento de ambas cepas de *P. aeruginosa*. De igual manera se identifica en el medio de cultivo agar King A que la cepa 1122 es productora de pirocianina y la 757 no. Las condiciones de cultivo fueron a 37 °C durante 48 hrs. **A)** *P. aeruginosa* 1122 sembrada en medio de cultivo agar King A pH 4.5; **B)** *P. aeruginosa* 1122 sembrada en medio de cultivo agar King A pH neutro; **C)** *P. aeruginosa* 1122 sembrada en medio de cultivo agar King A pH 10.5; **D)** *P. aeruginosa* 757 sembrada en medio de cultivo agar King A pH 4.5; **F)** *P. aeruginosa* 757 sembrada en medio de cultivo agar King A pH neutro; **G)** *P. aeruginosa* 757 sembrada en medio de cultivo agar King A pH 10.5.

Las colonias que crecieron en los distintos pH se observaron de igual manera en el microscopio MVX10 marca Olympus y se capturaron imágenes con una CCD XM10 Olympus. Las imágenes también se procesaron utilizando *software* de captura *Cells Sence* 2021 distribuido por Olympus. En primera instancia, se puede observar que la cepa 1122 de *P. aeruginosa*, en un pH ácido de 4.5 las colonias son muy uniformes, pequeñas y puntiformes y presentaban ligera fluorescencia (**Fig.14 A**); en cambio en un pH alcalino de 10.5 se observa que las colonias son más brillantes, de distinto tamaño y presentan un aspecto muy característico no observado en los demás pH (**Fig. 14 B**). Por otro lado, la cepa 757 presentaba una ligera fluorescencia (no mayor a la de la cepa 1122), y además las colonias crecidas en un pH alcalino de 10.5 (no siendo favorecido su crecimiento) crecieron de una forma muy singular, siendo característico únicamente de este pH y en esta cepa (**Fig. 14 C**).

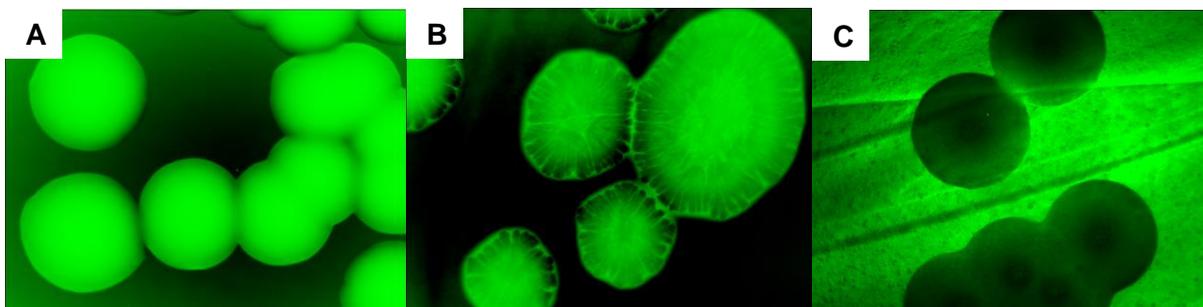


Fig. 14 Visualización microscópica de las colonias de *P. aeruginosa* que crecieron en medio King A en diferentes pH. Estas fotografías corresponden a las colonias que crecieron en la **Fig. 13** y muestran que el pH afecta a *P. aeruginosa* de manera diferente dependiendo la cepa. Es evidente que el pH alcalino de 10.5 afecta de alguna manera a *P. aeruginosa* 1122, pues cambia de manera muy notoria la morfología de sus colonias en comparación a las colonias que crecen en un pH de 4.5. Por otro lado, las colonias de ambas cepas muestran fluorescencia, sin embargo, únicamente la cepa 1122 indica que produce piocianina (por virar el medio de cultivo agar King A), por lo cual es muy probable que la cepa 757 produzca algún otro metabolito fluorescente. **A)** Colonias puntiformes de *P. aeruginosa* 1122 que crecieron en medio de cultivo King A pH 4.5; **B)** Colonias uniformes de *P. aeruginosa* 1122 que crecieron en medio de cultivo King A pH 10.5; **C)** Colonias puntiformes de *P. aeruginosa* 757 que crecieron en medio de cultivo King A pH 10.5.

7.4 Ensayos de inhibición en medio de cultivo líquido

Para poder estudiar de manera más precisa la inhibición que genera la toxina *K1* producida por *S. cerevisiae* *Killer* y los metabolitos citotóxicos que producen ambas cepas de *P.*

aeruginosa, se realizaron ensayos de inhibición en medio YPD líquido y King A líquido; esto con el objetivo de estudiar el efecto inhibitorio en condiciones de crecimiento que favorezcan a ambos microorganismos. Como se indicó en la metodología 6.4, se midió la absorbancia celular (a 600 nm) de cultivos inoculados con 3 mg de células de *S. cerevisiae* (*Killer* 42300 y sensible 5X47) y *P. aeruginosa* (cepa 1122 y 757) con concentraciones específicas de los sobrenadantes que contienen la toxina *K1* y los metabolitos citotóxicos de *P. aeruginosa*.

Los resultados obtenidos se presentan en boxplot; en el eje y se muestra la absorbancia celular (en nm) de cada tratamiento, y en el eje x la concentración de *K1* o metabolitos citotóxicos (según sea el caso) que se administró como tratamiento a los cultivos de *P. aeruginosa* y *S. cerevisiae*.

Para determinar la significancia estadística de los resultados se realizaron pruebas de t student, que comparan la absorbancia celular obtenida en cada tratamiento con la absorbancia celular que muestra el control; estos análisis estadísticos permiten describir si los tratamientos desarrollan una inhibición o una estimulación del crecimiento de cada microorganismo, dependiendo de la concentración de *K1* o metabolitos citotóxicos de *P. aeruginosa* que se haya administrado. Y finalmente para aumentar el poder estadístico de los resultados, se realizaron regresiones lineales y correlaciones, para poder establecer que existe una casualidad o una correlación entre la administración de los tratamientos con el efecto inhibitorio o la estimulación del crecimiento de *S. cerevisiae* y *P. aeruginosa*.

7.4.1 Toxina *K1* (Producida por *S. cerevisiae* *Killer*) puede afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122

En el boxplot de los resultados obtenidos de la medición de absorbancia celular a 600 nm en medio YPD, se observa que todas las concentraciones de *K1* desarrollan un aumento de la absorbancia celular de *P. aeruginosa*, sin embargo, los análisis estadísticos describen que únicamente las concentraciones de 1.0 y 100 mg de toxina *K1* estimulan de manera

significativa el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122 en medio YPD líquido, 48 hrs. después de adicionar la toxina al medio (**Fig. 15**). Las pruebas de t student demuestran con valores de p significativos ($p=0.04467^*$ y $p= 0.04112^*$), que la diferencia de absorbancia celular de los tratamientos es mayor que la absorbancia celular del control (**Tabla 1**); se debe tener en cuenta que los valores de p obtenidos se encuentran en el límite de significancia, por lo que se sugiere aumentar la cantidad de réplicas para obtener mayor poder estadístico.

Por otro lado, también se realizaron pruebas de correlación para evaluar si este aumento de absorbancia celular en los tratamientos podría correlacionarse a la adición de estas concentraciones de K1 específicamente; y como era de esperarse, los resultados reflejaron que las correlaciones son ligeramente significativas y positivas ($p= 0.51^*$ y $p= 0.55^*$), describiendo que sí se desarrolla un aumento de absorbancia celular (**Tabla 3**).

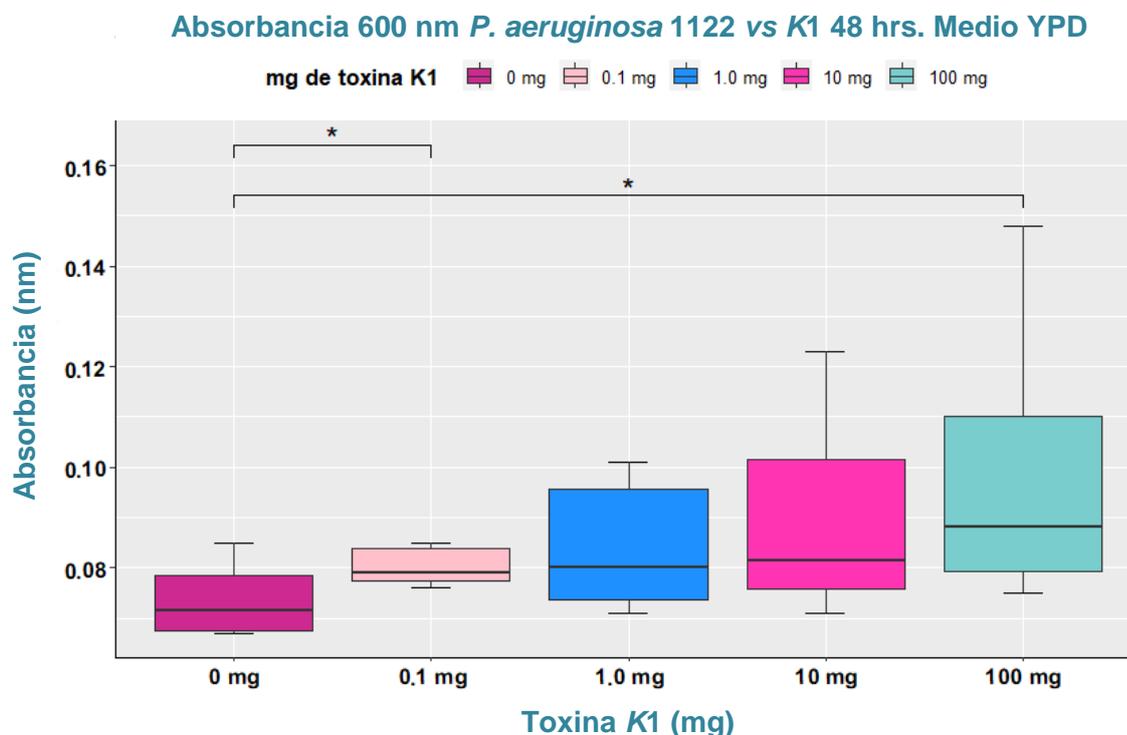


Fig. 15 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *P. aeruginosa* 1122 al adicionar K1 como tratamiento en medio de cultivo YPD líquido. Se muestran los resultados obtenidos en la medición de la absorbancia celular de *P. aeruginosa* 1122 como control (0 mg) y en cada cultivo con tratamiento de diferentes concentraciones de K1 (0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg y 100 mg). Todos los cultivos con y sin tratamiento fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. en agitación continua. La absorbancia celular se midió con el equipo *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*). Se realizaron seis réplicas de cada experimento para realizar los análisis estadísticos.

Tratamiento	Valores de p	Supuesto
YPD 0.1 mg K1	p= 0.04467*	“La absorbancia celular del tratamiento es ligeramente mayor que la absorbancia del control”
YPD 1.0 mg K1	p= 0.9358 p= 0.06416	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
YPD 10 mg K1	p= 0.9404 p= 0.0596	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
YPD 100 mg K1	p= 0.04112*	“La absorbancia celular del tratamiento es ligeramente mayor que la absorbancia del control”

Tabla 1 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las pruebas de t student realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina K1 (Producida por *S. cerevisiae Killer*) puede afectar el crecimiento de *P. aeruginosa 1122*”. Los resultados corresponden únicamente a los ensayos realizados en medio YPD. Se utilizó el programa R studio para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

Las pruebas de t student demuestran que en el medio King A la concentración de 10 mg de K1 desarrolla una disminución significativa de absorbancia celular ($p= 3.623e-07^{**}$), indicando que esta cantidad de toxina producida por *S. cerevisiae Killer* causa una inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa 1122*; sin embargo, aunque se esperaba que a mayor concentración de K1 hubiera mayor efecto inhibitorio; la concentración de 100 mg de K1 muestra ser no tan eficiente como lo es la concentración de 10 mg. (**Fig. 16**).

Por otra parte, la concentración de 0.1 mg de K1 genera un aumento ligeramente significativo de absorbancia celular con respecto al control ($p=0.03341^*$), indicando que 0.1 mg de K1 estimula un estrés en la bacteria, desarrollando así una respuesta para poder sobrevivir (**Tabla 2**). Y como era de esperarse, la concentración de 0.1 mg de K1 demuestra tener una correlación positiva ligeramente significativa ($p= 0.55^*$), y la concentración de 10 mg tiene una correlación muy significativa y negativa ($p= -0.96^{***}$); comprobando así la descripción del efecto que tienen estas concentraciones de K1 sobre el respectivo aumento e inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa 1122* (**Tabla 3**).

Absorbancia 600 nm *P. aeruginosa* 1122 vs K1 48 hrs. Medio King A

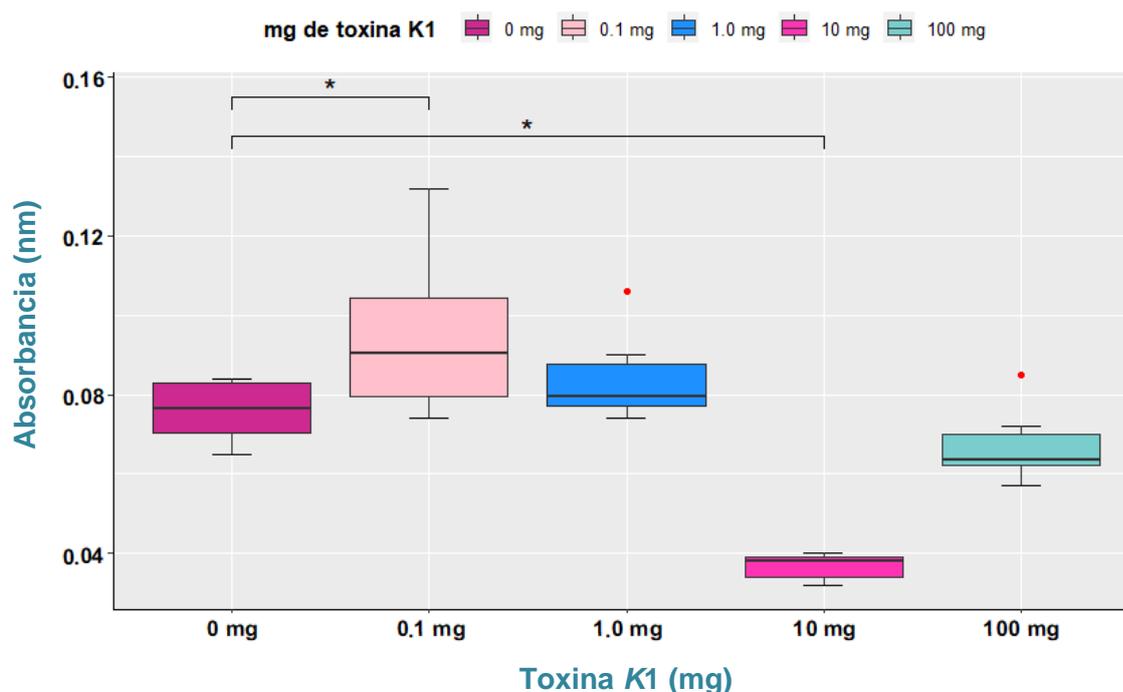


Fig. 16 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *P. aeruginosa* 1122 al adicionar K1 como tratamiento en medio de cultivo King A líquido. Se muestran los resultados obtenidos en la medición de la absorbancia celular de *P. aeruginosa* 1122 como control (0 mg) y en cada cultivo con tratamiento de diferentes concentraciones de K1 (0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg y 100 mg). Todos los cultivos con y sin tratamiento fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. en agitación continua. La absorbancia celular se midió con el equipo *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*). Se realizaron seis réplicas de cada experimento para realizar los análisis estadísticos.

