

Modelización basada en agentes: canibalismo microbiano

Agent-based modeling: microbial cannibalism

Marta Ginovart, Albert Tutusaus, M. Teresa Mas
 UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
marta.ginovart@upc.edu, albert_tuar@hotmail.com, maite.mas@upc.edu

Abstract

*En un sistema biológico, las interacciones entre los organismos pueden ser interespecíficas, cuando se relacionan organismos de la comunidad de diferente especie, o intraespecíficas. Estas interacciones, que pueden ser favorables, desfavorables o indiferentes para el crecimiento, la supervivencia, y/o la reproducción de los organismos, pueden determinar el área de distribución y la situación territorial de la especie, o tener un papel esencial en la evolución temporal de las poblaciones. Amensalismo, comensalismo, depredación, mutualismo, parasitismo, competencia y canibalismo son diferentes tipos de interacciones. Éstas pueden establecerse a lo largo del tiempo y en el espacio, siendo normalmente su ámbito de actuación local por proximidad o por contacto directo. Se pueden considerar como propias de las especies o como comportamientos probables, que se pueden dar o no, según como sean las condiciones ambientales en las que se encuentren los organismos. Todo esto hace que la modelización matemática más tradicional sufra de muchas limitaciones en este contexto, tanto para el tratamiento de las discontinuidades en el espacio y el tiempo, como para las adaptaciones o cambios repentinos que pueden sufrir los organismos como respuesta a los diversos factores a los que se puedan ver expuestos. El enfoque o perspectiva de los modelos computacionales basados en agentes (ABM) puede considerarse interesante en la representación de estas interacciones. El propósito de este trabajo es mostrar cómo se puede investigar y tratar con interacciones biológicas a través de ABM. En primer lugar se presentan algunos ejemplos de ABM implementados en un entorno de programación de acceso abierto y disponible desde la web, la plataforma multiagente NetLogo. A continuación, escogida una interacción intraespecífica particular, como es el canibalismo microbiano que exhibe la bacteria *Bacillus subtilis*, se presenta el caso de estudio, con el desarrollo del diseño conceptual del ABM para su representación, su implementación en NetLogo, y un análisis de sensibilidad unifactorial de alguno de sus parámetros para explorar la respuesta del sistema virtual bajo distintos escenarios de simulación. El simulador obtenido será manejado en el entorno académico (su origen fue un Trabajo Final de Grado de la titulación Ingeniería de Sistemas Biológicos de la Universitat Politècnica de Catalunya), será útil tanto en la docencia como para la realización de investigaciones vinculadas con estas interacciones microbianas, abriendo expectativas para futuras aplicaciones prácticas.*

*In a biological system, the interactions between organisms can be interspecific, when they relate organisms of the community of different species, or intraspecific. These interactions, depending on which each case, can be favorable, unfavorable or indifferent to the growth, the survival, and/or the reproduction of the organisms of the affected species, can determine their area of distribution and the territorial situation of the species, or have an essential role in the temporal evolution of the populations. Amensalism, commensalism, depredation, mutualism, parasitism, competition and cannibalism are different types of interactions. These interactions can be established over time and in space, normally their local scope of action is by proximity or direct contact. They can be considered as specific to the species or as probable behaviors, which may or may not occur, depending on the environmental conditions in which the organisms are found. All this means that the more traditional mathematical modeling has many limitations in this context, both for the treatment of discontinuities in space and time, and for adaptations or sudden changes that organisms may suffer as a response to factors to which they may be exposed. The approach or perspective of computational agent-based models (ABM) can be considered interesting in the representation of these interactions. The purpose of this paper is to show how biological interactions can be investigated and treated through ABM. First, some examples of ABM implemented in an open access programming environment and available from the web, the NetLogo multi-agent platform, are presented. Then, choosing a particular intraspecific interaction, such as the microbial cannibalism exhibited by *Bacillus subtilis* bacteria, the case study is presented, with the development of the conceptual design of the ABM for its representation, its implementation in NetLogo, and a sensitivity analysis unifactorial of some of its parameters to explore the response of the virtual system under different simulation scenarios. The simulator obtained for this study will be employed in an academic setting (its origin was a Final Degree Project in Biological Systems Engineering of the Universitat Politècnica de Catalunya), it will be useful both in teaching and for carrying out research linked to these microbial interactions, opening prospects for future practical applications.*

Palabras clave: Interacciones biológicas; canibalismo microbiano; modelo basado en agentes; NetLogo; simulación.
 Keywords: Biological interactions, microbial cannibalism, agent-based model, NetLogo, simulation.

