

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS USANDO AUTÓMATAS CELULARES

Carlos A. Cattaneo, Ledda I. Larcher, Carina A. Acosta

*Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero,
Av. Belgrano Sur 1912; G4200ABT Santiago del Estero, <http://faa.unse.edu.ar>*

Palabras clave: bacteria, simulación, autómata celular.

Resumen. Desde la primera mitad del siglo XX han aparecido multitud de modelos matemáticos cuyo objetivo ha sido el estudio del crecimiento de microorganismos. Sin embargo, aunque existen numerosas técnicas numéricas diferentes para modelar la ingesta de nutrientes, el mantenimiento, la división celular y el crecimiento de la colonia, ninguno de los modelos mencionados puede tomarse como universal. Esto se debe a que el comportamiento complejo de organismos simples debe estudiarse en aspectos diferentes cubriendo escalas temporales y espaciales totalmente distintas.

El modelo presentado está basado en autómatas celulares. Un autómata celular (AC) es un sistema dinámico discreto constituido por una red de objetos idénticos denominados células, que adoptan un determinado estado en cada instante de tiempo y que va cambiando según reglas de transición.

El objetivo de este trabajo es presentar un nuevo modelo de crecimiento de microorganismos basado en AC, en el que cada célula representa una porción del entorno en el que se desarrolla la bacteria, el tiempo avanza en pasos discretos y cada célula determina su nuevo estado a través de reglas de transiciones que tienen en cuenta el estado de sus vecinos. Las leyes del sistema utilizadas son locales y uniformes.

La ventaja del método basado en autómatas celulares es que permite obtener curvas de crecimiento de los microorganismos a tiempo real, lo cual posibilita que se comparen las curvas obtenidas mediante las simulaciones con curvas de datos experimentales. Y, a partir de esta comparación, determinar algunos parámetros de crecimiento como el tiempo de adaptación de la colonia de microorganismos al medio (tiempo de lag), y el tiempo necesario para iniciar la fase de duplicación.

En particular se estudiaron microorganismos del tipo bacteria como *Escherichia coli*, *Bacteria lactica*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* (prot.), *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp., para los que se logró reproducir las curvas de crecimiento experimentales en tiempo real, determinando los parámetros (tiempo de lag y tiempo de duplicación) para cada microorganismo. Es de resaltar que, gracias a la velocidad de los sistemas computacionales actuales, las curvas mencionadas pueden obtenerse en tiempos y costos menores a las logradas en el ámbito experimental.

1 INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se describe el crecimiento de bacterias mediante una simulación del proceso con autómatas celulares. Un autómata celular (AC) es un sistema dinámico discreto que evoluciona en un arreglo regular infinito; consiste en un número de agentes discretos o partículas, que ocupan algunas o todas las posiciones de una matriz. Estas partículas tienen una o más variables internas de estado (que pueden ser discretas o continuas) y un conjunto de reglas que describen sus cambios de estado y posición. Nuevamente, estas reglas pueden ser discretas o continuas, determinísticas o probabilísticas. A menudo, las reglas de evolución se aplican en pasos, por ejemplo, un movimiento o transporte seguido de un cambio de estado o de una interacción. La actualización puede realizarse de manera sincrónica o estocástica (Monte Carlo). Tanto el movimiento como el estado de las partículas dependen del estado actual de la partícula en cuestión, así como los de las partículas vecinas.

En cuanto a su dinámica, se tiene un conjunto finito de estados y una función local afectando una cantidad de estados dentro del arreglo regular, donde cada elemento del arreglo toma un valor del conjunto de estados y es llamado célula. El arreglo regular es conocido como el espacio de evoluciones. La función local es determinada por una célula central y sus células vecinas, formando una vecindad. La vecindad es el número de argumentos que la función local recibe. Por último, la transformación determinada para cada vecindad diferente corresponde a un elemento del conjunto de estados, se requiere una asignación de estado en el espacio de evoluciones que represente la configuración inicial del sistema.

Como ejemplo de vecindad en dos dimensiones tenemos la vecindad de Moore, que considera los vecinos ortogonales y los vecinos diagonales (Figura 1):

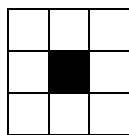


Figura 1: Vecindad de Moore

Podemos decir que los autómatas celulares son capaces de representar comportamientos complejos a partir de una dinámica sencilla y desde su origen fueron utilizados como elemento de la computación para la simulación de fenómenos biológicos y físicos pues pueden producir estructuras auto organizadas bastante sofisticadas (Alber *et al.*, 2003). Von Neumann demostró que un AC con un número finito de estados e interacciones de rango pequeño podrían construir una computadora universal (Von Neumann, 1966) y Conway, en su juego de la vida demostró que un autómata celular simple, de dos estados, con interacciones únicamente locales podría generar patrones espacio-temporales arbitrariamente complejos (Conway, 1970; Gardner, 1970). Más recientemente, Wolfram investigó la teoría de los AC e hizo importantes aseveraciones acerca de su utilidad en lo concerniente a problemas complejos (Wolfram, 1983, Wolfram, 1994, Wolfram, 2002) Wolfram inicia sus investigaciones a mediados de 1980, aplicando varios conceptos de dinámica no lineal y mecánica estadística. Una de las características más importantes que posee su modelo es que realiza un estudio sistemático tomando un conjunto de reglas y estudia sus evoluciones, es decir, realiza una clasificación de diferentes comportamientos en los autómatas celulares, con lo cual realiza una distinción entre varios tipos de autómatas celulares. Dicha clasificación es conocida como clases de Wolfram, diferente del modelo de Von Newman y Conway, donde las funciones representan un número muy grande y cada autómata tiene un propósito específico para resolver un problema.