Tratamiento	Valores de p	Supuesto
King A 0.1 mg K1	$p = 0.03341^*$	“La absorbancia celular del tratamiento es ligeramente mayor que la absorbancia del control”
King A 1.0 mg K1	$p = 0.9099$ $p = 0.09011$	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
King A 10 mg K1	$p = 3.623e-07^{**}$	“La absorbancia celular del tratamiento es menor que la absorbancia del control”
King A 100 mg K1	$p = 0.06518$ $p = 0.9348$	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”

Tabla 2 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo King A. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las pruebas de t student realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina K1 (Producida por *S. cerevisiae* Killer) puede afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122”. Los resultados corresponden únicamente a los ensayos realizados en medio King A. Se utilizó el programa *R studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

Tratamiento	Valores de p	Tipo de correlación
YPD 0.1 mg K1	p= 0.51*	Correlación positiva = Aumento de absorbancia
YPD 1.0 mg K1	p= 0.46	No hay correlación significativa
YPD 10 mg K1	p= 0.5	No hay correlación significativa
YPD 100 mg K1	p= 0.55*	Correlación positiva = Aumento de absorbancia
King A 0.1 mg K1	p= 0.55*	Correlación positiva = Aumento de absorbancia
King A 1.0 mg K1	p= 0.41	No hay correlación significativa
King A 10 mg K1	p= -0.96 ***	Correlación negativa = Disminución de absorbancia
King A 100 mg K1	p= - 0.46	No hay correlación significativa

Tabla 3 Valores de p y el tipo de correlación que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las correlaciones realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina K1 (Producida por *S. cerevisiae* Killer) puede afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122”. Se utilizó el programa R *studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

7.4.2 Toxina K1 (Producida por *S. cerevisiae* Killer) puede afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* 757

La toxina K1 estimula e inhibe el crecimiento de *P. aeruginosa* 757 en medio de cultivo YPD. En el boxplot se puede observar que las concentraciones 0.1 y 1 mg de K1 estimulan el crecimiento de la bacteria, siendo la concentración de 10 mg de K1 una estimulación menor a la de las concentraciones antes mencionadas. La concentración de 100 mg de K1, es la única que muestra ser capaz de inhibir de manera significativa el crecimiento de *P. aeruginosa* 757 (Fig.17).

Aunque las concentraciones de 0.1 mg y 10 mg, K1 causan estrés sobre el cultivo de la bacteria estimulando su crecimiento, estas no son consideradas estadísticamente significativas en las pruebas de t student; únicamente la concentración de 1.0 mg de K1 genera un aumento de absorbancia celular significativa (p= 0.02417*). Por otro lado, la concentración de 100 mg de K1 muestra tener un efecto inhibitorio sobre la bacteria,

desarrollando una absorbancia celular menor con respecto al control, teniendo un valor de p significativo ($p= 0.02572^*$) (**Tabla 4**).

En el boxplot correspondiente a los resultados obtenidos en el medio de cultivo King A se puede apreciar que la toxina *K1* estimula el crecimiento de *P. aeruginosa* 757 en todas las concentraciones evaluadas, sin embargo, las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mg de *K1* desarrollan un crecimiento ligeramente por encima de la absorbancia celular del control (**Fig. 18**); siendo 100 mg de *K1* la concentración que mayor absorbancia celular desarrolla, mostrando así un valor significativo en las pruebas de t student ($p= 0.01899^*$) (**Tabla 5**).

Los análisis de regresión lineal comprueban que la concentración de 10 mg de *K1* en medio YPD sí puede estar causando el aumento de absorbancia que visualizamos en las pruebas t student ($p= 0.04834^*$), determinando que esta concentración de toxina *K1* sobre *P. aeruginosa* 757 estimula su crecimiento en este medio de cultivo. Sin embargo la concentración de 100 mg de *K1* no mostró tener un valor significativo ante la regresión lineal, por lo cual no podemos asegurar que el efecto de inhibición observado en el boxplot y en los resultados de las pruebas de t student se deba a esta concentración de toxina *K1*; pero hay que tener en cuenta que el valor de p es cercano a ser significativo ($p= 0.05144$), por lo cual sugerimos ampliar el número de réplicas para poder descartar si es o no una concentración que cause la inhibición observada en los experimentos (**Tabla 6**).

Las regresiones lineales realizadas con los resultados del medio King A, nos comprueban que la única concentración de *K1* que estimula significativamente el crecimiento de *P. aeruginosa* 757 es la de 100 mg ($p= 0.03799^*$); pues, aunque todas las demás concentraciones evaluadas en este medio de cultivo muestran estimular el crecimiento de la bacteria, su efecto es mínimo y no significativo (**Tabla 6**).

Absorbancia 600 nm *P. aeruginosa* 757 vs K1 48 hrs. Medio YPD

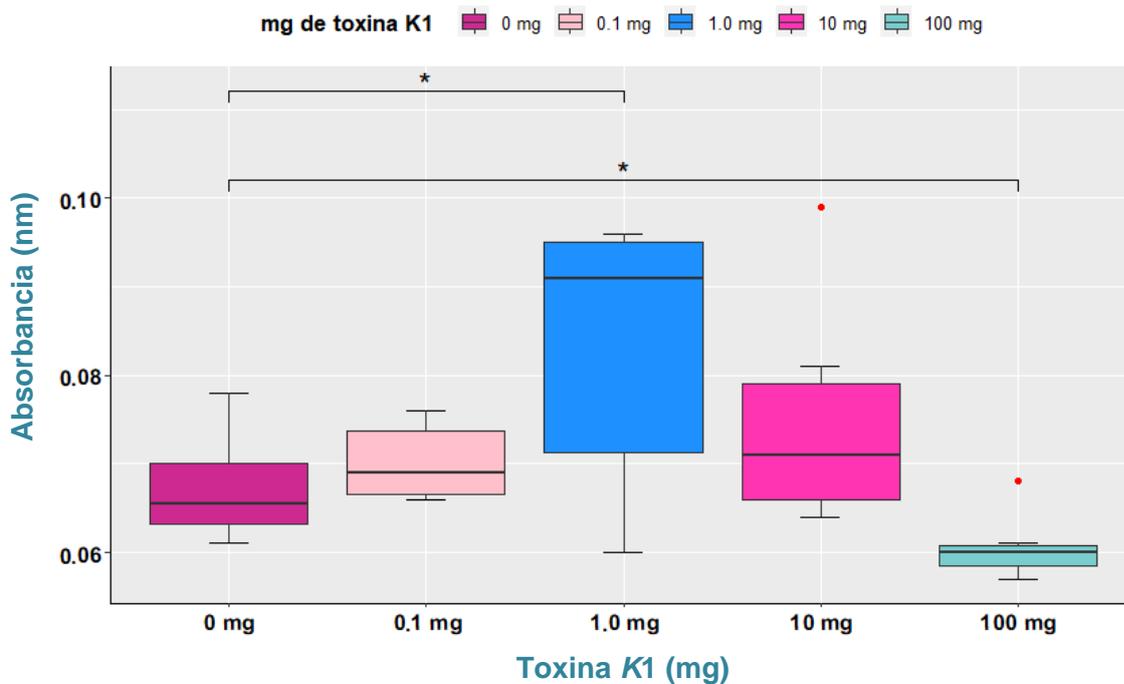


Fig. 17 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *P. aeruginosa* 757 al adicionar K1 como tratamiento en medio de cultivo YPD. Se muestran los resultados obtenidos en la medición de la absorbancia celular de *P. aeruginosa* 757 como control (0 mg) y en cada cultivo con tratamiento de diferentes concentraciones de K1 (0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg y 100 mg). Todos los cultivos con y sin tratamiento fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. en agitación continua. La absorbancia celular se midió con el equipo *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*). Se realizaron seis réplicas de cada experimento para realizar los análisis estadísticos.

Tratamiento	Valores de p	Supuesto
YPD 0.1 mg K1	$p= 0.8066$ $p= 0.1934$	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
YPD 1.0 mg K1	$p= 0.02417^*$	“La absorbancia celular del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”
YPD 10 mg K1	$p= 0.8905$ $p= 0.1095$	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
YPD 100 mg K1	$p= 0.02572^*$	“La absorbancia celular del tratamiento es menor que la absorbancia del control”

Tabla 4 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las pruebas de t student realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina K1 (Producida por *S. cerevisiae* Killer) puede afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* 757”. Los resultados corresponden únicamente a los ensayos realizados en medio YPD. Se utilizó el programa *R studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

Absorbancia 600 nm *P. aeruginosa* 757 vs K1 48 hrs. Medio King A

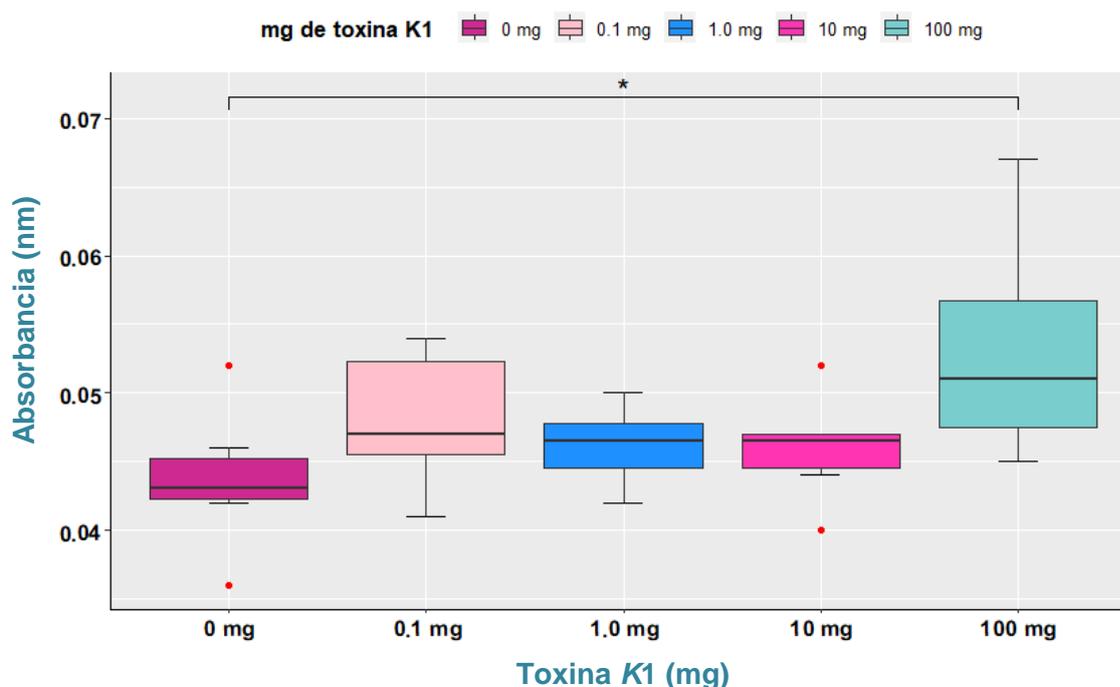


Fig. 18 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *P. aeruginosa* 757 al adicionar K1 como tratamiento en medio de cultivo King A líquido. Se muestran los resultados obtenidos en la medición de la absorbancia celular de *P. aeruginosa* 757 como control (0 mg) y en cada cultivo con tratamiento de diferentes concentraciones de K1 (0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg y 100 mg). Todos los cultivos con y sin tratamiento fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. en agitación continua. La absorbancia celular se midió con el equipo *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*). Se realizaron seis réplicas de cada experimento para realizar los análisis estadísticos.

Tratamiento	Valores de p	Supuesto
King A 0.1 mg K1	$p= 0.9106$ $p= 0.08936$	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
King A 1.0 mg K1	$p= 0.8354$ $p= 0.1646$	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
King A 10 mg K1	$p= 0.7979$ $p= 0.2021$	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
King A 100 mg K1	$p= 0.01899^*$	“La absorbancia celular del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”

Tabla 5 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo King A. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las pruebas de t student realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina K1 (Producida por *S. cerevisiae* Killer) puede afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* 757”. Los resultados corresponden únicamente a los ensayos realizados en medio King A. Se utilizó el programa *R studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

Tratamiento	Valores de p	Tipo de regresión
YPD 0.1 mg K1	p= 0.3868	No hay regresión significativa
YPD 1.0 mg K1	p= 0.04834*	Regresión positiva = Aumento de absorbancia celular
YPD 10 mg K1	p= 0.219	No hay regresión significativa
YPD 100 mg K1	p= 0.05144	No hay regresión significativa
King A 0.1 mg K1	p= 0.1787	No hay regresión significativa
King A 1.0 mg K1	p= 0.3291	No hay regresión significativa
King A 10 mg K1	p= 0.4042	No hay regresión significativa
King A 100 mg K1	p= 0.03799 *	Regresión positiva = Aumento de absorbancia celular

Tabla 6 Valores de p y el tipo de regresión lineal que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las regresiones lineales realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina K1 (Producida por *S. cerevisiae* Killer) puede afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* 757”. Se utilizó el programa R *studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

7.4.3 Toxina TP 1122 (Producida por *P. aeruginosa* 1122) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* Killer

Por los resultados obtenidos, se puede determinar que los metabolitos citotóxicos de *P. aeruginosa* 1122, considerados en este trabajo como TP 1122 estimulan el crecimiento de *S. cerevisiae* Killer en ambos medios de cultivo utilizados. En medio de cultivo YPD líquido las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mg de TP 1122 hacen que la levadura aumente su tasa de crecimiento con respecto al control ($p= 1.32e-06^{**}$, $p= 9.009e-06^{**}$, $p= 2.561e-06^{**}$) (**Fig. 19**); sin embargo es muy importante observar que aunque las pruebas de t student efectivamente comprueban que existe un crecimiento mayor en comparación al del el control, este crecimiento disminuye ligeramente con forme se aumenta la concentración de TP 1122, pues como podemos ver en el boxplot, la concentración de 100 mg de TP 1122 desarrolla una absorbancia cular de *S. cerevisiae* muy similar al del control (**Tabla 7**). Con esto, se sugiere que se evalúen mayores concentraciones de TP 1122 como tratamiento, para ver si

en una concentración mayor a 100 mg causa una disminución significativa con respecto al control, pues el valor de p obtenido en las pruebas de t student nos dice que este efecto inhibitorio causado por los 100 mg de toxina, no es un efecto significativo estadísticamente.

En medio de cultivo King A líquido se ve de igual manera que TP 1122 estimula el crecimiento de la levadura, sin embargo el efecto es significativo solo en las concentraciones de 10 y 100 mg de TP 1122 ($p= 5.134e-05$ ***, $p= 0.0117^*$) (**Tabla 8**); aquí cabe remarcar que se observa en el boxplot que el estrés generado por la toxina sobre la levadura es incrementado conforme se aumenta la concentración de toxina, siendo la concentración de 10 mg la que genera mayor estrés, y por ende la que causa un mayor incremento en el crecimiento de *S. cerevisiae Killer* (**Fig. 20**). La concentración de 100 mg también desarrolla un incremento del desarrollo de la levadura, sin embargo, este crecimiento ya es menor al que se obtuvo con la concentración de 10 mg; esto sugiere que de igual manera como en el medio YPD, concentraciones mayores a 100 mg de TP 1122 pueden ya generar un posible efecto inhibitorio sobre *S. cerevisiae Killer*.