1. Introducción

Dentro de cada sistema biológico, los organismos y las poblaciones mantienen un complejo conjunto de relaciones con el resto de individuos de la misma especie o de diferentes especies. Estas relaciones o interacciones, que en función de cada caso pueden ser favorables, desfavorables o indiferentes para el crecimiento, la supervivencia, y/o la reproducción de los organismos de las especies afectadas, pueden determinar el área de distribución, de la población o tener un papel esencial en la evolución temporal de la especie (Begon et al., 1999).

En el caso de que las interacciones se den entre individuos de una misma especie, éstas condicionan tanto la dinámica de la población como su propia distribución en el espacio.

1.1. Interacciones intraespecíficas e interespecíficas entre organismos de un sistema biológico

Hay muchas maneras de clasificar las diferentes interacciones biológicas entre poblaciones de distintas especies. Una de ellas es categorizarlas como interacciones positivas y negativas (Ricklefs, 1998). Las positivas son ese conjunto de interacciones beneficiosas para las dos partes que se denominan cooperativas. Normalmente tienden a aumentar la tasa de crecimiento de ambas poblaciones. Las negativas son ese conjunto de interacciones que perjudican a una o a las dos partes. Son varias las interacciones que se pueden establecer entre individuos de una misma especie (intraespecíficas) o individuos de especies diferentes (interespecíficas), como por ejemplo:

- *Amensalismo*: Cuando los individuos de una de las especies producen sustancias o toxinas, que van al medio e inhiben el crecimiento de la otra, o las otras, poblaciones de especies.
- *Comensalismo*: Una población obtiene un beneficio mientras que la otra no resulta afectada ni positiva ni negativamente. Se trata de otra relación unidireccional entre dos poblaciones, de signo contrario al amensalismo.
- *Competencia*: Interacción en la que un organismo consume un recurso que habría estado disponible para el consumo de otro organismo. Un organismo priva al otro de un recurso, y como consecuencia, éste último crece más lentamente, deja menos descendientes o tiene un mayor riesgo de morir. Esta relación puede ocurrir entre dos miembros de la misma especie o entre individuos de especies diferentes. Un tipo de competencia intraespecífica es el canibalismo, cuando se llega al consumo de individuos de la propia especie.
- *Depredación*: Una de las especies es la depredadora (la que se aprovecha) y la otra la presa (la que es penalizada). Existen varios tipos de depredación según el tipo de efecto negativo que el depredador cause a la presa, que puede ser su muerte, pero también puede ser parasitada o ramoneada.
- *Mutualismo*: Cualquier asociación entre especies que aporte un beneficio mutuo. Se reconoce un mutualismo cuando dos especies se proporcionan la una a la otra una tasa de natalidad más elevada, una tasa de mortalidad más baja, o unas capacidades de carga (densidad de población máxima con unos determinados recursos) más elevadas. Existen mutualismos simbióticos, cuando la relación entre las dos poblaciones implicadas es estrecha, y llega incluso a ser un contacto celular durante gran parte de la vida de los organismos de ambas poblaciones, y mutualismos no simbióticos.

En la Tabla 1 se muestra cómo afecta cada tipo de interacción a las dos poblaciones implicadas. Para representar estas interacciones biológicas en un modelo es fundamental que se puedan controlar para los diferentes organismos que configuran las diferentes poblaciones, las características específicas y las estrategias de comportamiento que se podrían o no desarrollar, según sea la situación particular que cada organismo este soportando. También es imprescindible poder controlar explícitamente el espacio, ya que son interacciones locales y se dan por contacto directo o por proximidad entre organismos. A su vez, las características del entorno que encuentran los organismos cambian con el tiempo y pueden desencadenar, o no, la aparición de estas interacciones.

Interacción	Población A	Población B
Amensalismo	0	-
Comensalismo	0	+
Competencia	-	-
Depredación	+	-
Mutualismo	+	+

Tabla 1: Clasificación de interacciones biológicas que se pueden establecer entre dos poblaciones (+ positiva, - negativa, 0 neutra)

1.2. Modelización basada en agentes

Los modelos basados en agentes (ABMs, acrónimo que proviene de su denominación en inglés de “Agent-Based Models”) son modelos que describen a las partes que configuran un sistema como entidades autónomas y discretas, y focalizan toda su atención en caracterizar estas entidades mediante reglas de comportamiento, permitiendo que estas partes interactúen entre ellas y con el entorno en el que se hallan.