La simulación de algún fenómeno en particular, como en nuestro caso, el de crecimiento de bacterias teniendo en cuenta ciertos parámetros, proporciona una importante herramienta de trabajo para la investigación. En este trabajo se presenta un programa que describe el desarrollo de una bacteria, tomando en cuenta ciertos parámetros.

En microbiología, cuando hablamos de crecimiento nos referimos a un aumento de la cantidad de células; el crecimiento es un componente esencial de la función microbiana, ya que toda célula viva tiene un período de vida finito en la naturaleza, y las especies se mantienen como resultado del crecimiento constante. Podemos decir que la célula bacteriana es una máquina sintética capaz de duplicarse a sí misma. En las células bacterianas, primero tenemos un aumento del tamaño de la célula, el crecimiento continúa hasta que ésta se divide en dos nuevas células, proceso denominado fisión binaria. El tiempo requerido para un ciclo de crecimiento completo varía, dependiendo de diversos factores, como ser requerimientos nutricionales, sustrato, temperatura, Ph del medio del cultivo, etc. Durante el ciclo de división celular, todos los componentes estructurales de la célula se duplican. El intervalo para la formación de dos células hijas a partir de una, se llama generación; y el tiempo requerido para que esto ocurra se denomina tiempo de generación. De esta manera, el tiempo de generación es el tiempo requerido para que se duplique el número de células y, debido a esto, el tiempo de generación es también conocido como tiempo de duplicación. Hay bacterias que pueden completar un ciclo de crecimiento en 20 minutos en condiciones óptimas como por ejemplo, la bacteria *Escherichia coli*, mientras que otras pueden tardar varias horas e incluso días.

En un laboratorio se realiza un experimento de crecimiento partiendo de un determinado número de células, que tienen un tiempo de duplicación establecido. Luego, se analiza y registra el aumento del número de célula en función del tiempo. Con los datos obtenidos se confecciona una curva de crecimiento, que consiste en el número de células en función del tiempo. Dicha curva de crecimiento se divide en diversas fases llamadas:

- Fase lag o de adaptación.
- Fase exponencial
- Fase estacionaria.
- Fase de declinación (muerte).

Hay una fase de adaptación o fase de retraso, mientras las células se ajustan a las nuevas condiciones, luego el crecimiento toma la forma exponencial. A medida que los nutrientes indispensables se agotan, o bien, debido a la presencia de metabolitos tóxicos, el crecimiento cesa y la población entra en la fase de latencia. Luego, si la incubación continúa en la fase estacionaria, las células pueden empezar a morir y se dice que la población está en la fase de declinación.

En este trabajo se diseñó un algoritmo basado en AC que simula el crecimiento de bacterias, y permite obtener las curvas de crecimiento respectivas bajo condiciones de inmovilidad, movimiento browniano y agitado turbulento.

2 MODELO COMPUTACIONAL

La variedad de tipos de interacciones que pueden establecerse en modelos de simulación es prácticamente infinita, acotados mayormente por la capacidad de cálculo. Independientemente de como haya sido formulado un modelo podemos elegir entre dos grandes esquemas de programación, los de tipo autómatas celulares y los métodos basados en Montecarlo. Un modelo tipo autómatas celulares (Ermentrout y Edelstein-Keshet, 1993) consiste en una red discreta y fija de nodos que pueden adoptar diversos estados según un conjunto de reglas que determinan la evolución del estado de cada nodo en función de sus vecinos. Estas reglas se

actualizan en pasos discretos de tiempo y aunque suelen ser deterministas cada vez son más utilizados los autómatas estocásticos. La propiedad definitoria de estos sistemas es que la actualización de los estados se hace simultáneamente en cada paso temporal para todos los nodos de la malla. Este método ha sido ampliamente utilizado para sistemas que pueden caracterizarse por un número bajo de estados y por las transiciones entre ellos. Sin embargo, la misma metodología puede aplicarse en sistemas con mayor número de estados o para valores continuos.

El método de Montecarlo se dirige más a los individuos que al soporte espacial. Por supuesto el paso temporal ha de ser discreto para ser programable, pero la actualización del sistema se hará celda a celda. Cada individuo puede adoptar un estado entre un conjunto continuo o discreto y puede estar asociado a un nodo de una red discreta fija (posiciones en números enteros) o mantener un registro que los identifique y los sitúe en un espacio continuo (posiciones con números reales). En cada paso de tiempo, MCS, uno de los individuos es elegido al azar y su estado, o su posición espacial, se actualizan conforme a un conjunto de reglas definidas. Si el sistema tiene $M \times M$ sitios de red, al cabo de $M \times M$ realizaciones (un MCS), en promedio, se habrá actualizado todo el sistema.

La potencia alcanzada por los procesadores modernos ha facilitado la simulación de procesos que pueden incluir descripciones biológicas muy detalladas. Es posible construir modelos según diferentes escalas de tiempo y de espacio, y esquemas de interacción entre individuos. Por este motivo, la simulación numérica es a veces la única herramienta para estudiar un sistema cuya formulación analítica puede ser muy compleja.

En este trabajo, se presentan los avances realizados sobre simuladores aplicados a la microbiología (Larcher y Cattaneo, 2006; Cattaneo *et al.*, 2007). Se aplica el paradigma de autómatas celulares para simular bacterias que se desarrollan en un entorno de tamaño fijo usando reglas que determinan su comportamiento. Durante la ejecución, las reglas utilizan el método de Monte Carlo para realizar la selección de vecinos.

En un cultivo bacteriano en laboratorio se pueden identificar cuatro fases (Vadasz y Vadasz, 2005). La figura 2 permite distinguir las tres primeras.

Fase lag o de adaptación: durante esta fase las bacterias adaptan su metabolismo, a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento de la población, aumentando su tamaño inicial y sintetizando moléculas necesarias para su funcionamiento óptimo.