Absorbancia 600 nm *S.c Killer* vs TP 1122 48 hrs. Medio YPD

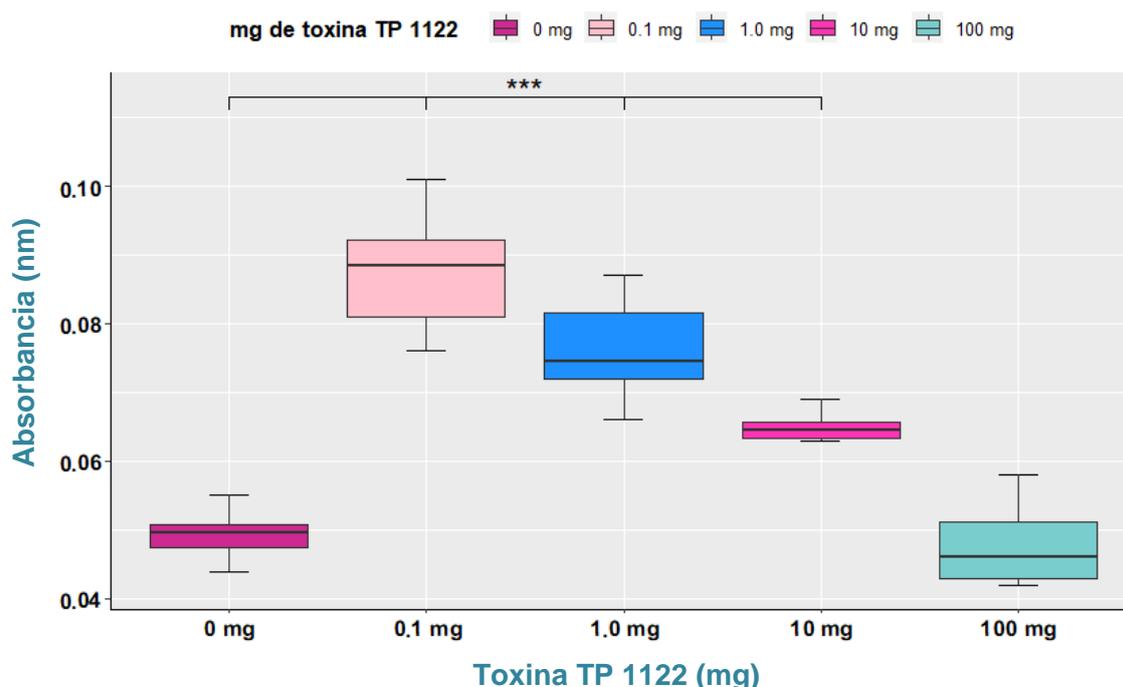


Fig. 19 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *S. cerevisiae Killer* al adicionar TP 1122 (producida por *P. aeruginosa* 1122) como tratamiento en medio de cultivo YPD líquido. Se muestran los resultados obtenidos en la medición de la absorbancia celular de *S. cerevisiae Killer* como control (0 mg) y en cada cultivo con tratamiento de diferentes concentraciones de TP 1122 (0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg y 100 mg). Todos los cultivos con y sin tratamiento fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. en agitación continua. La absorbancia celular se midió con el equipo *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*). Se realizaron seis réplicas de cada experimento para realizar los análisis estadísticos.

Tratamiento	Valores de p	Supuesto
YPD 0.1 mg K1	p= 1.32e-06**	“La absorbancia celular del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”
YPD 1.0 mg K1	p= 9.009e-06**	“La absorbancia celular del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”
YPD 10 mg K1	p= 2.561e-06**	“La absorbancia celular del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”
YPD 100 mg K1	p= 0.3146 p= 0.6854	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”

Tabla 7 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las pruebas de t student realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina TP 1122 (Producida por *P. aeruginosa* 1122) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae Killer*”. Los resultados corresponden únicamente a los ensayos realizados en medio de cultivo YPD líquido. Se utilizó el programa *R studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

Absorbancia 600 nm *S.c Killer* vs TP 1122 48 hrs. Medio King A

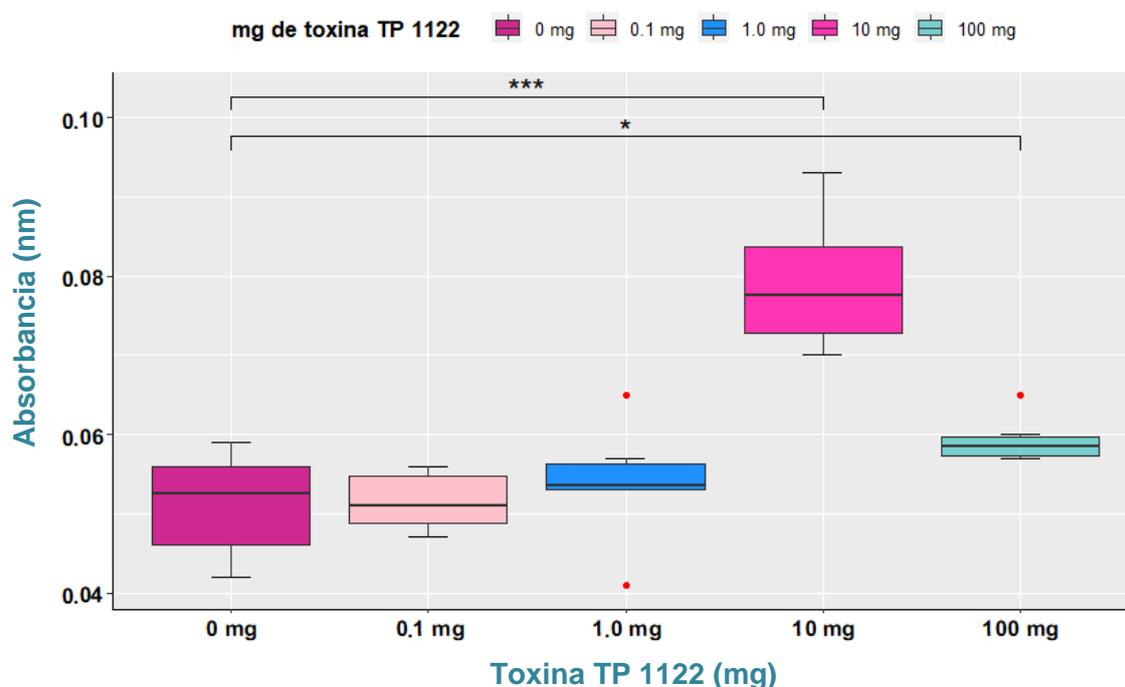


Fig. 20 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *S. cerevisiae Killer* al adicionar TP 1122 (producida por *P. aeruginosa* 1122) como tratamiento en medio de cultivo King A líquido. Se muestran los resultados obtenidos en la medición de la absorbancia celular de *S. cerevisiae Killer* como control (0 mg) y en cada cultivo con tratamiento de diferentes concentraciones de TP 1122 (0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg y 100 mg). Todos los cultivos con y sin tratamiento fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. en agitación continua. La absorbancia celular se midió con el equipo *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*). Se realizaron seis réplicas de cada experimento para realizar los análisis estadísticos.

Tratamiento	Valores de p	Supuesto
King A 0.1 mg K1	p= 0.5404 p= 0.4596	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
King A 1.0 mg K1	p= 0.7289 p= 0.2711	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
King A 10 mg K1	p= 5.134e-05 ***	“La absorbancia celular del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”
King A 100 mg K1	p= 0.0117*	“La absorbancia celular del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”

Tabla 8 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo King A. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las pruebas de t student realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina TP 1122 (Producida por *P. aeruginosa* 1122) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae Killer*”. Los resultados corresponden únicamente a los ensayos realizados en medio King A líquido. Se utilizó el programa *R studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

Se realizaron regresiones lineales para comprobar la causalidad de los efectos del aumento de absorbancia observados en los boxplot y en las pruebas de t student; los valores de p de las regresiones lineales comprueban que las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mg de TP 1122 en medio YPD ($p= 2.639e-06$ ***, $1.802e-05$ ***, $p= 5.122e-06$ ***) causan de manera significativa un aumento del crecimiento de *S. cerevisiae Killer* y que las concentraciones de 10 y 100 mg de esta misma toxina causan el mismo efecto en medio King A ($p= 0.0001027$ **, $p= 0.0234$ *) (Tabla 9).

Tratamiento	Valores de p	Tipo de regresión
YPD 0.1 mg K1	$p= 2.639e-06$ ***	Regresión negativa = Disminución de absorbancia celular
YPD 1.0 mg K1	$p= 1.802e-05$ ***	Regresión negativa = Disminución de absorbancia celular
YPD 10 mg K1	$p= 5.122e-06$ ***	Regresión negativa = Disminución de absorbancia celular
YPD 100 mg K1	$p= 0.6292$	No hay regresión significativa
King A 0.1 mg K1	$p= 0.9192$	No hay regresión significativa
King A 1.0 mg K1	$p= 0.5421$	No hay regresión significativa
King A 10 mg K1	$p= 0.0001027$ **	Regresión positiva = Aumento de absorbancia celular
King A 100 mg K1	$p= 0.0234$ *	Regresión positiva = Aumento de absorbancia celular

Tabla 9 Valores de p y el tipo de regresión lineal que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las regresiones lineales realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina TP 1122 (Producida por *P. aeruginosa* 1122) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae Killer*”. Se utilizó el programa R *studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

7.4.4 Toxina TP 757 (Producida por *P. aeruginosa* 757) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae Killer*

Algunos resultados de absorbancia celular obtenidos en este experimento no tuvieron normalidad, por lo cual no se pudieron realizar los análisis estadísticos realizados en los

demás experimentos; sin embargo, se hizo un gráfico que nos permitiera observar en promedio los resultados de absorbancia celular obtenidos en cada tratamiento (**Fig. 21**).

En el gráfico podemos observar que en medio YPD la toxina TP 757 estimula el crecimiento de *S. cerevisiae Killer* en las concentraciones 0.1, 1.0 y 10 mg, siendo la concentración de 100 mg la única que desarrolla una absorbancia celular menor a la del control, demostrando un posible efecto inhibitorio; sin embargo se tendrían que hacer más replicas del experimento para que los datos puedan tener normalidad y así se puedan realizar análisis estadísticos que nos permitan considerar si el efecto observado es significativo o no.

Por otro lado, en el medio King A la toxina TP 757 desarrolla en todas sus concentraciones una ligera disminución de la absorbancia celular con respecto al control, sin embargo, no parece ser un efecto significativo; se tendrían que realizar de igual manera más replicas para poder realizar análisis estadísticos y determinar si este efecto observado es significativo o no.

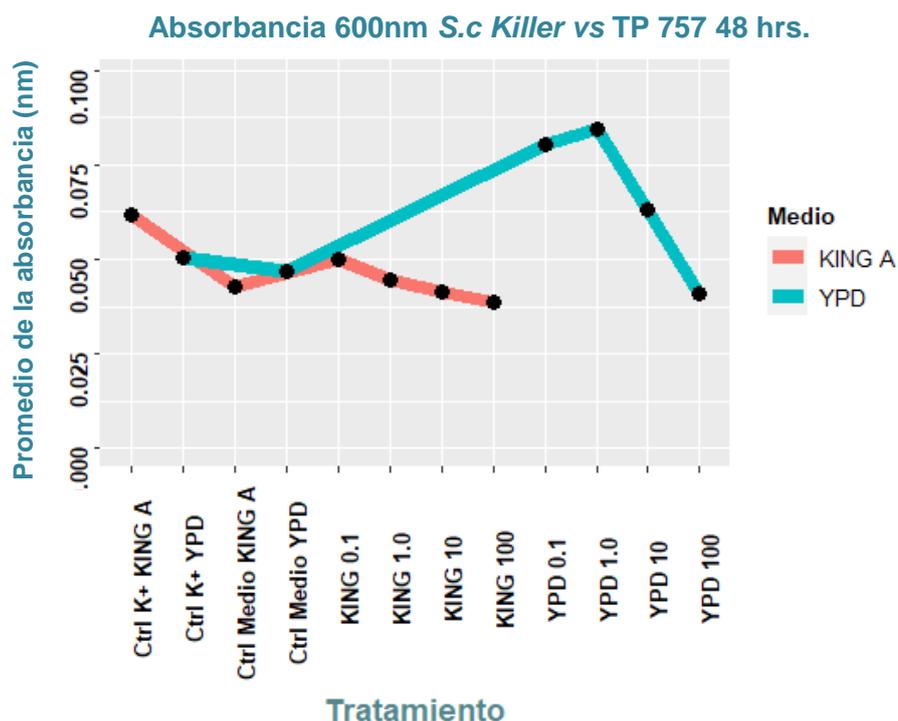


Fig. 21 Promedio de las mediciones de absorbancia celular (OD 600) de *S. cerevisiae Killer* al adicionar TP 757 (producida por *P. aeruginosa* 757) como tratamiento en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido. Se muestran los resultados obtenidos del promedio de la

medición de la absorbancia celular de *S. cerevisiae Killer* como control (0 mg) y en cada cultivo con tratamiento de diferentes concentraciones de TP 757 (0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg y 100 mg). Todos los cultivos con y sin tratamiento fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. en agitación continua. La absorbancia celular se midió con el equipo *Varioskan (Thermo Fisher Scientific)*. Se realizaron seis réplicas de cada experimento para realizar los análisis estadísticos.

7.4.5 Toxina TP 1122 (Producida por *P. aeruginosa* 1122) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible

Los metabolitos citotóxicos de *P. aeruginosa* 1122, considerados en esta investigación como TP 1122, muestran tener un efecto inhibitorio sobre *S. cerevisiae* sensible a una concentración de 100 mg en medio de cultivo YPD líquido (**Fig. 22**); siendo las concentraciones 0.1 y 1.0 mg únicamente estimulantes a un aumento de crecimiento de la levadura. Los resultados de las pruebas de t student confirman que el efecto de inhibición ($p= 0.000282^{***}$) y el estímulo del crecimiento ($p= 0.004008^{***}$, $p= 1.016e-05^{***}$) antes mencionados son significativos (**Tabla 10**); la concentración de 10 mg refleja no causar un aumento ni una disminución significativa de la absorbancia celular de *S. cerevisiae* sensible. Dicho esto, se puede concluir que la toxina TP 1122 en concentraciones bajas genera un estrés sobre la levadura, siendo 100 mg una concentración óptima para causar una inhibición.

El comportamiento de resistencia que tiene *S. cerevisiae* sensible y *S. cerevisiae Killer* ante la toxina TP 1122 es muy similar, pues se observa que TP 1122 en medio de cultivo YPD líquido a una concentración de 100 mg causa inhibición sobre *S. cerevisiae* sensible y una posible inhibición sobre *S. cerevisiae Killer*, siendo las demás concentraciones únicamente estimulantes al crecimiento por el estrés que generan; con esto se concluye que *S. cerevisiae Killer* tiene mayor resistencia poblacional ante el efecto citotóxico que tiene la toxina TP 1122.

Absorbancia 600 nm S.c sensible vs TP 1122 48 hrs. Medio YPD

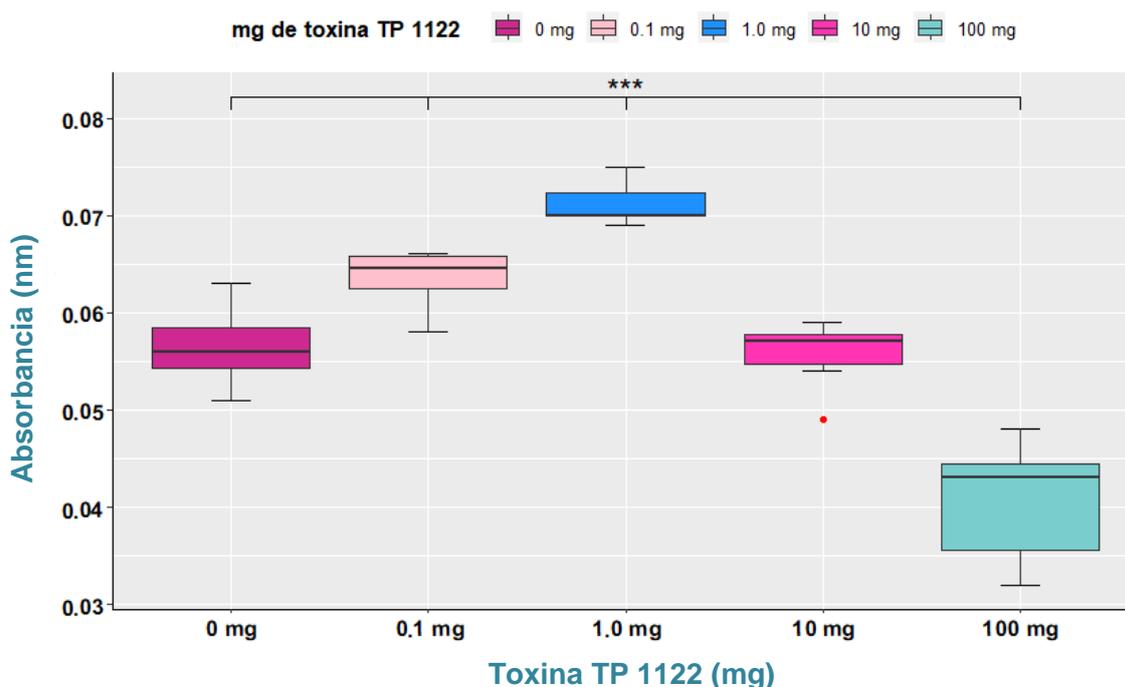


Fig. 22 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *S. cerevisiae* sensible al adicionar TP 1122 (producida por *P. aeruginosa* 1122) como tratamiento en medio de cultivo YPD líquido. Se muestran los resultados obtenidos en la medición de la absorbancia celular de *S. cerevisiae* sensible como control (0 mg) y en cada cultivo con tratamiento de diferentes concentraciones de TP 1122 (0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg y 100 mg). Todos los cultivos con y sin tratamiento fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. en agitación continua. La absorbancia celular se midió con el equipo *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*). Se realizaron seis réplicas de cada experimento para realizar los análisis estadísticos.

