

Massa petits per poder ser modelitzats?

Models basats en l'individu per representar i investigar poblacions microbianes amb creixement no planctònic

Marta Ginovart i Meritxell Font

Un model, una representació idealitzada i aproximada, per a una població microbiana, pot ser desenvolupat a partir d'un disseny complicat i sofisticat, si es volen abordar qüestions en detall o tractar determinats aspectes amb profunditat, o pot ser generat a partir d'un disseny més simple, si prèviament s'han fet moltes assumpcions i són diverses les hipòtesis que el suporten. Segons siguin les preguntes que volem que el model pugui respondre, haurem d'escollir el tipus de modelització més convenient, dependent principalment de les característiques pròpies del sistema a tractar, dels objectius fixats en l'estudi, i de les dades experimentals de què es disposen per abordar l'anàlisi corresponent.

A la natura, una gran part de les poblacions de microorganismes es troben en medis no planctònics, és a dir, medis no líquids en els quals els individus que hi habiten i els altres possibles elements que hi pot haver (components orgànics o inorgànics) es troben distribuïts de manera no homogènia, i per desplaçar-se o canviar de posicions han de superar les forces imposades pel mateix medi que els envolta. Aquests medis són principalment biofilms o altres medis gelatinosos amb mobilitat reduïda, presents en processos de contaminació o infecció, en el medi ambient amb colonitzacions desitjades o no, o creixement microbià sobre certes superfícies en contacte o no amb l'aire. Malgrat l'interès i atractiu que pot tenir l'estudi d'aquests sistemes, els models microbians més coneguts en l'entorn acadèmic, i alhora més utilitzats, s'han situat en medis líquids (medis planctònics) com a conseqüència de la seva simplicitat en l'estudi de les propietats espacials del medi que els envolta. Alhora, els coneixements o requisits de conceptes i eines matemàtiques que tenen aquests models continus més tradicionals es troben, generalment, coberts per continguts que s'imparteixen en assignatures de matemàtiques.

Quan les hipòtesis prèvies d'un medi homogeni de creixement o una distribució aproximadament homogènia de microorganismes en un entorn deixen de ser assumibles o plausibles, la formulació de models continus per a l'estudi d'aquests sistemes requereix eines matemàtiques més avançades. No obstant això, hi ha els anomenats *models discrets*, que ofereixen alternatives molt atractives i que són fàcilment abastables en molts entorns acadèmics per a l'estudi d'aquests sistemes.

Per investigar un sistema microbià amb creixement no planctònic és fonamental tenir en compte les condicions del medi en què es troba la població de microorganismes (individus), ja que les interaccions entre individus i partícules de substrats (o altres components) que conformen el sistema varien de manera significativa al llarg del temps i de l'espai, i per tant van condicionant i modificant el comportament d'aquests microorganismes. En sistemes amb medi líquid, tant els individus (microorganismes) com els altres components del sistema (substrats o productes) es troben distribuïts de manera uniforme per tot l'espai sota patrons de difusió alta i constant, o bé sota redistribució contínua (moviment passiu). A més, els microorganismes també poden tenir moviment propi proporcionat per flagels o altres dispositius (moviment actiu), mentre floten lliurement en el líquid. Per al creixement no planctònic, els microorganismes es troben en un medi o entorn que en condiona de manera important la mobilitat, i poden tenir mobilitat reduïda o fins i tot nul·la. Per exemple, en un medi no líquid i amb un creixement en superfície els microorganismes i les partícules de substrats han de superar les forces imposades per l'entorn local per tal de poder-se moure o desplaçar. En aquests casos, és molt important la difusió que l'ambient permet, ja que genera a partir de distribucions inicials homogènies i no homogènies amb discontinuïtats a l'espai dels elements del sistema (individus, substrats o productes) creixements diferents. Per exemple, al *Microbitos* (<https://microbitos.wordpress.com/2010/06/14/morfologia-colonial-bacteriana/>) es poden trobar espectaculars imatges de mi-

croorganismes diversos creixent en diferents medis.