Fase exponencial o de crecimiento: en esta fase la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo, representado en un crecimiento exponencial de la población de bacterias; la actividad metabólica es uniforme en todas las bacterias, consumiendo los nutrientes del medio a máxima velocidad.

Fase estacionaria: la fase exponencial comienza a decaer en forma gradual, llegando a un estado de suspensión del crecimiento, atribuible al agotamiento de los recursos (nutrientes) y en parte a la acumulación de sustancias tóxicas. Durante esta fase existe una producción y liberación de metabolitos secundarios.

Fase de declinación o de muerte: el agotamiento de los recursos y la acumulación de subproductos tóxicos en concentraciones inhibitorias producen la muerte de las bacterias.

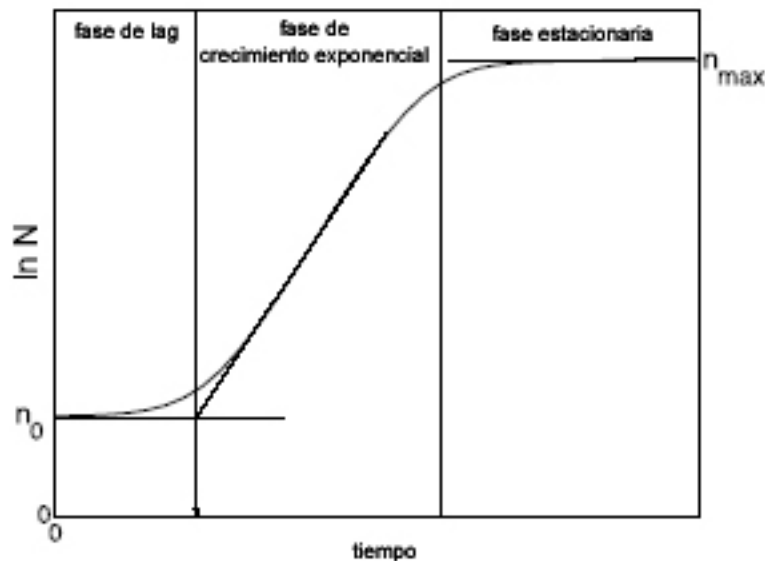


Figura 2. Descripción de una curva típica de crecimiento de microorganismos.

- Las bacterias tienen un número limitado de acciones, que corresponden a la alimentación, duplicación y movimiento:
 - Para poder alimentarse necesita información acerca del sustrato disponible.
 - Para su duplicación necesita información referente a sustrato disponible así como a las posiciones vecinas.
 - Para poder cambiar de lugar, según el tipo de movimiento a realizar, necesita información (a) en caso de tratarse de movimiento browniano, sobre las posiciones vecinas o (b) en caso de tratarse por movimiento provocado por el agitado del medio, necesita información sobre las restantes posiciones del entorno.
- Una bacteria sobrevive y se reproduce mientras existe sustrato disponible.
- Cada bacteria posee un tiempo de adaptación al medio (o tiempo de lag). El efecto global sobre la población de este tiempo de adaptación puede observarse en los valores mínimos al inicio de las curvas de crecimiento. Denotamos T_a al tiempo de adaptación.
- Cada bacteria iniciará su reproducción (por fisión binaria) un vez que haya transcurrido el lapso de tiempo necesario para la replicación de su material genético, la síntesis de componentes celulares y un crecimiento general del organismo. Se designa como T_d . El tiempo que tarda una bacteria en terminar un ciclo celular completo se denomina (τ) . La bacteria dividida dará lugar a dos nuevos individuos.
- Las bacterias son consideradas de tamaño fijo.

El sistema planteado implementa arreglos bidimensionales que representarán el entorno de desarrollo de las bacterias, así como el sustrato disponible.

El entorno o medio de desarrollo es un sistema bidimensional, representado por la matriz CEL, de dimensiones $M \times M$. La unidad fundamental de vida microbiana es una bacteria y se representa en una posición de la matriz. Cada bacteria se desarrolla en una posición x, y a

partir del inóculo inicialmente distribuido sobre la matriz CEL. Es posible simular así, el crecimiento de microorganismos en un cultivo realizado en un volumen finito (cultivo *batch*).

La supervivencia o inactivación de las bacterias dependen de la cantidad de sustrato disponible, que se representa mediante la matriz AL de dimensiones $M \times M$, y se encuentra directamente relacionada con la matriz CEL. El valor contenido en cada $AL(x,y)$ indica la cantidad de sustrato disponible para la bacteria ubicada en CEL (x,y) .

La Figura 3 muestra un inóculo de un solo microorganismo en una matriz de desarrollo de tamaño 10×10 .