Tratamiento	Valores de p	Supuesto
YPD 0.1 mg K1	p= 0.004008***	“La absorbancia del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”
YPD 1.0 mg K1	p= 1.016e-05***	“La absorbancia del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”
YPD 10 mg K1	p= 0.3607 p= 0.6393	“La absorbancia del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
YPD 100 mg K1	p= 0.000282***	“La absorbancia del tratamiento es menor que la absorbancia del control”

Tabla 10 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las pruebas de t student realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina TP 1122 (Producida por *P. aeruginosa* 1122) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible”. Los resultados corresponden únicamente a los ensayos realizados en medio YPD. Se utilizó el programa *R studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

En medio de cultivo King A líquido, la toxina TP 1122 únicamente estimula el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible, sin embargo, se observa que las concentraciones de 10 y 100 mg desarrollan un aumento de absorbancia menor que las primeras concentraciones, por lo cual es posible que, si se sigue aumentando la concentración de TP 1122, pudiera desarrollarse un efecto inhibitorio (**Fig. 23**). Las pruebas de t student demuestran que todas las concentraciones de TP 1122 estimulan el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible de manera significativa ($p= 0.008917^{**}$, $p= 2.982e-05^{**}$, $p= 0.0004922^{**}$, $p= 0.00573^{**}$), aun cuando la absorbancia celular de 10 y 100 mg es menor que las primeras concentraciones (**Tabla 11**). Cabe mencionar que la respuesta de *S. cerevisiae* sensible observada en estos resultados, son muy similares a la respuesta que tiene *S. cerevisiae* Killer (**Fig. 20**).

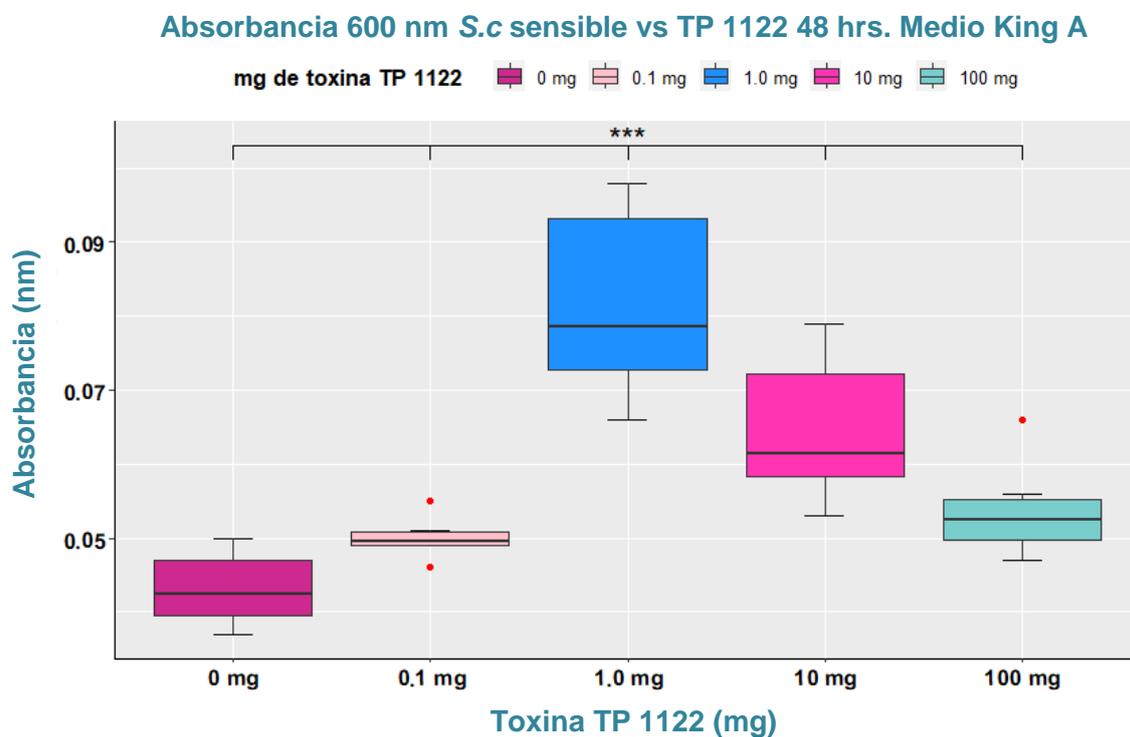


Fig. 23 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *S. cerevisiae* sensible al adicionar TP 1122 (producida por *P. aeruginosa* 1122) como tratamiento en medio de cultivo King A líquido. Se muestran los resultados obtenidos en la medición de la absorbancia celular de *S. cerevisiae* sensible como control (0 mg) y en cada cultivo con tratamiento de diferentes concentraciones de TP 1122 (0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg y 100 mg). Todos los cultivos con y sin tratamiento fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. en agitación continua. La absorbancia celular se midió con el equipo *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*). Se realizaron seis réplicas de cada experimento para realizar los análisis estadísticos.

Tratamiento	Valores de p	Supuesto
King A 0.1 mg K1	p= 0.008917 **	“La absorbancia del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”
King A 1.0 mg K1	p= 2.982e-05 **	“La absorbancia del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”
King A 10 mg K1	p= 0.0004922 **	“La absorbancia del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”
King A 100 mg K1	p= 0.00573**	“La absorbancia del tratamiento es mayor que la absorbancia del control”

Tabla 11 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo King A. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las pruebas de t student realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina TP 1122 (Producida por *P. aeruginosa* 1122) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible”. Los resultados corresponden únicamente a los ensayos realizados en medio King A. Se utilizó el programa R *studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

Tratamiento	Valores de p	Tipo de regresión
YPD 0.1 mg K1	p= 0.008016***	Regresión positiva = Aumento de absorbancia
YPD 1.0 mg K1	p= 2.033e-05***	Regresión positiva = Aumento de absorbancia
YPD 10 mg K1	p= 0.7214	No hay regresión significativa
YPD 100 mg K1	p= 0.0005641 **	Regresión negativa = Disminución de absorbancia
King A 0.1 mg K1	p= 0.01783*	Regresión positiva = Aumento de absorbancia
King A 1.0 mg K1	p= 5.964e-05***	Regresión positiva = Aumento de absorbancia
King A 10 mg K1	p= 0.0009844**	Regresión positiva = Aumento de absorbancia
King A 100 mg K1	p= 0.01146*	Regresión positiva = Aumento de absorbancia

Tabla 12 Valores de p y el tipo de regresión lineal que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las regresiones lineales realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina TP 1122 (Producida por *P. aeruginosa* 1122) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible”. Se utilizó el programa R *studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

Finalmente, los análisis de regresión lineal confirman con todos los valores de p significativos (**Tabla 12**), que la estimulación del crecimiento celular de *S. cerevisiae* sensible en medio

YPD y King A son causados por el estrés que le genera la toxina TP 1122; también el efecto inhibitorio generado por la concentración de 100 mg de TP 1122 en medio de cultivo YPD líquido es causado por la misma razón.

7.4.6 Toxina TP 757 (Producida por *P. aeruginosa* 757 puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible)

Los resultados obtenidos en la absorbancia celular nos indican que la toxina TP 757 no causa un estrés sobre *S. cerevisiae* sensible en medio King A y YPD a excepción de una concentración en este último medio (**Fig. 24y 25**); pues no se observa que esta toxina desarrolle un incremento o una disminución de la absorbancia celular con respecto al control en medio King A y YPD; únicamente la concentración de 100 mg de TP 757 en medio YPD muestra un valor de p significativo en las pruebas de t student, indicando que esta concentración desarrolla una disminución significativa de la absorbancia celular ($p= 0.007351$ ***) (**Tabla 13 y 14**).

Aun cuando no se tuvieron valores de p significativos en las pruebas de t student en el resto de los tratamientos, se realizaron análisis de regresión lineal y correlación, para confirmar que la adición de 100 mg de TP 757 sí causa la disminución de absorbancia celular observada en las pruebas de t student y el boxplot. Y como era de esperarse, el valor de p de la regresión lineal del tratamiento de 100 mg de TP 757 es significativo y muestra una regresión lineal negativa ($p= 0.0147^*$) (**Tabla 15**).

Es importante tener en cuenta que la inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* sensible causado por 100 mg de TP 757 es menor que la inhibición generada por 100 mg de TP 1122. Comparando el efecto de estrés que genera TP 757 con el que genera la toxina TP 1122, podemos determinar que los metabolitos citotóxicos que componen TP 1122 (producidos por *P. aeruginosa* 1122) son mucho más eficientes para causarle un mayor estrés y efecto inhibitorio a *S. cerevisiae* sensible en comparación con la TP 757.

Absorbancia 600 nm S.c sensible vs TP 757 48 hrs. Medio YPD

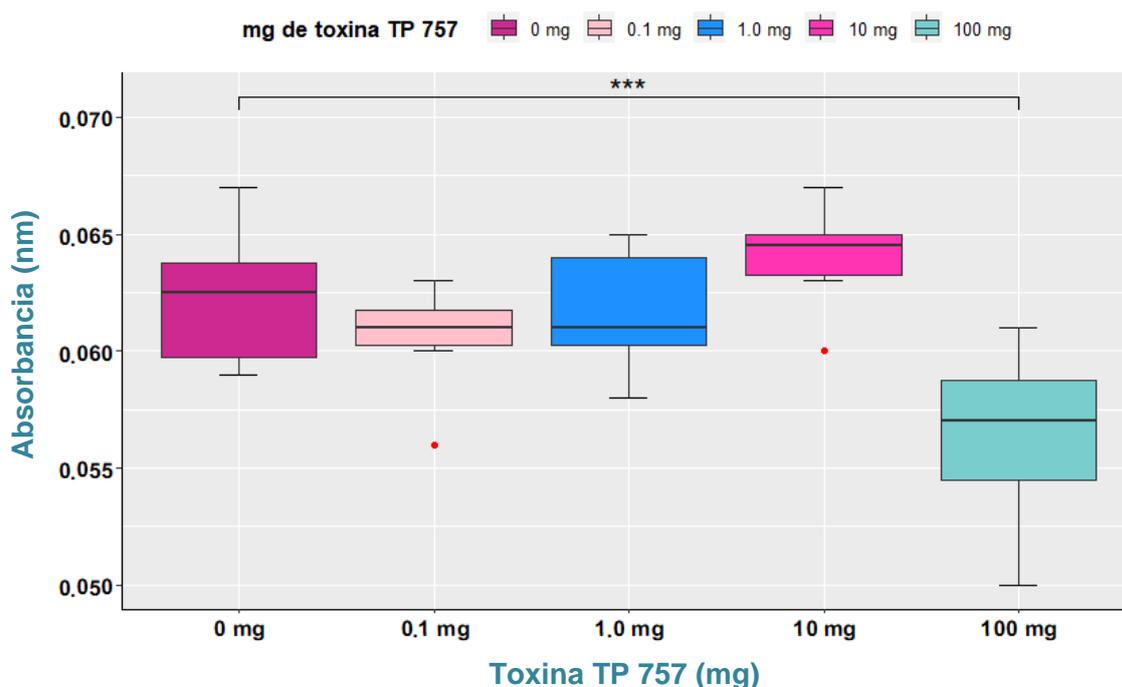


Fig. 24 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *S. cerevisiae* sensible al adicionar TP 757 (producida por *P. aeruginosa* 757) como tratamiento en medio de cultivo YPD líquido. Se muestran los resultados obtenidos en la medición de la absorbancia celular de *S. cerevisiae* sensible como control (0 mg) y en cada cultivo con tratamiento de diferentes concentraciones de TP 757 (0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg y 100 mg). Todos los cultivos con y sin tratamiento fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. en agitación continua. La absorbancia celular se midió con el equipo *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*). Se realizaron seis réplicas de cada experimento para realizar los análisis estadísticos.

Tratamiento	Valores de p	Supuesto
YPD 0.1 mg K1	p= 0.1393 p= 0.8607	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
YPD 1.0 mg K1	p= 0.3516 p= 0.6484	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
YPD 10 mg K1	p= 0.8412 p= 0.1588	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
YPD 100 mg K1	p= 0.007351 ***	“La absorbancia celular del tratamiento es menor que la absorbancia del control”

Tabla 13 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las pruebas de t student realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina TP 757 (Producida por *P. aeruginosa* 757 puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible”. Los resultados corresponden únicamente a los ensayos realizados en medio YPD. Se utilizó el programa *R studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

Absorbancia 600 nm S.c sensible vs TP 757 48 hrs. Medio King A

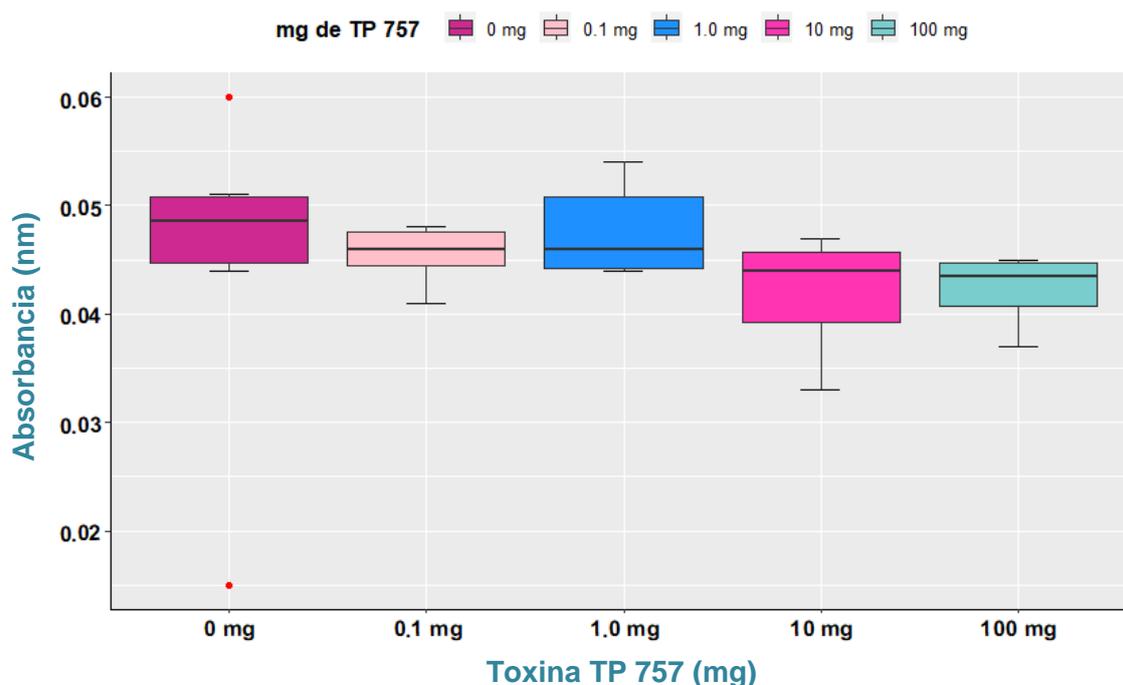


Fig. 25 Boxplot de la absorbancia celular (OD 600) de *S. cerevisiae* sensible al adicionar TP 757 (producida por *P. aeruginosa* 757) como tratamiento en medio de cultivo King A líquido. Se muestran los resultados obtenidos en la medición de la absorbancia celular de *S. cerevisiae* sensible como control (0 mg) y en cada cultivo con tratamiento de diferentes concentraciones de TP 757 (0.1 mg, 1.0 mg, 10 mg y 100 mg). Todos los cultivos con y sin tratamiento fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. en agitación continua. La absorbancia celular se midió con el equipo *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*). Se realizaron seis réplicas de cada experimento para realizar los análisis estadísticos.