La modelización basada en agentes muchas veces es referenciada también como modelización basada en el individuo (IBM, acrónimo que proviene de su denominación en inglés, “Individual-Based Model”) cuando se trata de un caso particular de ABM en el sentido que el agente deja de ser genérico y se convierte en algo tan concreto y preciso como un organismo o ser vivo (Grimm y Railsback, 2005). Algunos consideran estos modelos como ABMs biológicos. Consisten en un cierto número de individuos u organismos (que pueden o no pertenecer a la misma clase de objetos) definidos a partir de parámetros característicos y comportamientos específicos ligados a su biología o ciclo vital, en un ambiente en el cual suceden las interacciones entre individuos, o entre individuos y medio en el que se encuentran los recursos energéticos o sustancias diversas.

Si visualizamos el estudio de sistemas formados por seres vivos (poblaciones de animales, plantas, o microorganismos) bajo la perspectiva de los ABMs, los individuos que se consideran como base de la modelización se identificarán con los diferentes tipos de partes discretas que configuran el sistema a estudiar. Cada uno de estos individuos tiene sus propias características (sexo, edad, masa, tamaño, volumen, descendientes y/o ascendentes, estado del proceso de reproducción, capacidad de reproducción, reservas energéticas, posición en el espacio, etc.) y reglas de comportamiento (movimiento, búsqueda y captura de recursos, aprovechamiento o metabolización de los recursos obtenidos, emparejamiento o no para la reproducción, mutación, enfermedad, envejecimiento, muerte,...).

Esta manera de visualizar el sistema a investigar contrasta de manera significativa con las técnicas de modelización más clásicas a partir, por ejemplo, de ecuaciones diferenciales o en diferencias. Los ABMs, que conceptualmente pueden parecer simples en su concepción y direc-

tos en su formulación, pueden llegar a ser sorprendentes y espectaculares en sus realizaciones; por ejemplo en la posibilidad de considerar y controlar a pocos individuos (singulares) en un sistema y que sean capaces de alterar la dinámica de la población, o de diseñar e implementar diferentes tipos de preferencias en el consumo de substratos o en las interacciones entre individuos, provocando estas preferencias diferentes de uso una variación significativa de la evolución del conjunto, entre otras posibilidades. El tratamiento del espacio en la modelización continua, pasa por ecuaciones con derivadas parciales, limitando por ejemplo el número de opciones relativas a movimientos individuales, mientras que con la metodología de los ABMs, el movimiento de los individuos puede ser implementado siguiendo criterios o reglas concretas y varias. Los dominios en los que los individuos “viven” pueden ser considerados dominios reticulados controlando pequeñas parcelas o celdas espaciales, con propiedades o características propias locales que se pueden observar y modificar de manera directa, dentro de un espacio bidimensional o tridimensional (Ginovart et al., 2012; Grimm y Railsback, 2005).

Los primeros ABMs se desarrollaron de manera ocasional e independientemente los unos de los otros (Kaiser, 1979), y su uso no se inició de manera consensuada y rápida, sino de manera progresiva y relativamente lenta, utilizando nomenclaturas diversas y con unas primeras definiciones generales y abstractas (Grimm y Railsback, 2005). Uchmanski y Grimm (1996) propusieron los siguientes cuatro criterios para reconocer los ABMs biológicos (criterios que aún a día de hoy se pueden tener en consideración en un proceso de modelización):