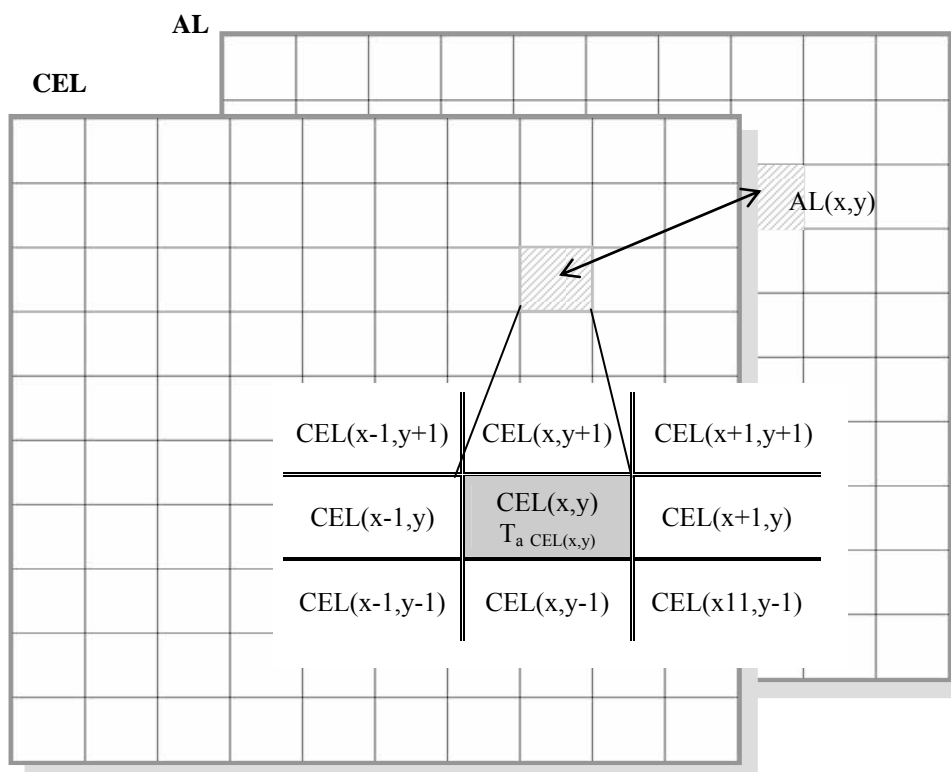


Figura 3. Puede observarse la bacteria ubicada en $CEL(x,y)$ y la vecindad que considerará al ejecutar las reglas de evolución, el valor asignado como tiempo de adaptación, y la relación 1 a 1 con la matriz de sustrato $AL(x,y)$.

Además, para poder simular las transiciones de estado de la población entre los tiempos t y $t+1$ se utiliza una matriz adicional de iguales dimensiones, con la única finalidad de contener datos auxiliares.

3 FUNCIONAMIENTO

Al iniciar la corrida del programa, se establecen parámetros que, al variar, sirven para ajustar las condiciones a cualquier microorganismo biológico. Tales parámetros son:

- Tamaño de las matrices (M)
- Inóculo
- Posición inicial del inóculo
- Sustrato para cada posición de la matriz

Se distribuye el inóculo en la matriz de desarrollo, $CEL(x,y)$ y el sustrato en la matriz $AL(x,y)$.

Mientras no se cumplan las condiciones de finalización, se recorre la matriz CEL disparando, para cada posición ocupada, las reglas de evolución (ver apartado 3.1)

Se han considerado los casos de bacterias cuyo medio de cultivo es líquido, de manera que las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente en la mayoría de los casos formando una suspensión de células libres. Existen bacterias que no presentan movilidad (como el *Staphylococcus aureus*) de manera que el crecimiento provoca la formación de colonias. Se ha considerado también el caso de movimiento en un medio sólido. Los tipos de movimiento considerados son movimiento browniano, en el que la bacteria puede moverse aleatoriamente a cualquiera de las posiciones vecinas vacías. Por otra parte, se considera la alternativa de movimiento por agitado del medio, tal como se realiza utilizando reactores; en este último caso, la bacteria puede moverse aleatoriamente a cualquier lugar del entorno, siempre que éste no se encuentre ocupado. El agitado implica también la homogeneización del sustrato disponible.

La Figura 4 muestra las reglas del proceso mencionado.

```

si CEL(x,y) ≠ 0 y AL(x,y) ≠ 0 → AL(x,y) = AL(x,y) - 1
                                y Ta CEL(x,y) = Ta CEL(x,y) - 1
                                y % chequear posibilidad de replicación
                                GENERAR (r,s) con x-1 ≤ r ≤ x+1; y-1 ≤ s ≤ y+1
                                si CEL(r,s)=0 → CEL(r,s) = 1
                                    y Ta CEL(x,y) = Ta
                                    y Ta CEL(r,s) = Ta

si CEL(x,y) ≠ 0 y AL(x,y) = 0 → CEL(x,y) = 0
si CEL(x,y) = 0 → generar nuevos valores para x,y

```

Figura 4. Condiciones y acciones para cada microensayo.

3.1 Reglas de evolución

Para obtener la siguiente generación en el autómata celular a partir de una generación previa, se aplican las reglas de evolución (escrita en pseudocódigo) de acuerdo a si se trata de bacterias que carecen de movimiento; si se realizará movimiento browniano o si se trata de movimiento por agitado:

% movimiento browniano

Mientras deba continuar actualizando

Mientras matriz <> EOF

Si en la Celda existe una bacteria **Entonces**

Si sustrato disponible > 0 **Entonces**

Bacteria sobrevive y disminuye sustrato y disminuye tiempo de duplicación

Genera posición para duplicación

Si vecino = 0 y tiempo de adaptación = 0 **entonces**

```

    bacteria muere y
    nace hija1 y
    nace hija2 y
    reinicia tiempo de duplicación para cada hija
  fin si
  Genera posición nueva, entre los vecinos, para efectuar movimiento
  Si vecino = 0 entonces
    bacteria cambia de posición
  fin si
  Caso contrario bacteria muere
  Fin si
  Caso contrario continuar recorrido
  Fin si
  Fin mientras
Fin mientras

% movimiento – agitado turbulento
Mientras deba continuar actualizando
  Mientras matriz <> EOF
    Si en la Celda existe una bacteria Entonces
      Si sustrato disponible > 0 Entonces
        Bacteria sobrevive y disminuye sustrato y disminuye tiempo de duplicación
        Genera posición para duplicación
        Si vecino = 0 y tiempo de adaptación = 0 entonces
          bacteria muere y
          nace hija1 y
          nace hija2 y
          reinicia tiempo de duplicación para cada hija
        fin si
      Caso contrario bacteria muere
      Fin si
    Caso contrario
      continuar recorrido
    fin si
  Fin mientras
  Si momento de agitado entonces
    Generar posición nueva en el entorno completo, para realizar movimiento
    Si nueva posición vacía entonces
      Bacteria cambia posición
    Fin si
    Homogeinización de alimento
  Fin si
Fin mientras

```


3.2 Abreviaturas

BHIB: Brain-Heart Infusion Broth (infusiones de cerebro y corazón) Medio altamente nutritivo para el cultivo de una gran variedad de microorganismos exigentes, incluyendo *Streptococcus*, *Pneumococcus* y *Meningococcus*.