Tratamiento	Valores de p	Supuesto
King A 0.1 mg K1	p= 0.5593 p= 0.4407	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
King A 1.0 mg K1	p= 0.677 p= 0.323	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
King A 10 mg K1	p= 0.3603 p= 0.6397	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”
King A 100 mg K1	p= 0.3744 p= 0.6256	“La absorbancia celular del tratamiento no es menor ni mayor que la absorbancia del control”

Tabla 14 Valores de p y el supuesto de la prueba de t student que cumplen los tratamientos en medio de cultivo King A. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las pruebas de t student realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido “Toxina TP 757 (Producida por *P. aeruginosa* 757 puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible”. Los resultados corresponden únicamente a los ensayos realizados en medio King A. Se utilizó el programa *R studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

Tratamiento	Valores de p	Tipo de regresión / correlación
YPD 0.1 mg K1	P=0.2786	No hay regresión significativa
YPD 1.0 mg K1	p= 0.7031	No hay regresión significativa
YPD 10 mg K1	p= 0.3177	No hay regresión significativa
YPD 100 mg K1	p= 0.0147*	Correlación negativa = Disminución de absorbancia
King A 0.1 mg K1	p= -0.049	No hay correlación significativa
King A 1.0 mg K1	p= 0.15	No hay correlación significativa
King A 10 mg K1	p= -0.12	No hay correlación significativa
King A 100 mg K1	p= -0.11	No hay correlación significativa

Tabla 15 Valores de p y el tipo de regresión lineal y correlación que cumplen los tratamientos en medio de cultivo YPD líquido y King A líquido. Se muestran los resultados estadísticos obtenidos en las regresiones lineales y correlaciones realizadas para el ensayo de inhibición en medio líquido "Toxina TP 757 (Producida por *P. aeruginosa* 757) puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible". Se utilizó el programa *R studio* para realizar el análisis estadístico y la obtención de estos datos.

7.5 Evaluación cualitativa del efecto de pH que puede generar *S. cerevisiae* sensible en medio de cultivo líquido

Los resultados preliminares que obtuvimos fueron que células de *S. cerevisiae* sensible sí tienen la capacidad de cambiar el pH del medio en donde se desarrolla la competencia con *P. aeruginosa*; pero la respuesta del cambio de pH es distinta con cada una de las cepas evaluadas (**Tabla 34**).

Las tiras reactivas de pH nos indican que el cultivo en donde se desarrolla la competencia entre *S. cerevisiae* sensible y *P. aeruginosa* 1122 se acidifica si se desarrolla en medio YPD, pues el control de *P. aeruginosa* 1122 en este medio presenta un pH de 9, y al adicionar la levadura, cambia su pH a 8. Sin embargo, en medio King A, se observa que hay un proceso de alcalinización, pues el control en este medio tiene un pH de 5 y al adicionar a la levadura cambia a un pH 8. Al comparar estos resultados con los obtenidos en la evaluación cualitativa

del efecto de pH en caja, se puede esperar que en medio YPD el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122 en competencia con *S. cerevisiae* sensible, sería afectado; sin embargo, en medio King A se beneficiaría, aumentando el crecimiento y la producción de piocianina.

Por otro lado, *S. cerevisiae* sensible en competencia con *P. aeruginosa* 757 parece acidificar el medio tanto en medio YPD como en King A, siendo ligeramente mayor el efecto de acidificación en medio King A. Al comparar estos resultados con la evaluación cualitativa del efecto de pH en caja, podemos sugerir que el crecimiento de *P. aeruginosa* 757 sería beneficiado con este proceso de acidificación del medio.

Cepa	Medio YPD	Medio King A
<i>P. aeruginosa</i> 1122	Acidificación (pH 9 – pH8)	Alcalinización (pH 5 – pH8)
<i>P. aeruginosa</i> 757	Acidificación (pH 7 – pH6)	Acidificación (pH 8.5 – pH7)

Tabla 16 Cambios de pH en medio de cultivo YPD y King A. Se muestran los resultados obtenidos de la medición y comparación del pH de los ensayos de inhibición en medio líquido utilizando 3 mg de *P. aeruginosa* y 100 mg de *S. cerevisiae* sensible. Se realizó la medición de pH con tiras reactivas, 48 hrs. después de haber realizado los ensayos en medio líquido. Las condiciones de incubación fueron a 37 °C y se utilizó el medio de cultivo YPD líquido y King A líquido.

8. Discusión

Hasta ahora no se han reportado artículos que hayan puesto a prueba la competencia entre *P. aeruginosa* y *S. cerevisiae* Killer, sin embargo, los resultados que se obtuvieron en esta investigación pueden compararse con investigaciones similares que se han realizado en cada uno de estos microorganismos de manera individual y en competencia con otras bacterias y levaduras. Es por esta razón que a continuación se ponen en contexto algunos experimentos que se asemejan y que pudieran discutirse con base a los resultados obtenidos en esta tesis.

Los halos de inhibición que se obtuvieron en los experimentos en placa nos confirman que sí se desarrolla antagonismo entre las dos cepas de *P. aeruginosa* y las dos levaduras utilizadas; teniendo resultados muy particulares en la observación microscópica de los cultivos.

En un estudio se aislaron 28 cepas de *S. cerevisiae* de una digestión *in vitro* de leche fermentada de kéfir; posteriormente evaluaron la actividad antagónica que tenían estas levaduras frente a diferentes patógenos, incluyendo *P. aeruginosa* ATCC27853. Utilizando el método *spot-on-the-lawn* colocaron 5 µl del cultivo selectivo de *S. cerevisiae* sobre 7 ml de agar BHI blando sembrado con la cepa indicadora; y en sus resultados obtuvieron que el 28% de las cepas de *S. cerevisiae* obtenidas de su cultivo, tienen una actividad antagónica óptima sobre esta bacteria, generando halos de inhibición sobre sus placas de cultivo 24 hrs. después de adicionar la cepa indicadora (Falcao et al., 2017)

Otras investigaciones han demostrado que *S. cerevisiae* no solo afecta el crecimiento de *P. aeruginosa*, sino que también puede llegar a afectar la expresión de sus genes; Zahra DehghanZadeh y su equipo de trabajo en el 2021 utilizando el lisado y el sobrenadante de un cultivo de *S. cerevisiae* S₃ y técnicas de PCR en tiempo real, determinaron que los genes de elastasa (*lasB*) y proteasa alcalina (*apl*) que son dos de los principales factores de virulencia de *P. aeruginosa*, son afectados en su expresión; utilizaron un cultivo de *P. aeruginosa* PAO1 como modelo de estudio. En sus resultados reportan que el sobrenadante del cultivo de *S. cerevisiae* S₃ disminuye la expresión del gen *apl*, sin embargo, a su vez aumenta la expresión del gen *lasB*; también observaron que el extracto del lisado del cultivo de *S. cerevisiae* S₃ disminuye la expresión de ambos genes (Dehghanzadeh et al., 2021).

Comparando los resultados obtenidos en la microscopía, se sugiere que *P. aeruginosa* también puede ser afectada en los genes que se relacionan con la forma en que esta bacteria desarrolla su crecimiento.

Se ha reportado que *P. aeruginosa* tiene la capacidad de desarrollar *swarming*, mecanismo que se relaciona con la formación de biopelículas. En una investigación sobre autólisis y auto agregación de células de *P. aeruginosa* se describe que una proteína reguladora *WspR* se

vincula con la codificación de adhesinas fimbriales necesarias para la formación de biopelículas en *Pseudomonas fluorescens* y que homólogos de este regulador pueden regular fimbrias agregativas y exopolisacáridos en diversas bacterias incluida *P. aeruginosa*; en este estudio utilizando mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 con inserciones en los homólogos de *WspR*, determinaron que estas inserciones hacen que *P. aeruginosa* no se propague por motilidad espasmódica y que forme colonias arrugadas y mucho más pequeñas que las colonias que desarrollaría *P. aeruginosa* WT (D'Argenio et al., 2002).

En los paneles A, B y D de la Fig. 11 que muestra los spots de *P. aeruginosa* 1122 en diferentes medios de cultivo sobre césped de *S. cerevisiae* Killer y *S. cerevisiae* sensible, podemos observar que la morfología de los spots es muy similar a los spots obtenidos en la investigación anteriormente descrita (Fig. 3), en la que muestra la mutante *wspF10* que no se propagó por ninguna de las dos formas de motilidad basada en flagelos en medios que favorecen el nado de la bacteria (D'Argenio et al., 2002).

La comparación de resultados en ambas investigaciones dan pauta a sugerir que la competencia *S. cerevisiae* Killer y sensible pudieran estar afectando negativamente algunos genes involucrados en el desarrollo de biopelículas de *P. aeruginosa*, impidiendo que se desarrolle de manera eficiente la biopelícula; sin embargo se tendrían que realizar más investigaciones y análisis de PCR para determinar qué genes están siendo afectados y en qué impacto, pues en la investigación donde realizan los mutantes, las colonias mutantes desarrolladas en medios donde no es favorecido el nado de las bacterias se desarrollan colonias sumamente arrugadas y sólidas, lo cual no sucede en esta investigación (una de las razones puede ser a que los medios de cultivo utilizados fueron totalmente distintos).

Se ha observado que hay diferentes parámetros que pueden hacer variar el efecto de *swarming*, como pueden ser el porcentaje de agar en el medio de cultivo utilizado, tiempo de

secado bajo la campana de flujo laminar, la temperatura de incubación y el pH (Tremblay & Déziel, 2008).

En una investigación se ha observado que *P. aeruginosa* tiene la capacidad de desarrollar un óptimo *swarming* en medios con pH entre 5 y 9, siendo disminuida su expansión a pH entre 3 y 4. También determinaron que la producción de biomasa en el *swarming* es máxima a un pH 5 pues comienza a disminuir al aumentar el pH tanto en medios líquidos como en agar. Por último, concluyen que la motilidad del *swarming* no solo puede maximizar la colonización bacteriana sobre la superficie, sino que también la producción de biomasa (Tremblay & Déziel, 2008).

En esta tesis se realizó solo una sola replica de los experimentos con céspedes de *S. cerevisiae* Killer y sensible sobre *spots* de *P. aeruginosa* 1122 en medios King A en diferentes pH, por ello se consideraron resultados únicamente preliminares; sin embargo, al desarrollar la discusión y tomar en cuenta los resultados de la investigación antes mencionada (Tremblay & Déziel, 2008), podemos corroborar que nuestros resultados son muy similares en cuanto a la formación y expansión del *swarming* de *P. aeruginosa* en pH ácido y neutro.

En la Fig. S11 se pudo ver que *P. aeruginosa* en pH neutro desarrolla de manera más eficiente el *swarming* a diferencia del que desarrolla en un pH de 4.5; siendo muy probablemente también el efecto de la levadura un factor que influye en el desarrollo del *swarming*, pues sobre el césped de *S. cerevisiae* sensible el *swarming* se desarrolla menos que con el césped de *S. cerevisiae* Killer. Con esto sugerimos realizar más experimentos sobre la competencia entre estos microorganismos, modificando el pH del medio para evaluar si así se puede obtener una disminución del *swarming* y un efecto inhibitorio más óptimo de manera correlacionada, afectándose así el desarrollo de la biopelícula de *P. aeruginosa*.

Por otro lado, los patrones y estructuras de crecimiento de *S. cerevisiae Killer* y sensible observadas en los *spots*, no se han reportado hasta ahora como una respuesta ante la competencia con *P. aeruginosa*, sin embargo, un artículo de revisión nos hace sugerir una hipótesis de lo que pudiera estar sucediendo (Ghose et al., 2022). En este artículo se describe que la orientación de la polaridad celular por gradientes químicos se basa en el quimiotropismo y la quimiotaxis. Estos mecanismos son desarrollados principalmente por proteínas Cdc42, las cuales se encuentran unidas covalentemente a lípidos hidrofóbicos y de forma activa son reconocidas por proteínas efectoras reclutadas en la región de polaridad, de esta manera se transduce Cdc42 en orientación del citoesqueleto hacia el frente, desencadenando la migración hacia una dirección específica (Ghose et al., 2022).

La orientación de la polaridad celular responde ante un gradiente químico externo mediante la detección de quimioatrayentes. Esta detección es llevada a cabo en la levadura mediante receptores acoplados a proteína G de superficie celular (GPCR); una vez activados con la unión del ligando, se cataliza la subunidad heterodimérica $G\alpha$ -GTP dando como resultado la separación de las sub unidades $G\beta\gamma$. Y finalmente estas subunidades en manera conjunta regulan la activación de Cdc42, desencadenando la polarización de las células de la levadura a través de la detección de los quimioatrayentes (Ghose et al., 2022).

Nuestra hipótesis es que algún metabolito presente en el sobrenadante del cultivo de *P. aeruginosa* 1122 puede llegar a interactuar sobre algún receptor acoplado a proteínas G de la levadura, dando pauta a la activación de Cdc42 y por ende al desarrollo de una polaridad celular que caracterice las estructuras y patrones de crecimiento que tiene *S. cerevisiae Killer* y sensible.

Los metabolitos citotóxicos del sobrenadante donde se cultiva *P. aeruginosa* muestran que pueden desarrollar una actividad antagónica sobre las mismas levaduras en condiciones específicas. Es importante considerar que estos experimentos necesitan estandarizarse

mucho más, pues hay que tener en cuenta que además de no saber qué metabolitos proteicos son los que componen a las TP 1122 y TP 757 no son metabolitos purificados y que en este sobrenadante pueden encontrarse aun células de *P. aeruginosa* o bien los metabolitos pueden estar diluidos; pues aún no hay un cálculo exacto de la cantidad de metabolitos que hay en cierta cantidad de medio de cultivo.

En una investigación realizada en el 2013, se observó que la piocianina, un metabolito citotóxico que secreta *P. aeruginosa* es toxico para las células de *S. cerevisiae* y que bajo condiciones fermentativas en medio con glucosa las levaduras muestran una respuesta menos sensible ante la toxicidad de la piocianina, en cambio en condiciones respiratorias con glicerol en el medio las levaduras son mucho más sensibles ante este metabolito; sin embargo los autores determinaron que el crecimiento de las levaduras puede ser mayormente inhibido en condiciones anaeróbicas, por lo que sugieren que aunque las levaduras que respiran activamente muestran ser más sensibles a la piocianina, el O₂ puede estar protegiendo de manera indirecta a las células de la toxicidad anaeróbica que demuestra tener la piocianina (Barakat et al., 2014).

También determinaron que la toxicidad anaeróbica de la piocianina afecta de manera importante la cinética del crecimiento sin ser afectada la supervivencia celular, esto debido a que se observó que el efecto inhibitorio se relacionaba con la disminución de glucosa y la producción de etanol. De igual manera comprobaron que la piocianina no afecta de manera directa la respiración de las células de levadura, sin embargo, en presencia de cianuro que también es secretado por *P. aeruginosa*, la piocianina podría interferir con la respiración mitocondrial de las levaduras (Barakat et al., 2014).