- ✓ El grado de complejidad del ciclo vital del individuo que se modeliza tiene que ser significativo. Los individuos de la mayoría de especies varían significativamente durante el transcurso de su ciclo de vida. Su percepción del entorno, reproducción y muerte pueden variar en función de la edad, de los diferentes recursos disponibles en el ambiente (algunos nutrientes, otros productos tóxicos), de la densidad poblacional, así como de las interacciones que se pueden establecer con otros individuos presentes en su entorno local.
- ✓ La dinámica de los recursos explotados por los individuos debe ser representada explícitamente, ya que el desarrollo de los individuos se ve condicionado por los recursos que éstos encuentran en su entorno local (no puede desestimarse la retroalimentación entre individuos y recursos).
- ✓ El número de individuos del sistema es el tamaño de la población y tienen que ser contabilizados de manera discreta, así que el valor tiene que ser necesariamente un número entero. Sin embargo, a veces se encuentran en ABMs algunos algoritmos computacionales que utilizan el valor como real, como estrategia de programación y computación.
- ✓ Los posibles factores o medidas de variabilidad en el grupo de individuos de una misma edad o estado del ciclo vital deben ser considerados, ya que individuos de un mismo grupo pueden desarrollar estrategias diferentes de comportamiento determinadas por estos factores.

Los ABMs, aún ofreciendo múltiples ventajas a la hora de investigar sistemas formados por entidades discretas y vivas, presentan una serie de características particulares que podrían ser clasificadas como desventajas, y que es conveniente comentar. Una de ellas es la complejidad de los ABMs en el sentido de que tratan con muchas variables, parámetros y reglas que se aplican a varias entidades, en diferentes escalas temporales y espaciales lo cual hace que sean menos manejables que muchos modelos analíticos. Desarrollar un ABM desde el inicio en un contexto nuevo se podría describir como una aventura transitando por un camino inexplorado. La segunda desventaja es la falta de un marco teórico general y conceptual para el ABM, que

ha comportado un uso muy amplio de hipótesis específicas para cada estudio particular, la cual cosa ha frenado el desarrollo coherente y compacto de esta metodología (DeAngelis y Gros, 1992; Grimm y Railsback, 2005). También, si bien el ABM como técnica ofrece muchas oportunidades interesantes para abrir fronteras de investigación en una amplia gama de disciplinas, hay una serie de cuestiones que requieren una atención rigurosa al tratar con los datos de salida ya que producen un rico conjunto de datos multidimensionales en varias resoluciones temporales y espaciales (Lee et al., 2015). No obstante, la experiencia adquirida durante los últimos años en la creación y el uso de los ABMs, ha permitido identificar algunas pautas o indicaciones para trabajar con éxito en el marco de un proyecto con ABMs en el ámbito académico, tanto en el contexto docente como en el de investigación, así como en contextos distintos (Railsback y Grimm, 2012; Ginovart et al., 2012; Ginovart 2015; Macal y North, 2013; Shiflet and Shiflet, 2014; Kaul and Ventikos, 2015; Wilensky and Rand, 2015; Goroehowski, 2016; Williams, 2018).

Según cómo se perciba la realidad, se pueden desarrollar y formular diferentes modelos conceptuales bajo la perspectiva y metodología propia de los ABMs. Por ser modelos computacionales, el diseño obtenido tiene que ser transformado en un algoritmo, en un código, y en un programa de ordenador para que pueda ser ejecutado y analizado. Para esta última fase, sería deseable que los conocimientos de ingeniería informática no fueran tan determinantes como para poder impedir la implementación de un ABM y la construcción del correspondiente simulador. Generalmente la expertez del modelizador recae más en el propio sistema a investigar que en la ingeniería informática. El uso de alguna plataforma ya preparada y diseñada expresamente para la implementación de los ABMs podría facilitar la tarea de programación que requiere este tipo de modelo computacional y la construcción del simulador, favoreciendo al mismo tiempo la divulgación de esta metodología de modelización. Por todo esto, universidades y centros de investigación han desarrollado diferentes aplicativos o plataformas donde poder trabajar con ABMs. El uso de simulaciones ABM para la investigación y gestión de biosistemas está creciendo actualmente debido a la aparición de entornos informáticos específicos para realizar estas simulaciones (Abar et al., 2017). Es fundamental que la implementación del ABM se realice en un entorno de programación que permita obtener y analizar las salidas del simulador, facilitando así su verificación. La parametrización, calibración, y análisis de sensibilidad permitirán valorar la adecuación del modelo-simulador al estudio del sistema representado, así como permitirán avanzar en la solución de problemas propuestos o en la obtención de respuestas a preguntas formuladas sobre el sistema representado. De entre las distintas opciones que existen hoy en día, la plataforma NetLogo (Wilensky, 1999) de acceso libre es muy adecuada para ser utilizada en el ámbito académico, puesto que dispone de elementos interesantes tanto para poder ilustrar el uso de los ABMs, como para poder trabajar activamente con ellos a distintos niveles, tanto en el ámbito docente como en el de investigación (Wilensky y Rand, 2015; Abar et al., 2017).