TSB: Tryptone Soya Broth. Un caldo de cultivo nutritivo capaz de hacer prosperar una amplia gama de bacterias y hongos. El medio es también considerablemente utilizado para cultivos de sangre, aunque el alto nivel de carbohidratos puede causar un rápido crecimiento y posterior muerte de los organismos que producen ácidos.

Spp.: En biología se denomina especie (del latín *species*) a cada uno de los grupos en que se dividen los géneros, es decir la limitación de lo genérico en un ámbito morfológicamente concreto. En biología, una especie es la unidad básica de la clasificación biológica. A menudo se define una especie como grupo de organismos capaces de entrecruzar y de producir a descendiente fértil. Mientras que, en muchos, casos esta definición es adecuada, son de uso frecuente, medidas más exactas o que diferencian más, como por ejemplo basándose en la semejanza del ADN o en la presencia de rasgos local-adaptados específicos.

Prot.: Proteobacteria.

4 RESULTADOS

Una de las características de las poblaciones bacterianas es la de presentar un elevado crecimiento en un tiempo muy reducido, siguiendo una progresión geométrica, en la que el número de individuos se duplica al cabo de un tiempo de generación (τ) como se indica en la ecuación 1.

$$NB(t) = NB_0 2^n \quad (1)$$

Donde NB_0 representa el número de bacterias en la generación cero (0) y n es el número de generación, equivalente a: (ecuación 2)

$$n = t / \tau \quad (2)$$

Donde t representa el tiempo transcurrido desde la generación cero hasta la generación n .

En función del aumento de la masa celular se tiene (ecuación 3):

$$M / M_0 = e^{\mu t} \quad (3)$$

Donde M es la masa celular en un tiempo t , M_0 es la cantidad de masa celular en al inicio, y μ es la tasa de crecimiento.

Combinando las ecuaciones 1 y 2 se obtiene (ecuación 4):

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau} \quad (4)$$

Se han realizado simulaciones para las bacterias *Escherichia coli*, *Bacteria lactica*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* (prot.), *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp. tomando datos experimentales de la base de datos ComBase construida entre la Food Standards Agency y el Institute of Food Research de Reino Unido; el USDA Agricultural Research Service y su Eastern Regional Research Center de EE.UU.; y el Australian Food Safety Centre of Excellence. Esta base de datos se encuentra disponible en <http://www.combase.cc/>.

Se muestran, a continuación los resultados obtenidos para simulaciones bajo diferentes condiciones de movimiento según los parámetros que se mencionan, para cada tipo de bacteria.

4.1 *Escherichia coli*

Organismo: *Escherichia coli*
 Sustrato: Verdura o fruta y sus productos (En tempeh¹)
 Temperatura: 30°C
 pH: 4,9
 NaCl: No indicado

Parámetros de simulación:

$T_a = 0$, $T_d = 2$

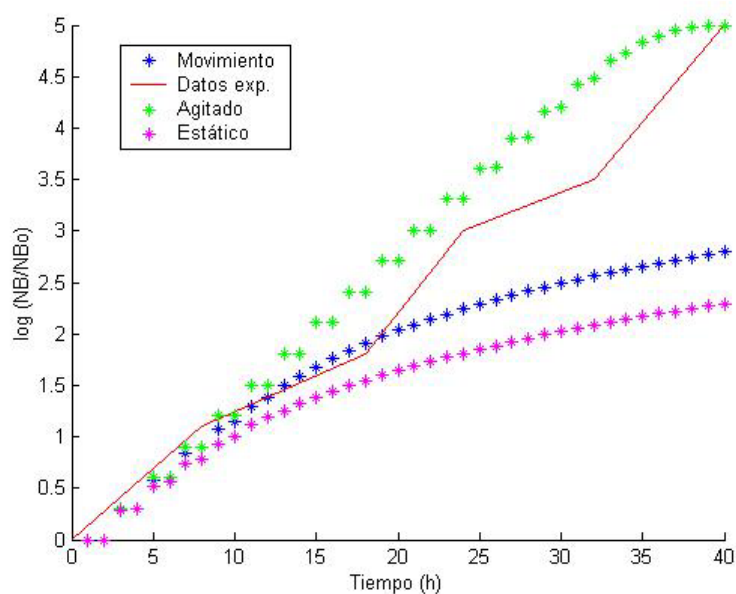


Figura 5. Simulación de crecimiento de *Escherichia coli* en tempeh a 30°C, con parámetros $T_a = 0$, $T_d = 2$

4.2 *Escherichia coli*

Organismo: *Escherichia coli*
 Sustrato: Medio de cultivo² (En BHIB)
 Temperatura: 6°C
 pH: 5,5
 NaCl: 0,5 %

Parámetros de simulación:

$T_a = 24$, $T_d = 7$

¹ Alimento que resulta de la fermentación controlada cocinando porotos de soja con el hongo *Rhizopus oligosporus*

² Sustancia líquida o gelatinosa que contiene nutrientes en los que se cultivan microorganismos o tejidos con fines científicos.