Comparando estos datos con los resultados obtenidos en esta tesis se puede hipotetizar que la piocianina producida por *P. aeruginosa* 1122 pertenece a los metabolitos citotóxicos que pudiera haber en lo que consideramos como TP 1122 y que en medio de cultivo YPD esta

desarrolla una posible inhibición en concentraciones altas sobre *S. cerevisiae Killer* y una inhibición significativa sobre *S. cerevisiae* sensible (en la concentración de 100 mg de TP 1122). Aquí es importante hacer notar que *S. cerevisiae Killer* siempre aumenta su crecimiento usando las concentraciones de TP 1122 evaluadas, sin embargo, se puede desarrollar una posible inhibición en concentraciones mayores a 100 mg de TP 1122; esto nos indica que *S. cerevisiae Killer* presenta mayor resistencia ante el estrés que puede estarle generando la piocianina, a diferencia de la cepa sensible. Por esto mismo se considera importante realizar un estudio transcriptómico de la levadura retada por *P. aeruginosa* productora de piocianina.

Por otro lado, es evidente que en el medio King A las levaduras resistieron más ante el estrés de la piocianina, ya que en los resultados nunca se desarrolló una inhibición, sin embargo, se observa que es probable que a mayores concentraciones de 100 mg de TP 122 también se desarrolle una inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae Killer* y sensible en este medio. Esto coincide con lo discutido en la investigación antes mencionada (Barakat et al., 2014), pues el medio King A tiene glicerol como sustrato, por lo cual las levaduras se encuentran en una fase respiratoria activa y no fermentativa como con el medio YPD; por lo cual el O₂ sí pudiera estar favoreciendo a las levaduras de alguna manera, haciendo más difícil el proceso de inhibición.

Los metabolitos citotóxicos que constituyen TP757 también desarrollan inhibición en medio YPD sobre *S. cerevisiae* sensible y posiblemente sobre *S. cerevisiae Killer*; y en medio King A únicamente una posible inhibición sobre *S. cerevisiae Killer*. Esto nos hace proponer que *P. aeruginosa* puede producir diferentes metabolitos citotóxicos dependiendo la cepa, y que estos metabolitos actúan sobre *S. cerevisiae* de forma distinta; pues seguramente *S. cerevisiae Killer* y sensible tienen diferentes mecanismos de respuesta ante el estrés que generan estos metabolitos citotóxicos.

Con esto se sugiere realizar nuevos estudios que permitan conocer qué metabolitos citotóxicos componen TP 1122 y TP 757 y cómo estos interactúan sobre blancos moleculares de *S. cerevisiae* desencadenando procesos celulares específicos.

Como no hay investigaciones acerca de cómo la toxina *K1* producida por *S. cerevisiae* afecta el crecimiento y el metabolismo de *P. aeruginosa*, solo queda sugerir una hipótesis sobre los resultados observados. Es importante recordar que en esta investigación no se trabajó con la toxina *K1* purificada, sin embargo, se ha demostrado en diferentes investigaciones del laboratorio de Biofísica de Membranas de la Facultad de Ciencias Naturales, que el uso del sobrenadante del cultivo en medio inductor es eficiente para experimentar con la *K1*.

El crecimiento de *P. aeruginosa* 1122 y 757 es inhibido únicamente utilizando la concentración de 100 mg de *K1*. Las condiciones en que se desarrolla *P. aeruginosa* si influye mucho sobre si se desarrolla el efecto inhibitorio o no, pues los resultados obtenidos muestran que el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122 es inhibido por *K1* únicamente en el medio de cultivo King A, en cambio *P. aeruginosa* 757 es inhibida en el medio de cultivo YPD.

Con estas observaciones podemos determinar que cada cepa de *P. aeruginosa* responde ante el estrés de *K1* de manera diferente; y que el efecto *Killer* puede variar dependiendo las condiciones en donde se desarrolle la citotoxicidad. Esto coincide bastante con la citotoxicidad que tiene la pirocianina sobre *S. cerevisiae*, pues esta varía dependiendo varios factores, algunos ya estudiados y otros que posiblemente aún no se han identificado (Barakat et al., 2014). Con esto se abre un nuevo panorama para investigar el mecanismo de acción que tiene *K1* sobre *P. aeruginosa* y los blancos moleculares que están involucrados en estos mecanismos.

9. Conclusión

Cada microorganismo y cada cepa responde de manera diferente ante el estímulo que se desarrolle. La respuesta obtenida cuando se ponen a competir a ambos microorganismos en función de célula vs célula, demuestra que cada microorganismo puede ser afectado de manera diferente dependiendo las condiciones que estén a su favor o no, desarrollando respuestas que anteriormente no se habían visto.

Las células de *S. cerevisiae* sí pueden generar un efecto inhibitorio sobre *P. aeruginosa* en diferentes medios de cultivo, medios de cultivo que favorezcan su crecimiento o medios de cultivo que no le proporcionen muchos nutrientes para desarrollarse. *S. cerevisiae* también puede afectar la expresión de algunos genes de *P. aeruginosa*, incluso algunos que puedan estar relacionados en la formación de biopelículas o bien el desarrollo del *swarming*; sin embargo, estos factores pueden variar dependiendo de las cepas de *S. cerevisiae* y *P. aeruginosa* que se utilicen, pues sus capacidades metabólicas pueden variar respondiendo de manera distinta ante la competencia.

S. cerevisiae *Killer* puede estar desarrollando una orientación de polaridad celular muy particular ante el reconocimiento metabolitos proteicos producidos por *P. aeruginosa*; sin embargo, hace falta realizar más experimentos e investigaciones para corroborar esta posibilidad, o determinar exactamente qué es lo que sucede en los *spots* de *S. cerevisiae* *Killer* cuando son sembrados sobre un césped de *P. aeruginosa* 1122.

Los metabolitos citotóxicos que componen a TP 1122 y TP 757 no son aún identificados, sin embargo, han demostrado afectar el crecimiento de *S. cerevisiae* de manera específica, dependiendo el medio de cultivo en que se desarrolla la competencia y las concentraciones de TP que se suministran sobre la levadura. Estos metabolitos pueden estimular o inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* *Killer* y sensible. El desarrollo fermentativo o respiratorio de las

levaduras utilizadas también pueden influir en la resistencia que tienen ante el estrés que desarrollan las TP, siendo *S. cerevisiae Killer* más resistente.

La toxina *K1* puede llegar a afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* en algunos casos, sin embargo, puede que el efecto inhibitorio sea más eficiente utilizando las células de *S. cerevisiae Killer*. El medio en que se desarrolla la competencia, las concentraciones de *K1* que se administran sobre *P. aeruginosa* y la cepa de *P. aeruginosa* son factores que pueden hacer variar el efecto *Killer*.

Finalmente, después de observar que concentraciones específicas de *K1* también pueden estimular el crecimiento de *P. aeruginosa*, puede considerarse esta estrategia como herramienta para obtener mayores concentraciones de pirocianina en algunas cepas de *P. aeruginosa*. Sin embargo, se tendrían que hacer más estudios que puedan descartar que la pirocianina no es afectada en la función primordial que deba cumplir en la aplicación de la investigación deseada.

10. Perspectivas

La necesidad de estudiar nuevas alternativas al uso de antibióticos y antimicrobianos convencionales para bacterias multirresistentes, es cada vez más grande y con mayor urgencia; Esta investigación principalmente abre panoramas a nuevas líneas de investigación para contribuir al desarrollo de estas nuevas alternativas:

1. Estudiar el transcriptoma de *P. aeruginosa* y *S. cerevisiae* tras desarrollar la competencia citotóxica entre ambos microorganismos; con el objetivo de conocer los cambios que se pudieran desarrollar en la expresión e inhibición de genes y considerar si puede utilizarse esto como una herramienta para hacer más susceptible a la bacteria, dando pauta a una inhibición de su crecimiento o un bloqueo de algunos de factores de virulencia y multirresistencia que posee *P. aeruginosa*.

2. Estudiar el mecanismo de acción molecular que tiene *K1* sobre *P. aeruginosa*, identificando su blanco molecular y el proceso celular que se desencadena; y comparar si el blanco molecular es homólogo a los blancos moleculares ya identificados para *K1* en otros microorganismos.
3. Estudiar los metabolitos citotóxicos que *P. aeruginosa* secreta al medio y cómo estos actúan sobre la levadura afectando su crecimiento; al igual que determinar si estos metabolitos afectan la producción de *K1* en *S. cerevisiae* *Killer*.
4. Estudiar cómo *S. cerevisiae* sensible puede utilizarse como un microorganismo que afecte el crecimiento de *P. aeruginosa* y otros microorganismos procariotas, utilizando su capacidad de modificar el pH del medio en que se desarrolla.

Finalmente, todos los resultados obtenidos por microscopía, también invita a realizar estudios sobre posibles mecanismos de quimiotaxis desarrollados en la competencia entre estos dos microorganismos y del desarrollo de estructuras o procesos celulares que pudieran estar desencadenándose ante una resistencia poblacional. Esto podría realizarse mediante experimentos de expresión transcripcional en ambos sentidos: La levadura retada por la bacteria y la bacteria retada por la levadura.

11. Referencias

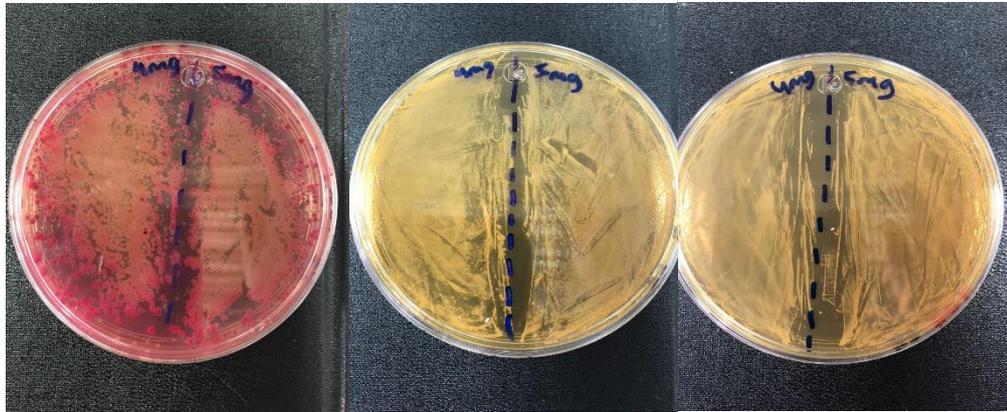
1. Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
2. Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
3. Akova, M. (2016). Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*, 7(3), 252–266. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1159366>
4. Organización Mundial de la Salud. (2021). La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial. <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial#:~:text=M%C3%A1s%20de%20700%20mil%20muertes,p%C3%A9rdidas%20econ%C3%B3micas%20que%20superar%20ADan%20los>
5. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
6. Skariyachan, S., Sridhar, V. S., Packirisamy, S., Kumargowda, S. T., & Challapilli, S. B. (2018). Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiologica*, 63(4), 413–432. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0585-4>
7. Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>

8. Ciemniecki, J. A., & Newman, D. K. (2023). NADH dehydrogenases are the predominant phenazine reductases in the electron transport chain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/mmi.15049>
9. Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microbial Ecology*, 68(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0297-x>
10. Chew, S. C., Kundukad, B., Seviour, T., Van der Maarel, J. R. C., Yang, L., Rice, S. A., Doyle, P., & Kjelleberg, S. (2014). Dynamic remodeling of microbial biofilms by functionally distinct exopolysaccharides. *MBio*, 5(4), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.01536-14>
11. Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180>
12. Jabłońska, J., Augustyniak, A., Dubrowska, K., & Rakoczy, R. (2023). The two faces of pyocyanin - why and how to steer its production? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(4). <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03548-w>
13. Meirelles, L. A., & Newman, D. K. (2018). Both toxic and beneficial effects of pyocyanin contribute to the lifecycle of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 110(6), 995–1010. <https://doi.org/10.1111/mmi.14132>
14. Justo, S., Churasacari, T., Elías, C., & Guerra, A. (2016). Efecto Antibiótico De Píocianina De *Pseudomonas Aeruginosa* Sobre *Escherichia Coli* Y *Staphylococcus Aureus*. *Revista de Ciencias*, 10(October 2019). https://doi.org/10.31381/revista_ciencias.v10i0.585
15. Abdelaziz, A. A., Kamer, A. M. A., Al-Monofy, K. B., & Al-Madboly, L. A. (2022). A purified and lyophilized *Pseudomonas aeruginosa* derived pyocyanin induces promising apoptotic and necrotic activities against MCF-7 human breast

- adenocarcinoma. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01988-x>
16. Somers, J. M., & Bevan, E. A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Journal of General Microbiology*, 8, 71–83.
17. Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins : lethality and self- protection *Yeast viral killer toxins : lethality and self-protection*. August 2015.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>
18. Orentaite, I., Poranen, M. M., Oksanen, H. M., Daugelavicius, R., & Bamford, D. H. (2016). K2 killer toxin-induced physiological changes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, January, 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow003>
19. Saarlandes, U., Saarlandes, U., Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins : lethality and self- protection *Yeast viral killer toxins : lethality and self-protection*. August 2015. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>
20. Zrieq, R., Sana, T. G., Vergin, S., Garvis, S., & Volfson, I. (2015). Genome-wide Screen of *Pseudomonas aeruginosa* in *Saccharomyces cerevisiae* Identifies New Virulence Factors. *PLoS ONE*, 5(November), 1–12. <https://doi.org/10.3389/pcimb.2015.00081>
21. Dehghanzadeh, Z., Koupaei, M., Ghorbani, Z., & Sadari, H. (2021). Gene Reports Inhibitory effect of *Saccharomyces cerevisiae* supernatant and lysate on expression of *lasB* and *apl* genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene Reports*, 24(June), 101247. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101247>
22. Falcao, M. dos S., Soares, K. M., Campos, W. W, Couto, J. A., Holanda, M. T., & Figueiredo, A. L. (2017). *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties. *Microbial Pathogenesis*, 110, 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.010>
23. D'Argenio, D. A., Calfee, M. W., Rainey, P. B., & Pesci, E. C. (2002). Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *Journal of Bacteriology*, 184(23), 6481–6489. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6481-6489.2002>

24. Tremblay, J., & Déziel, E. (2008). Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *Journal of Basic Microbiology*, 48(6), 509–515.
<https://doi.org/10.1002/jobm.200800030>
25. Ghose, D., Elston, T., & Lew, D. (2022). Orientation of Cell Polarity by Chemical Gradients. *Annual Review of Biophysics*, 51, 431–451.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-110821-071250>
26. Barakat, R., Goubet, I., Manon, S., Berges, T., & Rosenfeld, E. (2014). Unsuspected pyocyanin effect in yeast under anaerobiosis. *MicrobiologyOpen*, 3(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.142>

Apéndices



S1 Estandarización de cuantos mg de *P. aeruginosa* se utilizaron como césped. Se realizó esta metodología con el fin de determinar si 4 mg de células de *P. aeruginosa* desarrollaban un césped homogéneo, o bien era más optimo usar 5 mg de células. Se observa que en los tres medios de cultivo los 5 mg de células desarrollan un césped más homogéneo y abundante. Las condiciones de incubación fueron a 37 °C por 48 hrs. **A)** *P. aeruginosa* 1122 en medio de cultivo agar MacConkey (4 mg y 5 mg); **B)** *P. aeruginosa* 1122 en medio de cultivo agar TSA (4 mg y 5 mg); **C)** *P. aeruginosa* 1122 en medio de cultivo agar YPD (4 mg y 5 mg).