Models basats en l'individu

Un dels propòsits de desenvolupar models discrets per tractar amb poblacions microbianes amb suport informàtic és aconseguir sistemes virtuals, portar a terme simulacions, generar resultats quantitius o qualitius i sortides gràfiques d'aquesta representació, per obtenir respostes a preguntes formulades envers el sistema. Permet també testear diferents escenaris per al sistema modelitzat, contrastar hipòtesis o aplicar teories, i treballar amb explicacions respecte a dades experimentals prèviament obtingudes i analitzades. Amb l'augment de la potència dels ordinadors i de la seva capacitat per manipular grans quantitats de dades, en els últims anys s'estan desenvolupant nous tipus de modelització amb una base computacional molt significat. La varietat de metodologies de modelització i els nous entorns de programació existents actualment estan obrint enormes possibilitats per poder tractar amb sistemes microbians des de perspectives ben diverses i donar respostes a qüestions diferents.

Els models es poden classificar segons el nivell d'observació amb el qual es descriu el sistema o la perspectiva que es té per representar el sistema, en models poblacionals o en models basats en l'individu (IBM, *individual-based models*). Els models poblacionals són models fets directament a escala de població, amb els quals s'obtenen resultats que tenen en compte el global de la població sense distingir entre els diversos individus que la configuren. La modelització més clàssica, com les equacions diferencials o els mètodes d'optimització per a l'ajust de funcions, i la modelització estadística, són les metodologies de modelització basades en la perspectiva dels models poblacionals. Principalment aquests models han tingut molt d'èxit per a creixements microbians planctònics. Per a creixements no planctònics, quan certes hipòtesis d'homogeneïtat en l'espai no es poden assumir, quan les interaccions són inherentment locals, o els comportaments de pocs individus resulta crucial per al desenvolupament del sistema, aquests models presen-

ten limitacions importants. Els IBM són models que descriuen els individus o parts que configuren un sistema com a entitats autònomes i discretes, i focalitzen tota la seva atenció a caracteritzar aquestes entitats mitjançant regles de comportament (moviment, consum de partícules de substrat, metabolització d'aquestes partícules, manteniment, creació de nova biomassa, reproducció, viabilitat, mort...), i permeten que aquestes entitats interaccionin entre elles i amb l'entorn en el qual es troben. Els IBM són models fets a escala de cada individu que forma la població o cada part discreta del sistema que es vol estudiar, i els resultats a escala de població s'obtenen amb l'acumulació dels comportaments de tots els individus. Al mateix temps, també es poden obtenir resultats a partir de distribucions de propietats o característiques individuals de les entitats que configuren el sistema.

En l'estudi de sistemes microbians cada un d'aquests individus (microorganismes) que configura el sistema té les seves característiques pròpies (massa, volum, posició en l'espai, energia de reserva, estat intern, posició en el cicle de la reproducció...), que van canviant a mesura que passa el temps i segons quines siguin les condicions d'entorn en les quals es troben. És acceptat que un mateix microorganisme localitzat en diversos medis pugui tenir comportaments diferents, créixer i reproduir-se amb velocitats o maneres diferents segons quines siguin les característiques locals que l'envolten. Aquests IBM controlen les operacions simultànies de múltiples entitats (són models discrets), que es desenvolupen en un entorn canviant al llarg del temps (són models dinàmics). Generalment, es considera l'aleatorietat o l'atzar com un element important a tenir en compte (són models estocàstics). Poden ser considerats models qualitius, però cada vegada més, segons com sigui la parametrització i el calibratge que es porta a terme, es converteixen en models quantitius. Intenten entendre com i de quina manera es produeixen els fenòmens observats (són models heurístics). Són essencialment models explicatius però amb el progrés constant de l'ús d'aquesta metodologia s'estan desenvolupant actualment models amb capacitat