1.3. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

- I. Examinar y discutir simuladores de referencia de la biblioteca de modelos de NetLogo que incluyan representaciones de interacciones biológicas intraespecíficas o interespecíficas, a la vez que conocer otros ABMs en el contexto de microbiología implementados en este entorno de programación.
- II. Escogida la interacción intraespecífica de tipo canibalismo de la especie bacteriana *Bacillus subtilis*:
 - a) Diseñar el modelo conceptual basado en agentes que pueda representar esta interacción

microbiana en dos protocolos de cultivo, (cultivo cerrado o “Batch”, un cultivo sin entradas ni salidas, y cultivo semi-abierto o “Fed-batch”, un cultivo con entradas periódicas de nutriente).

- b) Construir el correspondiente simulador implementando el modelo en la plataforma NetLogo, mostrando las herramientas y recursos que este entorno de programación ofrece.
- c) Realizar un primer análisis de los resultados generados por el simulador para avanzar en la comprensión cualitativa del modelo, inspeccionando algunas de las salidas que proporciona y realizando el análisis de sensibilidad unifactorial para uno de los parámetros implicados en este modelo computacional.

2. La plataforma NetLogo y los ABMS

La plataforma de acceso libre NetLogo es un entorno de programación multiagente que permite la simulación de fenómenos naturales y sociales. Fue creado por Uri Wilensky en 1999 y está en desarrollo de forma continua por el “Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling”. Acerca del nombre de esta plataforma, la parte de “Logo” se debe a que NetLogo es un dialecto del lenguaje de programación Logo, y la parte “Net” pretende evocar la naturaleza descentralizada e interconectada de los fenómenos que se pueden modelar con NetLogo. Existe mucha información y tutoriales diversos sobre NetLogo en su página web (<http://ccl.northwestern.edu/netlogo/>). Las nuevas versiones que aparecen (actualmente la versión NetLogo 6.0.4) tienen todo lo que tenían las anteriores y mejoras sustanciales, lo cual hace que cada vez sea más atractivo utilizar esta plataforma NetLogo en la docencia (y también en la investigación), siendo uno de los entornos más utilizados para el desarrollo de ABMs. NetLogo está escrito principalmente en Scala, con algunas partes en Java. El código de Scala se compila en el código de bytes de Java y es completamente interoperable con Java y otros lenguajes JVM. Como se ejecuta en la máquina virtual Java funciona en la mayoría de las plataformas principales actuales (Mac OS X, Windows y Linux).

NetLogo es un entorno específico que permite la implementación de forma eficiente de los ABMs y es particularmente útil para modelar sistemas complejos que evolucionan en el espacio y el tiempo. Los diseñadores de modelos pueden dar instrucciones a miles de agentes para que operen de manera independiente, entre ellos y con el entorno bidimensional (2D) reticulado descrito con las coordenadas cartesianas. Existe también la versión tridimensional (3D) que permite incluir la tercera coordenada espacial. Dispone de una animación automática ligada al modelo, con controles de salida gráfica y numérica que se muestran durante la ejecución de la simulación a tiempo real (Figura 1). También permite el almacenamiento de datos simulados en ficheros tipo texto que pueden ser recuperados en el final de la simulación, permitiendo el análisis estadístico de los datos generados.

2.1. Herramientas y recursos de programación

Los diferentes elementos que participan y caracterizan esta plataforma NetLogo son:

- **Turtles** (agentes o individuos): Son las entidades autónomas y discretas que se mueven por el mundo. Por ejemplo humanos en una ciudad, peces en un tanque o microorganismos en una placa de Petri, individuos que interaccionan entre sí y con el entorno donde se encuentran. Es capaz de diferenciar familias de agentes para diseñar comportamientos individualizados para una de las familias definidas.