Experimento	Anova	Prueba de Tukey
“Células de <i>S. cerevisiae</i> Killer pueden matar a las células de <i>P. aeruginosa</i> 1122”	$p=0.00324^{**}$	TSA 01 mg / Mac 10 mg $p= 0.0042558$ YPD 01 mg / Mac 10 mg $p= 0.0022316$
“Células de <i>P. aeruginosa</i> 1122 pueden matar a las células de <i>S. cerevisiae</i> Killer”	$p=0.13$	NA
“Células de <i>S. cerevisiae</i> Sensible pueden matar a las células de <i>P. aeruginosa</i> 1122”	$p= 0.283$	NA
		Mac 10 mg / Mac 01 mg $p= 0.0303248$ YPD 01 mg / Mac 05 mg $p=0.0007588$ YPD 05 mg / Mac 05 mg $p=0.0036107$ YPD 07 mg / Mac 05 mg $p=0.0040119$ YPD 01 mg / Mac 07 mg $p=0.0014399$ YPD 05 mg / Mac 07 mg $p= 0.0067939$

<p>“Células de <i>P. aeruginosa</i> 1122 pueden matar a las células de <i>S. cerevisiae</i> sensible”</p>	<p>p= 3.33e-06 ***</p>	<p>YPD 07 mg / Mac 07 mg p=0.0.0075395 TSA 01 mg / Mac 10 mg p=0.0011607 TSA 05 mg / Mac 10 mg p=0.0477522 TSA 07 mg / Mac 10 mg p=0.0190783 YPD 01 mg / Mac 10 mg p=0.0000154 YPD 05 mg / Mac 10 mg p=0.0000694 YPD 07 mg / Mac 10 mg p=0.0000771 YPD 10 mg / Mac 10 mg p=0.0016713 YPD 01 mg / TSA 10 mg p=0.0091455 YPD 05 mg / TSA 10 mg p=0.0400411 YPD 07 mg / TSA 10 mg p=0.0440819</p>
---	------------------------	--

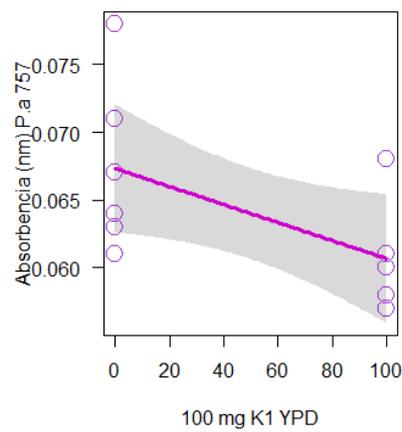
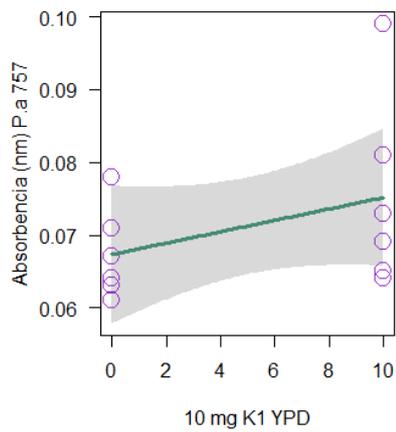
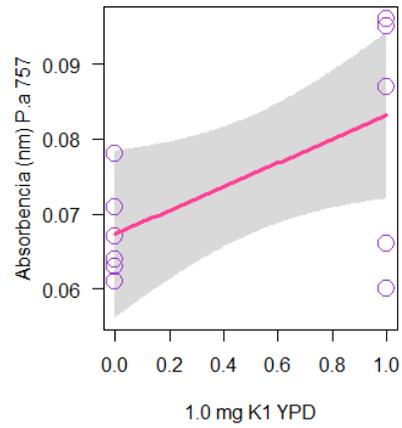
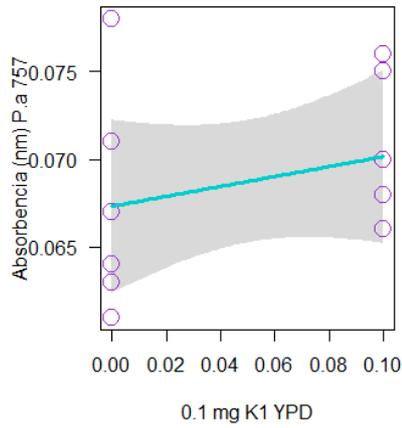
S2 Valores obtenidos en las pruebas estadísticas *Anova* y prueba de Tukey de los experimentos de ensayos de inhibición en placa, utilizando *P. aeruginosa* 1122.

Experimento	Anova	Prueba de Tukey
<p>“Células de <i>S. cerevisiae</i> Killer pueden matar a las células de <i>P. aeruginosa</i> 757”</p>	<p>p= 1.43e-09 ***</p>	<p>Mac 10 mg / Mac 01 mg p=0.0225464 TSA 05 mg / Mac 01 mg p= 0.000008 TSA 07 mg / Mac 01 mg p= 0.0000010 TSA 10 mg / Mac 01 mg p= 0.0000002 YPD 05 mg / Mac 01 mg p= 0.0003307 YPD 07 mg / Mac 01 mg p= 0.0000085 YPD 10 mg / Mac 01 mg p= 0.0000001 TSA 05 mg / MAC 05 mg p= 0.0011326 TSA 07 mg / MAC 05 mg p= 0.0001232 TSA 10 mg / MAC 05 mg p= 0.0000200 YPD 05 mg / Mac 05 mg p= 0.0463621 YPD 07 mg / Mac 05 mg p= 0.0012104 YPD 10 mg / Mac 05 mg p= 0.0000090 TSA 05 mg / Mac 07 mg p= 0.0061857 TSA 07 mg / Mac 07 mg p= 0.0006730 TSA 10 mg / Mac 07 mg p= 0.0001049 YPD 07 mg / Mac 07 mg p= 0.0066027 YPD 10 mg / Mac 07 mg p= 0.0000462 TSA 07 mg / Mac 10 mg p= 0.0108114 TSA 10 mg / Mac 10 mg p= 0.0017040 YPD 10 mg / Mac 01 mg p= 0.0007362 TSA 05 mg / TSA 01 mg p= 0.0063846 TSA 07 mg / TSA 01 mg p= 0.0006950 TSA 10 mg / TSA 01 mg p= 0.0001083 YPD 07 mg /TSA 01 mg p= 0.0068146 YPD 10 mg /TSA 01 mg p= 0.0000476 YPD 01 mg / TSA 05 mg p= 0.0003534 YPD 01 mg / TSA 07 mg p= 0.0000394 YPD 01 mg / TSA 10 mg p= 0.0000066 YPD 05 mg / YPD 01 mg p= 0.0156946 YPD 07 mg / YPD 01 mg p= 0.0003776 YPD 10 mg / YPD 01 mg p= 0.0000030 YPD 10 mg / YPD 05 mg p= 0.0471263</p>
<p>“Células de <i>P. aeruginosa</i> 757 pueden matar a las</p>	<p>p= 1.07e-10 ***</p>	<p>Mac 7 mg / Mac 1 mg p= 0.0049718 Mac 10 mg / Mac 1 mg p= 0.0001944 TSA 1 mg / Mac 1 mg p= 0.0002691 YPD 1 mg / Mac 1 mg p= 0.0000892 TSA 1 mg / Mac 5 mg p= 0.0000036 YPD 1 mg / Mac 5 mg p= 0.0000013 TSA 5 mg / Mac 7 mg p= 0.0000703</p>

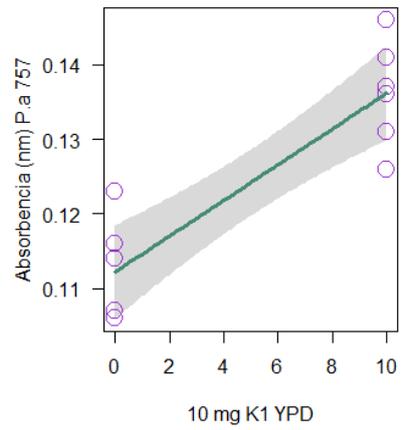
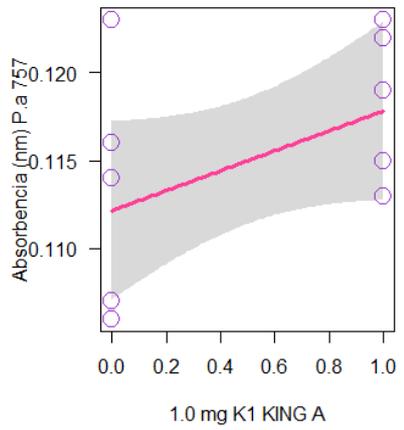
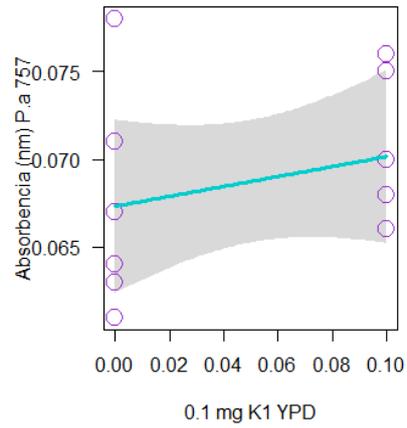
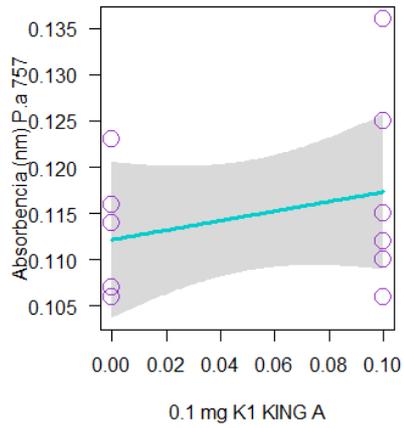
<p>células de <i>S. cerevisiae</i> "Killer"</p>		<p>TSA 7 mg / Mac 7 mg p= 0.0009576 TSA 10 mg / MAC 7 mg p= 0.0026724 YPD 5 mg / Mac 7 mg p= 0.0001139 YPD 7 mg / Mac 7 mg p= 0.0056632 TSA 5 mg / Mac 10 mg p= 0.0000032 TSA 7 mg / MAC 10 mg p= 0.0000384 TSA 10 mg / Mac 10 mg p= 0.0001048 YPD 5 mg / Mac 10 mg p= 0.0000050 YPD 7 mg / Mac 10 mg p= 0.0002217 YPD 10 mg / Mac 10 mg p= 0.0257730 TSA 5 mg / TSA 1 mg p= 0.0186153 TSA 7 mg / TSA 1 mg p= 0.0014033 TSA 10 mg / TSA 1 mg p= 0.0005023 YPD 5 mg / TSA 1 mg p= 0.0116203 YPD 7 mg / TSA 1 mg p= 0.0002360 YPD 10 mg / TSA 1 mg p= 0.0000023 YPD 1 mg / TSA 5 mg p= 0.0063188 YPD 10 mg / TSA 5 mg p= 0.0306278 YPD 1 mg / TSA 7 mg p= 0.0004594 YPD 1 mg / TSA 10 mg p= 0.0001654 YPD 5 mg / YPD 1 mg p= 0.0038882 YPD 7 mg / YPD 1 mg p= 0.0000784 YPD 10 mg / YPD 1 mg p= 0.0000009 YPD 10 mg / YPD 5 mg p= 0.0479287</p>
<p>"Células de <i>S. cerevisiae</i> Sensible pueden matar a las células de <i>P. aeruginosa</i> 757"</p>	<p>p= 9e-16 ***</p>	<p>Mac 7 / Mac 1 mg p= 0.0010961 Mac 10 / Mac 1 mg p= 0.0002045 TSA 5 / Mac 1 mg p= 0.0000002 YPD 1 / Mac 1 mg p= 0.0000426 TSA 5 / Mac 5 mg p= 0.0000777 TSA 7 / Mac 5 mg p= 0.0000001 YPD 1 / Mac 5 mg p= 0.0304339 YPD 5 / Mac 5 mg p= 0.0000031 TSA 1 / Mac 7 mg p= 0.0193052 TSA 5 / Mac 7 mg p= 0.0277847 TSA 7 / Mac 7 mg p= 0.0000217 YPD 5 / Mac 7 mg p= 0.0010111 YPD 7 / Mac 7 mg p= 0.0000001 TSA 1 / Mac 10 mg p= 0.0037536 TSA 7 / Mac 10 mg p= 0.0001113 YPD 5 / Mac 10 mg p= 0.0053998 YPD 7 / Mac 10 mg p= 0.0000004 TSA 5 / TSA 1 mg p= 0.0000022 YPD 1 / TSA 1 mg p= 0.0007616 YPD 5 / TSA 1 mg p=0.0000001</p>

		<p> YPD 7 / TSA 5 mg p= 0.0005109 YPD 10 / TSA 5 mg p= 0.0000155 TSA 10 / TSA 7 mg p= 0.0000140 YPD 1 / TSA 7 mg p= 0.0005441 YPD 10 / TSA 7 mg p= 0.0200557 YPD 5 / TSA 10 mg p= 0.0000004 YPD 7 / TSA 10 mg p= 0.0059042 YPD 5 / YPD 1 mg p= 0.0252051 YPD 7 / YPD 1 mg p= 0.0000015 YPD 10 / YPD 1 mg p= 0.0000001 YPD 7 / YPD 5 mg p= 0.0145780 YPD 10 / YPD 5 mg p= 0.0004269 </p>
<p> “Células de <i>P. aeruginosa</i> 757 pueden matar a las células de <i>S. cerevisiae</i> Sensible” </p>	<p> p=1.06e-05 *** </p>	<p> Mac 10 / Mac 1 mg p= 0.0201916 TSA 10 / Mac 1 mg p= 0.0007865 YPD 10 / Mac 1 mg p= 0.0089440 TSA 10 / Mac 5 mg p= 0.0156110 TSA 1 / Mac 10 mg p= 0.0147863 YPD 1 / Mac 10 mg p= 0.0009300 TSA 10 / TSA 1 mg p= 0.0005669 YPD 10 / TSA 1 mg p= 0.0064934 YPD 1 / TSA 5 mg p= 0.0180181 YPD 1 / TSA 7 mg p= 0.0094031 YPD 1 / TSA 10 mg p= 0.0000358 YPD 5 / TSA 10 mg p= 0.0076991 YPD 7 / YPD 1 mg p= 0.0115983 YPD 10 / YPD 1 mg p= 0.0003987 </p>

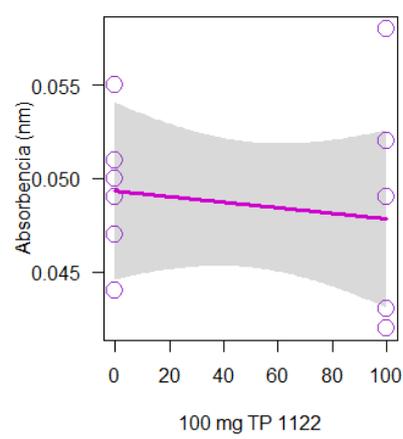
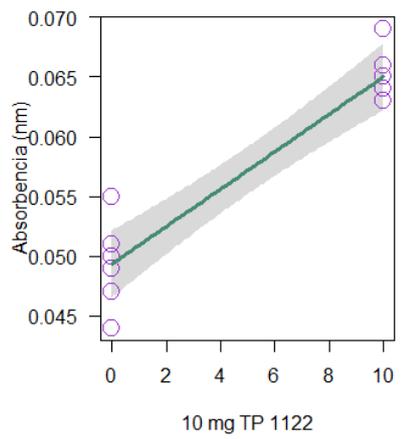
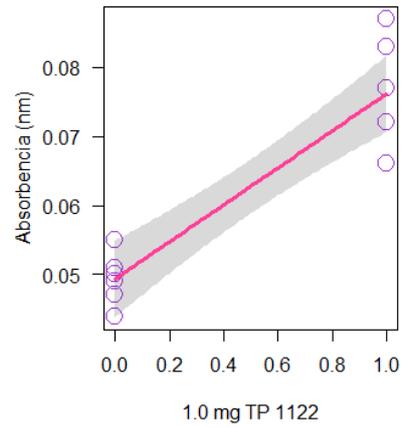
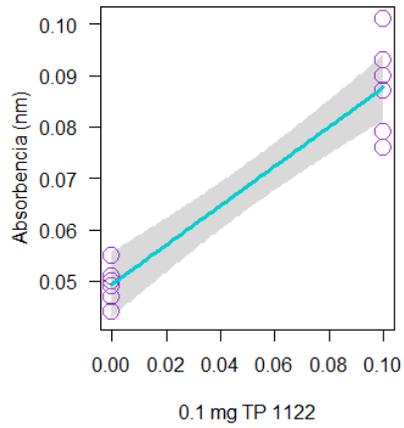
S3 Valores obtenidos en las pruebas estadísticas *Anova* y prueba de Tukey de los experimentos de ensayos de inhibición en, utilizando *P. aeruginosa* 757.