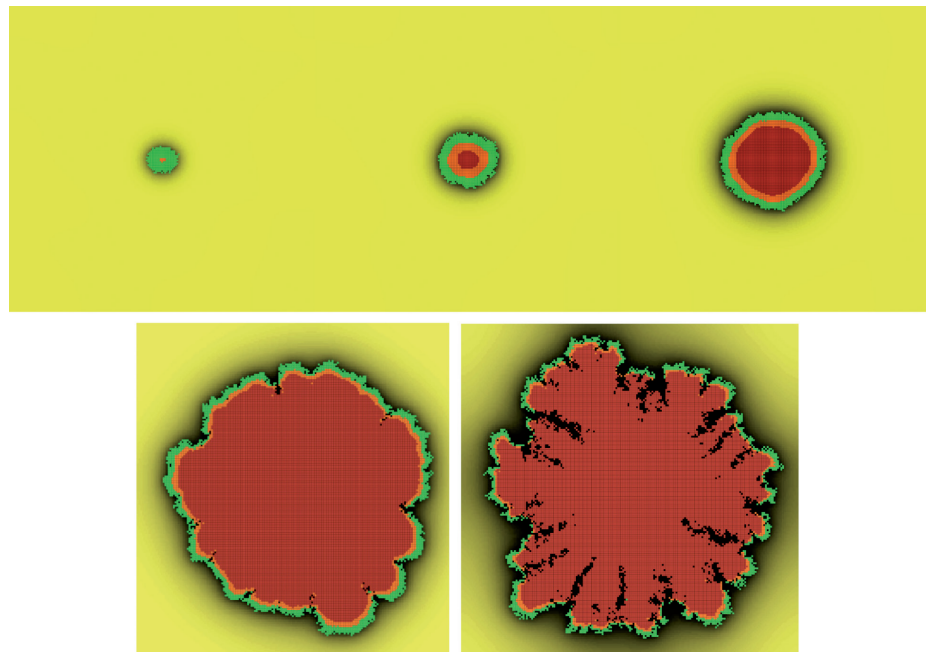
predictiva. Els IBM són models computacionals que tracten amb sistemes complexos adaptatius. Aquests IBM ofereixen opcions atractives per a l'estudi de sistemes biològics en general, i per a l'estudi de sistemes microbians en particular.

INDISIM-Plate-NL: un IBM microbià per tractar amb el creixement bacterià no planctònic

En el treball de Font i Ginovart (2016) es va fer una cerca bibliogràfica de treballs publicats sobre aquests models per investigar el creixement microbià no planctònic, i es van identificar les propietats i característiques principals dels dissenys dels models utilitzats i les seves implementacions en entorns de programació, per tal de facilitar-ne la comprensió i comparació. Es va constatar que el desenvolupament i l'ús de models computacionals en aquest àm-

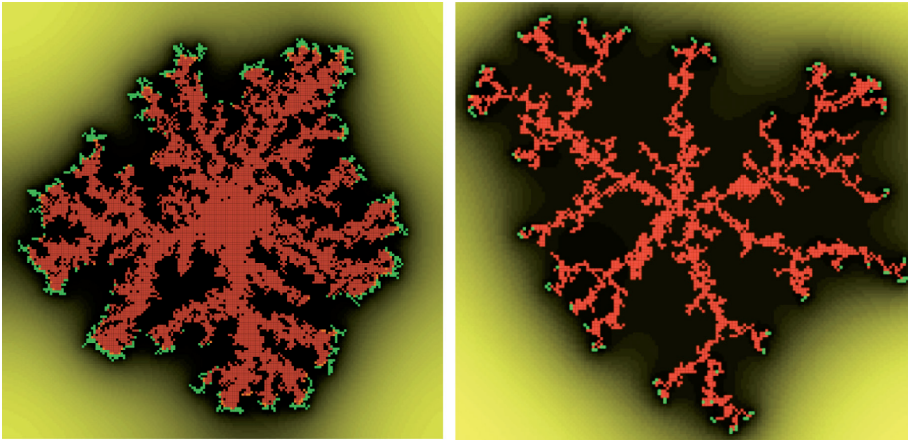
bit d'aplicació és relativament nou, i que en l'àmbit acadèmic aquests models són força desconeguts. Aquests models formen part d'una recerca avançada i d'alt nivell, i és en aquest entorn on aquests models i els simuladors respectius poden tenir el seu sentit i troben el seu espai. No són models ni simuladors accessibles que puguin ser transportables fàcilment a un context acadèmic. Alhora, per la seva pròpia naturalesa, aquests models computacionals són força complicats de replicar i, per tant, es fa molt difícil, per no dir impossible, que puguin ser utilitzats fàcilment.