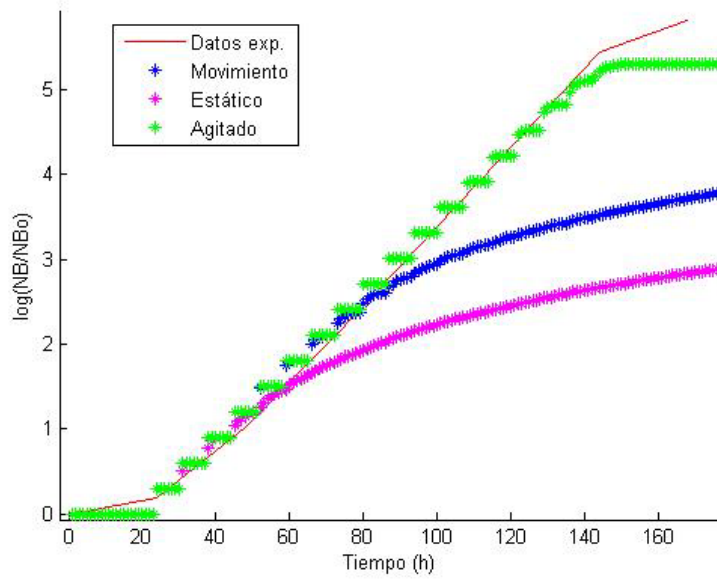


Figura 6.. Simulación de crecimiento de *Escherichia coli* en BHIB a 6°C, con parámetros $T_a = 24$, $T_d = 7$.

4.3 *Escherichia coli*

Organismo: *Escherichia coli*
 Sustrato: Medio de cultivo (En BHIB)
 Temperatura: 19°C
 pH: 7,2
 NaCl: 0,5 %

Parámetros de simulación:

$T_a = 2$, $T_d = 2$

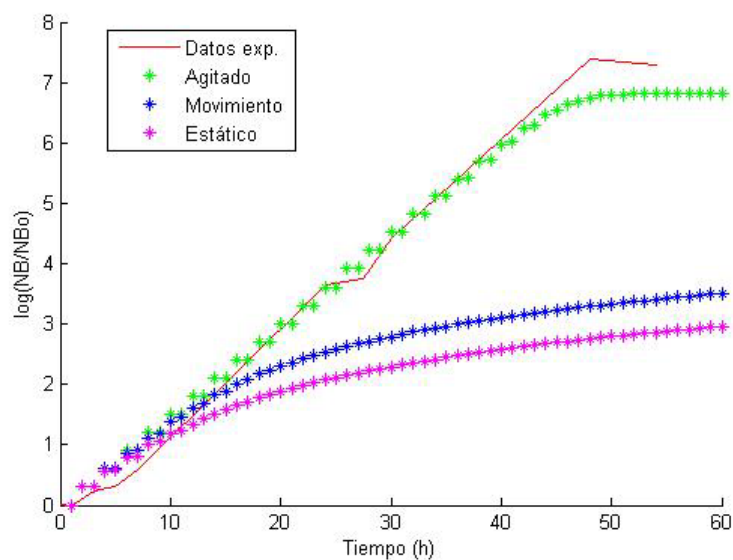


Figura 7. Simulación de crecimiento de *Escherichia coli* en BHIB a 19°C, con parámetros $T_a = 2$, $T_d = 2$

4.4 Bacterias ácido Lácticas

Organismo: bacteria ácido láctica
 Sustrato: Medio de cultivo (en TSB +0.6 % Extracto de levadura)
 Temperatura: 25°C
 pH: 7,2
 NaCl: No indicado

Parámetros de simulación:

$T_a = 0$, $T_d = 1$

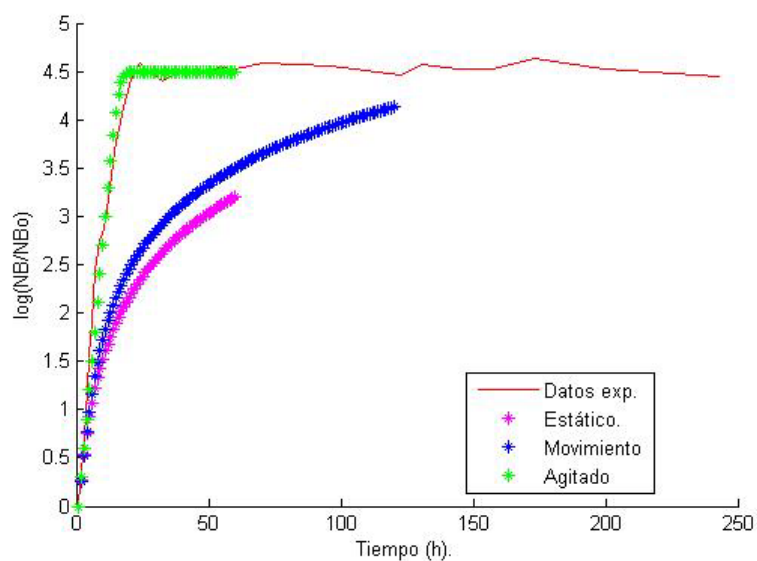


Figura 8. Simulación de crecimiento de bacteria ácido láctica en TSB a 25°C, con parámetros $T_a = 0$, $T_d = 1$

4.5 *Staphylococcus aureus*

Organismo: *Staphylococcus aureus*
 Sustrato: Medio de cultivo (En BHIB)
 Temperatura: 19°C
 pH: 6
 NaCl: 12,5 %

Parámetros de simulación:

$T_a = 24$, $T_d = 12$

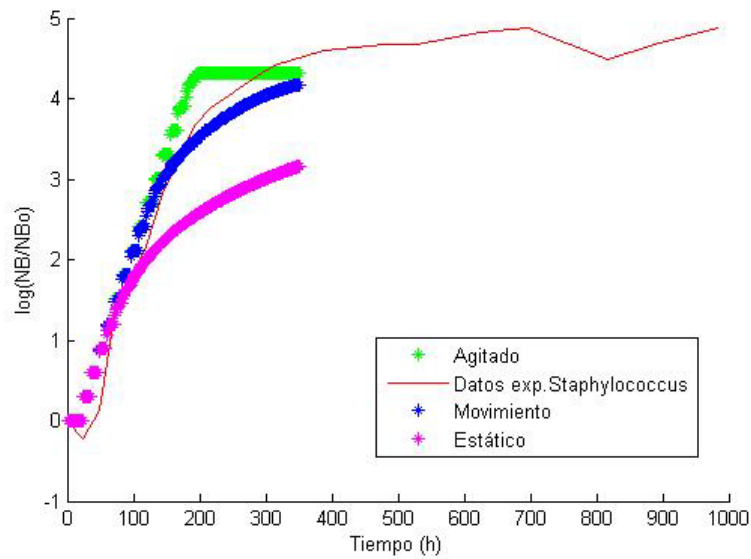


Figura 9. Simulación de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en BHIB a 19°C, con parámetros $T_a = 24$, $T_d = 12$.

4.6 *Clostridium botulinum* (prot.)

Organismo: *Clostridium botulinum* (prot.)
 Sustrato: Medio de cultivo (En caldo)
 Temperatura: 25°C
 pH: 4,7
 NaCl: 0,5 %

Parámetros de simulación:

$T_a = 95$, $T_d = 7$

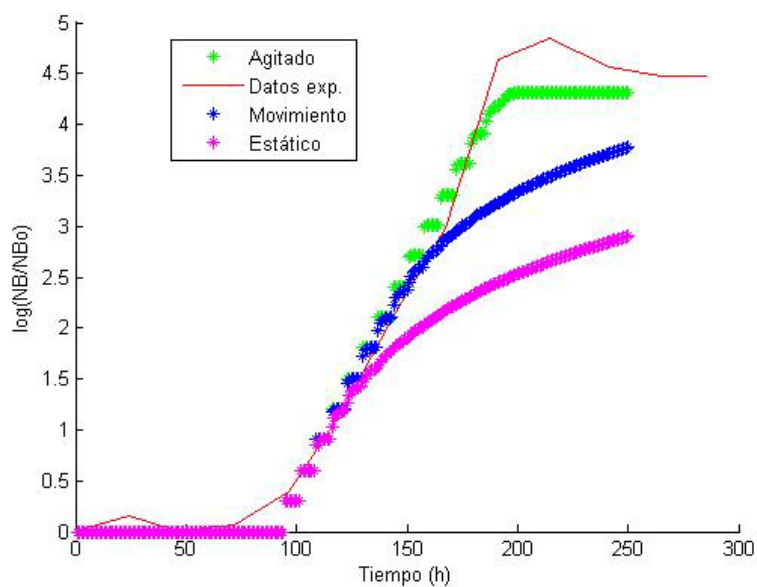


Figura 10. Simulación de crecimiento de *Clostridium botulinum* (prot.) en caldo a 25°C, con parámetros $T_a = 27$, $T_d = 7$.

4.7 *Enterobacteriaceae*

Organismo: *enterobacteriaceae*
 Sustrato: Aves (En pavo)
 Temperatura: 7°C
 pH: 6
 NaCl: No indicado

Parámetros de simulación:

$T_a = 60$, $T_d = 10$

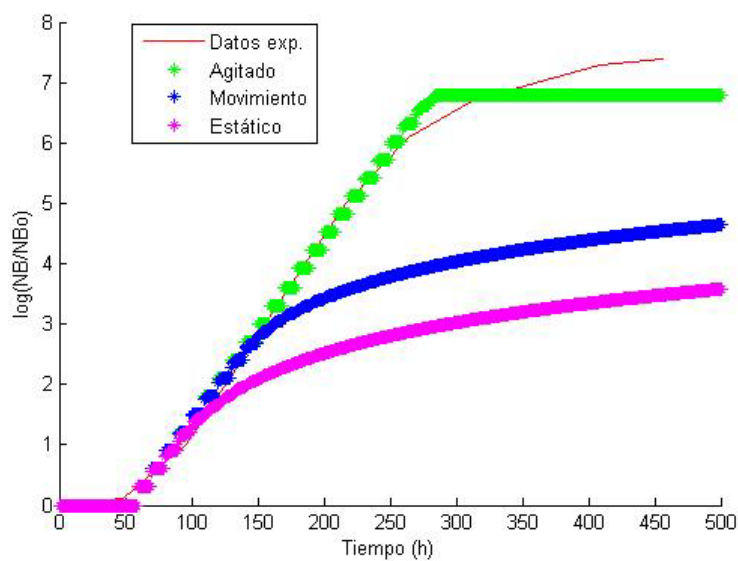


Figura 11. Simulación de crecimiento de *Enterobacteriaceae* en pavo a 7°C, con parámetros $T_a = 60$, $T_d = 10$.

4.8 *Salmonella Spp.*

Organismo: *Salmonella spp*
 Sustrato: Medio de cultivo (En caldo)
 Temperatura: 7°C
 pH: 7
 NaCl: No indicado

Parámetros de simulación:

$T_a = 22$, $T_d = 14$

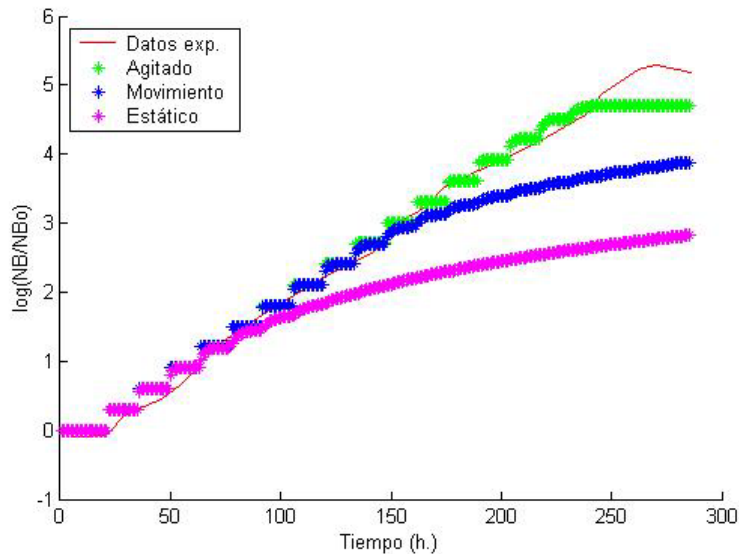


Figura 12. Simulación de crecimiento de *Salmonella* sp. en caldo a 7°C, con parámetros $T_a = 22$, $T_d = 14$.

5 CONCLUSIONES

Los modelos de simulación permiten formular modelos basados en un conjunto de reglas programables que no se adaptan a ningún formalismo matemático. Cuando se estudian sistemas particulares para los que hay una detallada información experimental, se espera que el modelo incluya los pormenores del comportamiento de los individuos y del entorno. Como ejemplo de lo que se puede exigir a un modelo detallado, veamos los cuatro criterios básicos que Uchmanski y Grimm (1996) plantean para diferenciar un “genuino” modelo de individuos: 1) la complejidad del ciclo vital del individuo debe estar representada; 2) debe incluirse una representación explícita de la dinámica de los recursos; 3) el tamaño de la población debe definirse por números naturales; y 4) es necesario representar la variabilidad de los individuos coetáneos.

El algoritmo presentado permite realizar las curvas de crecimiento de bacterias en función del tiempo real, lo que representa una ventaja respecto del Monte Carlo, que reproduce las curvas en función del tiempo de Monte Carlo, que es difícil de relacionar con el tiempo real (Larcher y Cattaneo, 2006; Cattaneo *et al.*, 2007).

El algoritmo desarrollado reproduce satisfactoriamente los resultados experimentales para el caso de simulaciones con movimiento de tipo agitado turbulento. Respecto a las simulaciones con movimiento browniano y sin movimiento, se observa que se reproducen bien las fases de lag y el inicio de la fase de crecimiento exponencial. Se considera probable que los desajustes se deban a que las simulaciones se basan en un sistema bidimensional y no en un sistema tridimensional, como lo es la realidad.

Para las bacterias estudiadas fue posible establecer los valores de tiempo de lag y tiempo de duplicación, mencionados en los resultados (figura 5, figura 6, figura 7, figura 8, figura 9, figura 10, figura 11, figura 12):

Escherichia coli, en tempeh, a 30°C - Tiempo de lag = 0 horas y tiempo de duplicación = 2 horas.

Escherichia coli, en BHIB, a 6°C - Tiempo de lag = 24 horas y tiempo de duplicación = 7 horas.

Escherichia coli, en BHIB, 19°C - Tiempo de lag = 2 horas y tiempo de duplicación = 2 horas.

Bacteria lactica en TSB + 0,6% extracto de levadura, a 25°C, Tiempo de lag = 0 horas y tiempo de duplicación = 1 horas

Staphylococcus aureus en BHIB a 19°C, Tiempo de lag = 24 horas y tiempo de duplicación = 12 horas.

Clostridium botulinum (prot.), en caldo, a 25°C, Tiempo de lag = 95 horas y tiempo de duplicación = 7 horas.

Enterobacteriaceae, en pavo, a 7°C, Tiempo de lag = 60 horas y tiempo de duplicación = 10 horas.

Salmonella spp., en caldo, a 7°C, Tiempo de lag = 22 horas y tiempo de duplicación = 14 horas.

REFERENCIAS

- Alber, M. S., Kiskowski, M.A., Glazier, J.A., and Jiang, Y., On Cellular Automaton Approaches to Modeling Biological Cells, en J. Rosenthal and D.S. Gilliam (Eds.), *Mathematical Systems Theory in Biology, Communication, and Finance*, IMA 134:1-40, Springer-Verlag, New York, 2003.
- Cattaneo, C. A.; Larcher, L.; Togo, S.; Chaillou, L. Aplicación de método de Monte Carlo para el estudio de crecimiento de bacterias y levaduras. *Mecánica Computacional* XXVI: 3380-3393. 2007.
- Conway, J. H. Mathematical Games, *Scientific American*. 223:120-123, 1970.
- Ermentrout, G. B.; Edelstein-Keshet, L. Cellular automata approaches to biological modeling. *Journal of Theoretical Biology*. 160(1): 97-133. 1993.
- Gardner, M. The fantastic combinations of John Conway's new solitaire game 'Life', *Scientific American*, 223:120-123, 1970
- Larcher, L.; Cattaneo, C. A. Simulación de Crecimiento de Microorganismos Utilizando el Método de Monte Carlo. *Mecánica Computacional* XXV: 2505-2518. 2006.
- Uchmałski, J.; Grimm, V. Individual-based modelling in ecology: what makes the difference? *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10): 437-441. 1996.
- Vadasz, P.; Vadasz, A. S. Predictive modeling of microorganisms: LAG and LIP in monotonic growth. *International Journal of Food Microbiology*. 102:257-275, 2005.
- Von Neumann, J. *Theory of self-reproducing automata*, (editada por A. W. Burks), University of Illinois Press, Urbana, 1966.
- Wolfram, S. Statistical mechanics of cellular automata, *Review of Modern Physics*, 55 : 601-604, 1983.
- Wolfram, S. *Cellular Automata and Complexity*, Addison-Wesley, Reading, 1994.
- Wolfram, S. *A New Kind of Science*, Wolfram Media, Champaign, 2002.