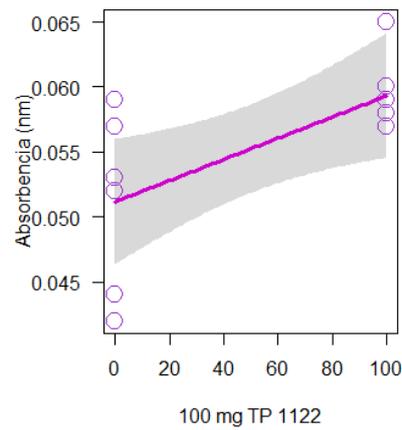
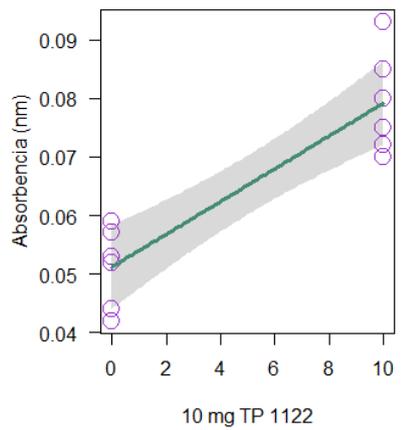
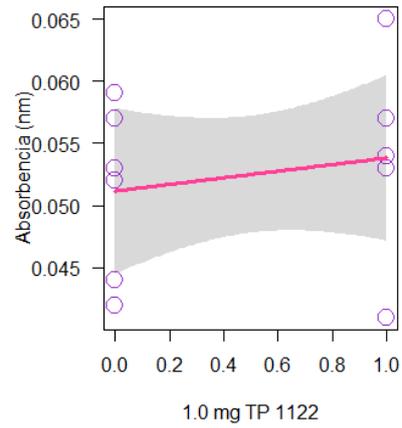
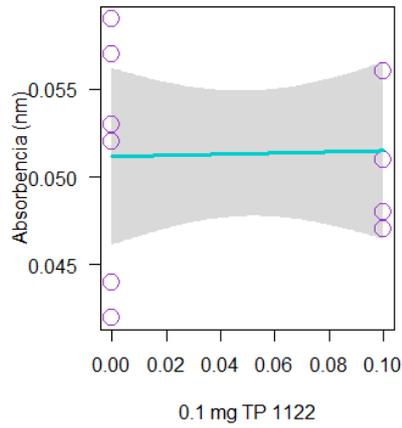
S4 Gráficas de regresión lineal del efecto que tiene *K1* sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122 en medio de cultivo YPD líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm).



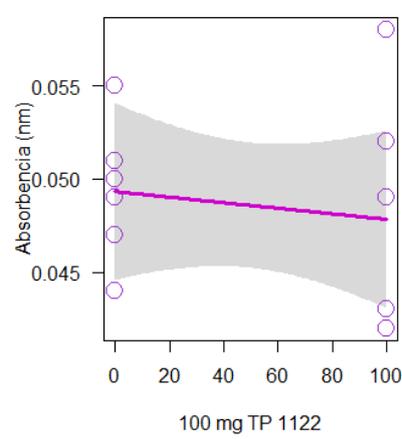
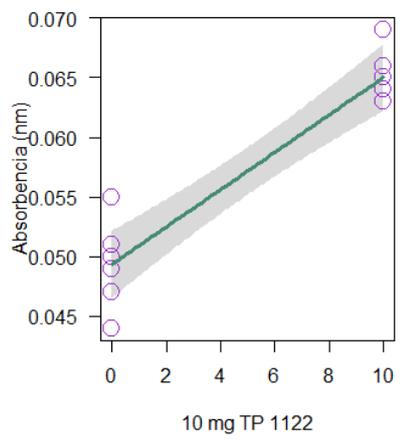
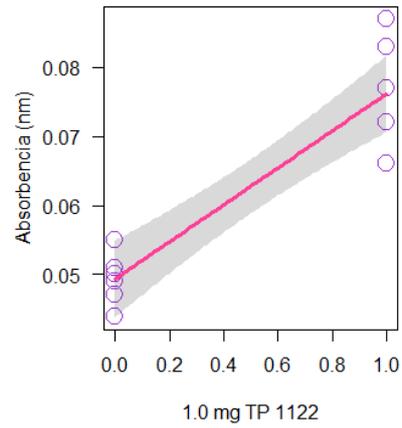
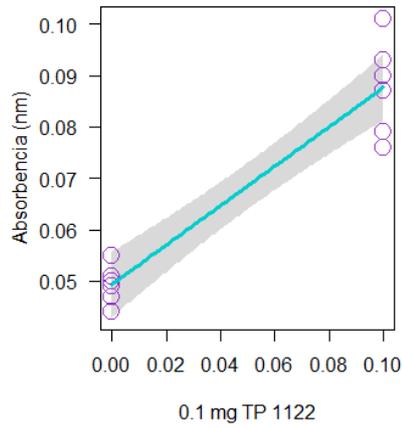
S5 Gráficas de regresión lineal del efecto que tiene *K1* sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* 1122 en medio de cultivo King A líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm).



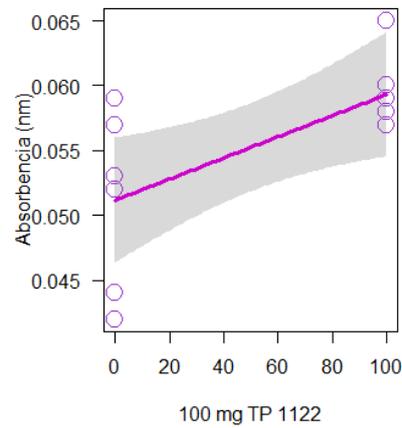
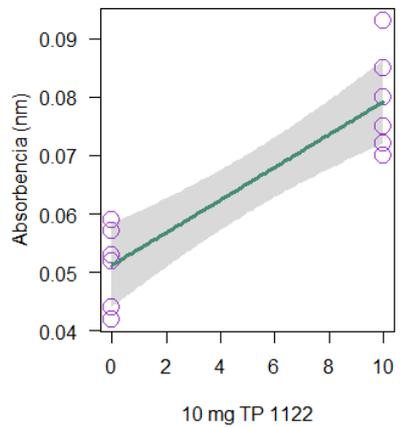
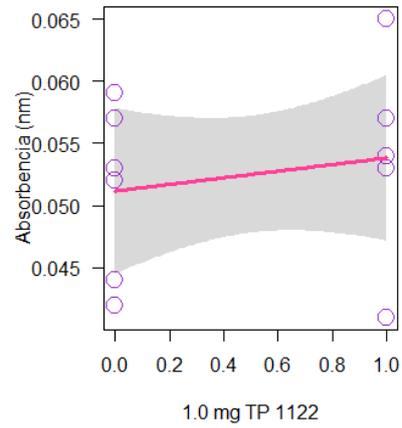
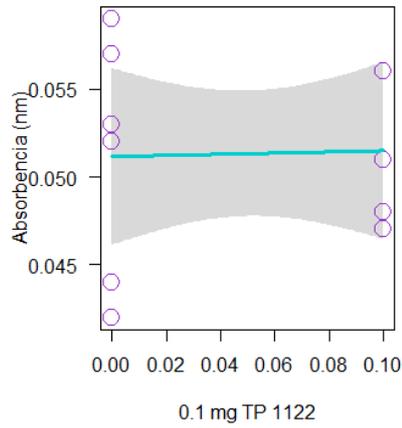
S6 Gráficas de regresión lineal del efecto que el crecimiento celular de *S. cerevisiae Killer* en medio de cultivo YPD líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm).



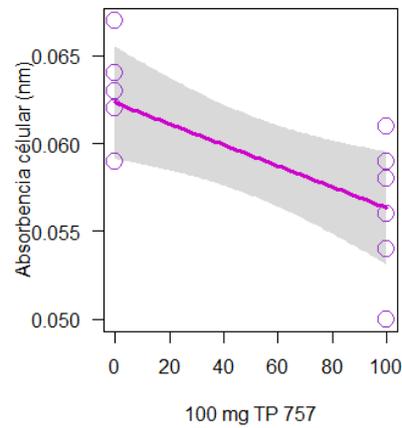
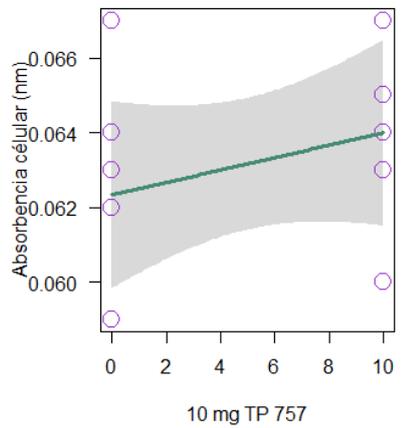
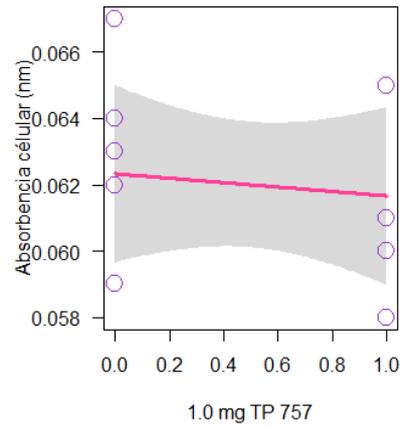
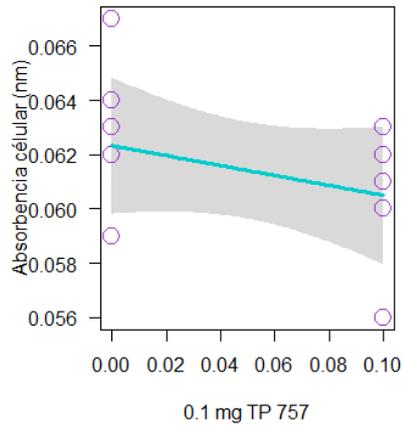
S7 Gráficas de regresión lineal del efecto que el crecimiento celular de *S. cerevisiae Killer* en medio de cultivo King A líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm).



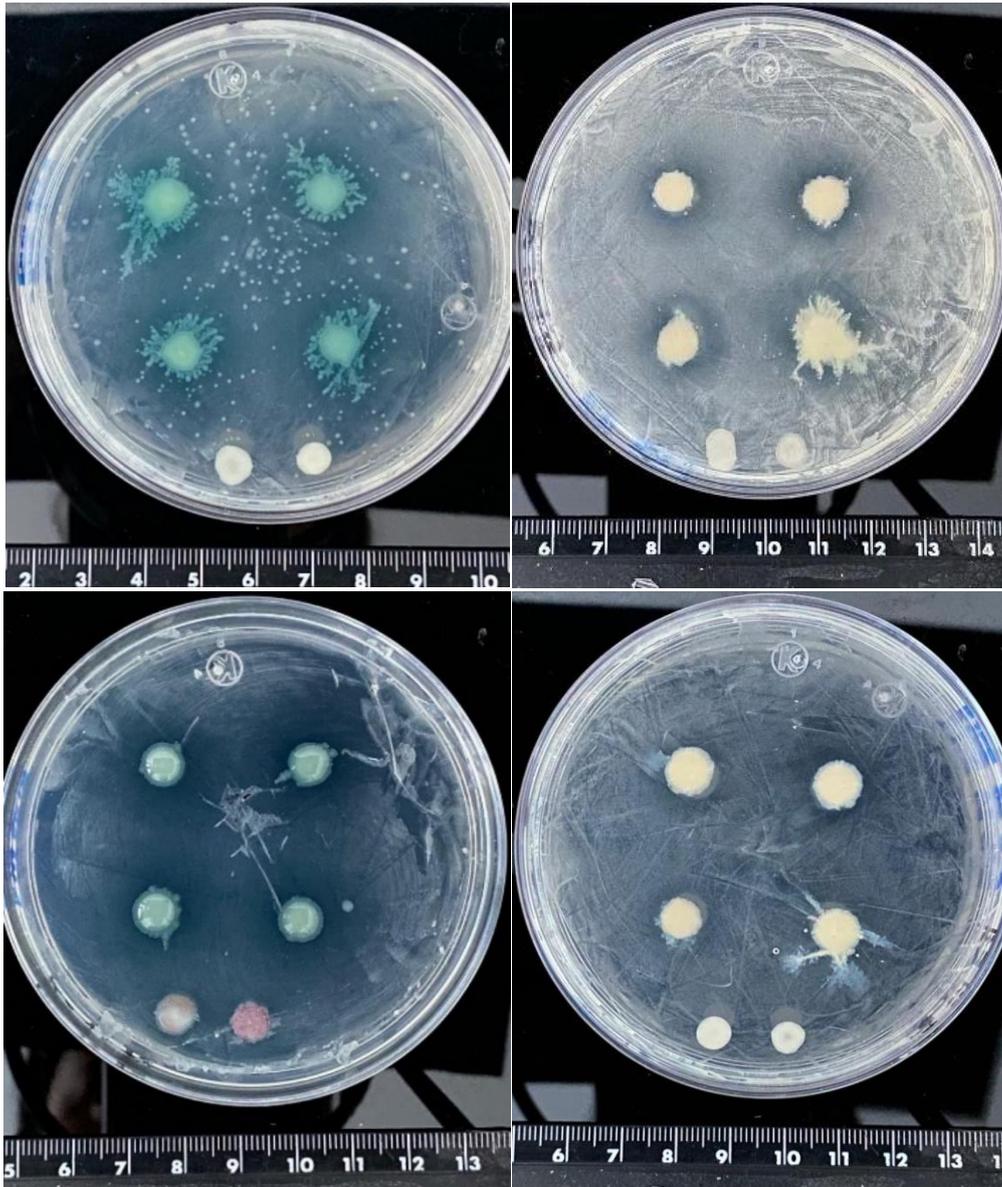
S8 Gráficas de regresión lineal del efecto que tiene TP 1122 sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible en medio de cultivo YPD líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm).



S9 Gráficas de regresión lineal del efecto que tiene TP 1122 sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible en medio de cultivo King A líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm).



S10 Gráficas de regresión lineal del efecto que tiene TP 757 sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* sensible en medio de cultivo YPD líquido a las 48 hrs. después de hacer los experimentos (600 nm).



S11 Única réplica del experimento césped *S. cerevisiae* Vs spots de *P. aeruginosa* 1122 en medio de cultivo agar King A en diferentes pH. Las condiciones de incubación fueron a 37 °C por 48 hrs. **A)** Césped *S. cerevisiae* Killer Vs spots de *P. aeruginosa* 1122 en medio de cultivo agar King A pH 7; **B)** Césped *S. cerevisiae* Killer Vs spots de *P. aeruginosa* 1122 en medio de cultivo agar King A pH 4.5; **C)** Césped *S. cerevisiae* sensible Vs spots de *P. aeruginosa* 1122 en medio de cultivo agar King A pH 7; **D)** Césped *S. cerevisiae* sensible Vs spots de *P. aeruginosa* 1122 en medio de cultivo agar King A pH 4.5.