El model INDISIM-Plate-NL és un IBM desenvolupat per a l'estudi de poblacions microbianes creixent en superfície, en entorns heterogenis i de mobilitat reduïda, i es troba implementat en la plataforma NetLogo d'accés lliure i entorn amigable de programació, que en possibilita



.....
✦ Figura 1. Simulacions obtingudes amb INDISIM-Plate-NL per representar el creixement d'una colònia bacteriana a partir d'un inòcul puntual en una placa d'agar amb nutrient. Els diferents colors de la colònia representen els microorganismes com a petites esferes de color diferent segons com sigui el seu estat individual: llima (viable, òptim), taronja (viable, no òptim) o vermell (no actiu). Part superior: desenvolupament d'una colònia durant la primera etapa temporal, en què l'esgotament de nutrient comença al centre de la colònia i progressa cap a l'exterior (amb menys nutrient, més negre és el medi). Part inferior: dues colònies diferents en etapes avançades del seu desenvolupament, en què la morfologia lobular és més pronunciada com menys nutrient hi ha. Font pròpia.
.....

Massa petits per poder ser modelitzats?



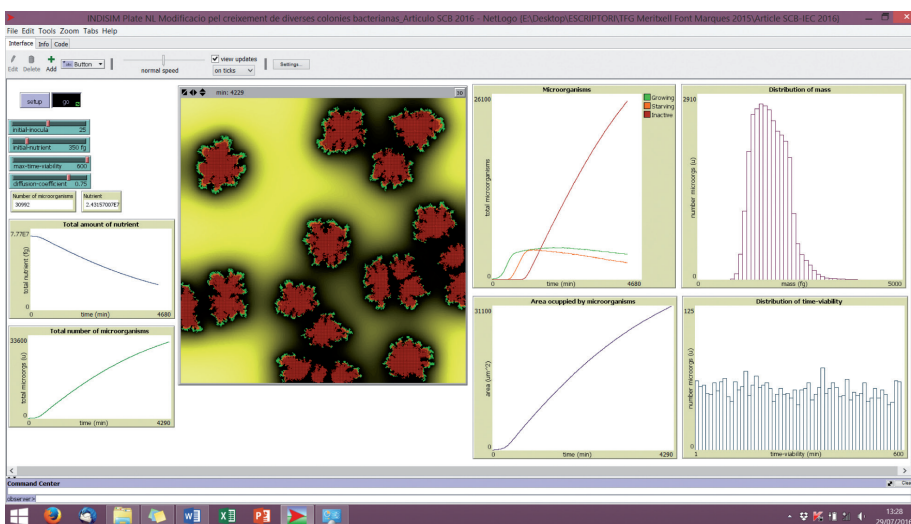
↑ Figura 2. Simulacions obtingudes amb INDISIM-Plate-NL. Amb l'esgotament local de nutrient al centre de la colònia, només els individus exteriors, de la perifèria de la colònia, que estan situats en posicions o entorns on poden aconseguir nutrient gràcies a la difusió d'aquest en el medi, poden complir els requisits de manteniment i, en alguns casos, crear nova biomassa, créixer i reproduir-se, i fer que les branques de la colònia s'expandeixin i avancin. Font pròpia.