- **Patches** (celdas espaciales o parcelas): Son el resultado de la discretización del espacio (mundo) en el que se mueven los individuos o agentes. Cada pequeña porción cuadrada del mundo se denomina “*patch*”, y cada uno de estos está identificado por las coordenadas cartesianas enteras que corresponden a su punto central.
- **Links** (relaciones entre agentes): Un enlace conecta dos individuos y éstos son a veces también llamados nodos. El enlace se dibuja como una línea entre los dos individuos y no tienen una ubicación, ni se consideran en ninguna celda o parcela, y no se puede encontrar la distancia de un enlace a otro punto. Ejemplos de enlaces pueden ser por ejemplo la relación de un progenitor con sus descendientes, o la relación entre dos descendientes de un mismo progenitor.
- **Observer** (observador): El observador que ha creado y controla el sistema virtual y que puede dar las instrucciones a las diferentes partes del sistema.

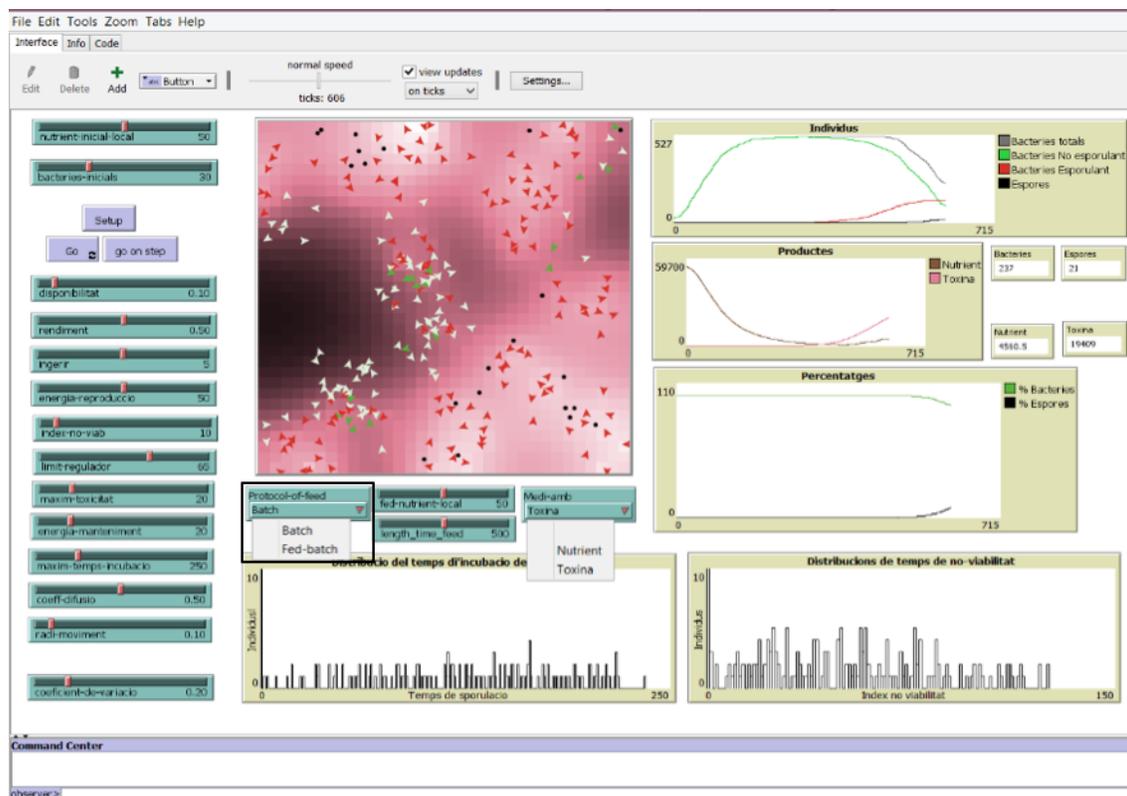


Figura 1: Captura de pantalla del simulador “MicrobialCannibalism” del caso de estudio desarrollado en este trabajo, implementado en la plataforma NetLogo donde se puede ver la parte de la interfaz que permite que el usuario pueda interactuar directamente, visualizar los resultados de la simulación y modificar valores de parámetros del modelo para volver a ejecutar una simulación.

NetLogo también ofrece varias herramientas, que facilitan el análisis del modelo implementado. Por ejemplo, “BehaviorSpace” es una herramienta de “software” integrada con NetLogo que permite realizar “experimentos virtuales” con un modelo implementado y que se utiliza para recopilar datos de múltiples ejecuciones paralelas de éste modelo bajo escenarios distintos. “BehaviorSpace” ejecuta el modelo computacional variando sistemáticamente la configuración inicial del modelo a través de la lectura de valores distintos de parámetros de entrada, registrando los resultados de cada ejecución en un fichero que puede ser utilizado posteriormente por hojas de cálculo o programas estadísticos. Este proceso que se conoce como “barrido de

parámetros”, permite explorar un conjunto de comportamientos posibles del modelo y determinar qué combinaciones de parámetros o configuraciones causan los comportamientos de interés o bajo estudio.