enormement l'ús. Una completa descripció d'INDISIM-Plate-NL es troba en aquest treball de Font i Ginovart (2016) d'accés obert, en què es facilita el codi complet de programació, així com al simulador. Les principals parts d'aquest model de simulació són la representació de processos aplicats: a) a cada microorganisme de la població (canvi d'estat individual segons condicions internes i reserves energètiques, consum

de nutrient a l'abast, manteniment cel·lular, creació de nova biomassa, i reproducció per bipartició), i b) al medi on la població es desenvolupa (actualització local dels nutrients conseqüència de l'activitat de consum individual i la seva difusió). Les idees essencials del seu disseny van ser les presentades en el treball de Ginovart *et al.* (2002a, 2002b) i va ser parametritzat per al bacteri *Escherichia coli* K-12 MG1655 a partir

del treball de Tack *et al.* (2014). El simulador INDISIM-Plate-NL construït ha permès aprofundir en l'estudi del comportament de colònies bacterianes sobre una superfície, i il·lustrar evolucions temporals i espacials del sistema.

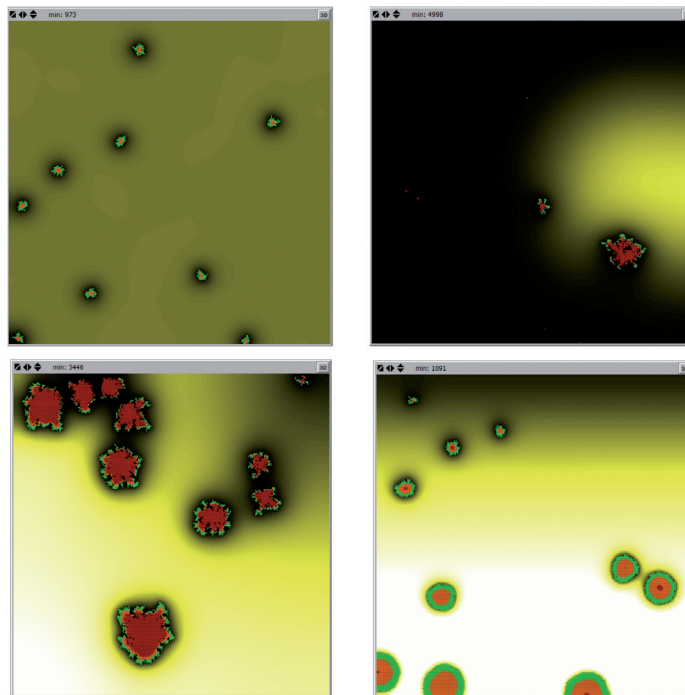
El fet de poder assolir creixements de poblacions de tipus exponencial o tipus sigmoïdal (logístic o variants), tan anomenats i utilitzats en microbiologia quan s'inoculen microorganismes en un medi líquid amb nutrients, deixa de ser plausible quan es fa en un medi heterogeni i de mobilitat reduïda. Per exemple, amb el simulador INDISIM-Plate-NL es pot constatar com en una placa o superfície amb presència d'agar (per reproduir característiques d'un medi gelatinós o semisòlid) l'evolució temporal i espacial de la població microbiana en forma de colònia depèn de les característiques d'aquest medi. A partir d'un inòcul inicial petit en un medi amb nutrient sotmès a un procés de difusió es forma una agrupació de microorganismes que avança de manera més o menys compacta durant l'ocupació de l'espai al llarg del temps com a resultat dels comportaments individuals a través de la reproducció, i amb l'aparició de nous individus s'ocupen noves posicions en l'espai (vegeu la figura 1). Segons quina sigui la concentració inicial de nutrient i les limitacions de difusió d'aquest nutrient (el coeficient de difusió s'assumeix que es troba inversament correlacionat amb la quantitat d'agar en el medi), l'esgotament del nutrient en les zones centrals i la velocitat amb què el nutrient es difon provoca que les colònies tendeixin a formar ramificacions, amb branques de creixement lent més o menys gruixudes, i es generen morfologies distintes (vegeu la figura 2). INDISIM-Plate-NL també es pot adaptar per generar altres escenaris de simulació per al creixement bacterià no planctònic com són la possibilitat de tenir més d'un inòcul inicial (vegeu la figura 3), tenir l'opció d'escollir diverses distribucions inicials de nutrient (vegeu la figura 4), utilitzar diferents condicions de frontera de l'entorn o incorporar variats tipus de moviment als microorganismes.



↑ Figura 3. Interfície de l'usuari d'una extensió del simulador INDISIM-Plate-NL, que genera diversos inòculs inicials en una distribució inicial uniforme de nutrient.

Les colònies virtuals generades amb INDISIM-Plate-NL reproduïxen morfologies diverses

→ Figura 4. Simulacions obtingudes amb una extensió d'INDISIM-Plate-NL, amb diferents tipus de distribucions inicials de nutrient a la superfície. Superior esquerra: distribució inicial heterogènia. Superior dreta: distribució inicial puntual. Inferior esquerra: gradient inicial de nutrient des de la posició de vèrtex del domini. Inferior dreta: gradient inicial de nutrient lateral. La posició inicial dels inòculs bacterians en condiona el desenvolupament. Font pròpia.



de colònies bacterianes observades en treballs experimentals, i estan en bona concordança amb simulacions generades amb models computacionals publicats amb anterioritat, la qual cosa indica que el simulador INDISIM-Plate-NL és adient per poder ser utilitzat en l'estudi d'aquests sistemes. Aquest fet en garanteix el valor científic, alhora que el posiciona per poder ser adaptat, ampliat i sofisticat per a estudis posteriors. La seva implementació en aquest entorn de programació NetLogo obert i accessible en l'àmbit acadèmic permet una divulgació efectiva d'aquest tipus de modelització discreta focalitzada en el microorganisme. •

Bibliografia

- BEN-JACOB, E. [et al.] (1998). «Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype». *Annual Reviews Microbiology*, 52: 779-806.
- FONT, M.; GINOVART, M. (2016). «Modelización de crecimientos microbianos en medios heterogéneos y de movilidad reducida». *Modelling in Science Education and Learning*, 9: 81-120.
- GINOVART, M. (2015). «¿Qué pueden ofrecer los modelos basados en agentes vivos en el contexto docente?». *Modelling in Science Education and Learning*, 8: 5-25.
- GINOVART, M. [et al.] (2002a). «INDISIM, an individual-based discrete simulation model to study bacterial cultures». *Journal of Theoretical Biology*, 214: 305-319.
- (2002b). «Individual based simulations of bacterial growth on agar plates». *Physica A*, 305: 604-618.
- HELLWEGER, F. L. [et al.] (2016). «Advancing microbial sciences by individual-based modelling». *Nature Reviews Microbiology*, 14: 461-471.
- HELLWEGER, F. L.; BUCCI, V. (2009). «A bunch of tiny individuals: individual-based modelling for microbes». *Ecological Modelling*, 220: 8-22.
- MATSUYAMA, T.; MATSUSHITA, M. (1992). «Self-similar colony morphogenesis by gram-negative rods as the experimental model of fractal growth by a cell population». *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1227-1232.
- TACK, I. L. M. M. [et al.] (2014). «An individual-based modelling approach to simulate the effects of cellular nutrient competition on Escherichia coli K-12 MG1655 colony behavior and interactions in aerobic structured food systems». *Food Microbiology*, 30: 1-10.
- WILENSKY, U. (1999). *NetLogo* [en línia]. Evanston, IL: Center for Connected Learning and Computer-Based Modelling. Northwestern University. <<http://ccl.northwestern.edu/netlogo/>>

Marta Ginovart és doctora en ciències matemàtiques i professora del Departament de Matemàtiques de la Universitat Politècnica de Catalunya (UPC). La seva docència s'emmarca en els graus d'enginyeria de biosistemes i agroalimentària, i la recerca, principalment, en el grup consolidat de la Generalitat de Catalunya (20145GR1093) BIOCOCMS (COMputational BIOlogy and Complex Systems) amb la modelització i simulació discreta de sistemes biològics.

Meritxell Font ha estudiat a l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona i és graduada en enginyeria de sistemes biològics per la UPC. Actualment està estudiant el programa de màster de canvi climàtic que ofereix la Universitat de Copenhaguen.