El uso de NetLogo pasa por trabajar con tres ventanas o pestañas diferentes que se encuentran al abrir el programa: i) la ventana de la interfaz de la entrada (“Interface”) que se muestra con un ejemplo en la Figura 1, ii) la ventana donde se encuentra información relativa al modelo o el texto de descripción del qué ha sido su diseño (“Info”), y iii) la ventana donde se escribe directamente el código de computación (“Code”).

NetLogo es un lenguaje y un entorno de programación que facilita la evolución continuada de los modelos. Una vez los modelos han sido implementados, estos no suelen permanecer estáticos, sino que están sometidos a un proceso de revisión y mejora iterativa, a una aproximación sucesiva al que puede ser el modelo final, en el que se van modificando detalles que acercan la representación virtual al fenómeno real que se quiere modelizar. Es prácticamente imposible obtener un ABM completamente satisfactorio en todos los aspectos del sistema que puede representar y en una primera versión de éste. El hecho de estructurar adecuadamente el código y de poder incorporar y eliminar procedimientos y variables en las iteraciones sucesivas ayuda enormemente en todas las fases del proceso de modelización que hay que ir cubriendo. En la interfaz de un simulador (Figura 1) podemos añadir nuevos elementos y distintos tipos de controles según sea la necesidad o interés en el desarrollo del modelo:

- **Button**, al pulsarlo se ejecuta el código que tiene asociado.
- **Slider**, barra de desplazamiento o control deslizante que define una variable global numérica y permite asignarle un valor.
- **Chooser**, selector desplegable que define también una variable global, pero la selección de su valor se hace mediante una lista desplegable creada previamente.
- **Input**, caja de entrada que define una variable global que proporciona interfaces adecuadas para poder contener número, cadenas y colores.
- **Monitor**, permite mostrar la evolución de los valores de una variable en tiempo real o de ejecución.
- **Plot**, permite mostrar gráficos de varios tipos como poligonales, diagramas de dispersión o histogramas.
- **Output**, proporciona un área para la salida de texto o información que se quiere especificar mientras se va ejecutando la simulación.
- **Note**, para añadir etiquetas de texto en la interfaz.

En el contexto de los *patches* se puede definir, entre otras opciones, las dimensiones del mundo o espacio simulado, la posición del origen de coordenadas, la medida visual de estos reticulados, o la topología del mundo (mundos finitos pero no necesariamente limitados, fijando o no condiciones periódicas de contorno, considerando paredes rígidas o paredes permeables en el dominio espacial). Cada *patch* almacena un conjunto de propiedades básicas y características a las que se puede acceder para supervisarlas con el botón derecho del ratón ubicado sobre el *patch* en cuestión, seleccionando *Inspect patch*. La ventana que se abre muestra una visión local y ampliada del *patch* seleccionado y sus propiedades: coordenadas en el mundo (*pxcor*, *pycor*), color (*pcolor*), etiqueta que muestra y su color (*plabel*, *plabel-color*), y las variables que el modelo le haya atribuido (Figura 2). De la misma manera, también en el contexto de los

turtles o agentes inicialmente creados o generados durante la simulación, se puede hacer una observación individual de sus atributos (clicando el botón derecho del ratón sobre uno de los individuos y activar *Inspect turtle*). La ventana que se abre contiene todas las características que lo definen (Figura 2): *Who* (el número de identificación), *Color*, *Heading* (su orientación en el espacio), *Xcor*, *Ycor* (coordenadas cartesianas de la posición que ocupa en el espacio), *Shape* (forma o dibujo que lo representa), *Label* y *Label-color* (etiqueta que el individuo mostrará en la pantalla), *Breed* (familia de individuos a la que pertenece), *Hidden* (indica si el individuo está oculto o es visible), *Size* (su tamaño), *Pen-modo* y *Pen-size* (características del rastro que los individuos pueden dejar o no en el dominio mientras se mueven), así como los valores de las variables individuales que caracterizan a este agente y que controla el modelo implementado como muestra la Figura 2.

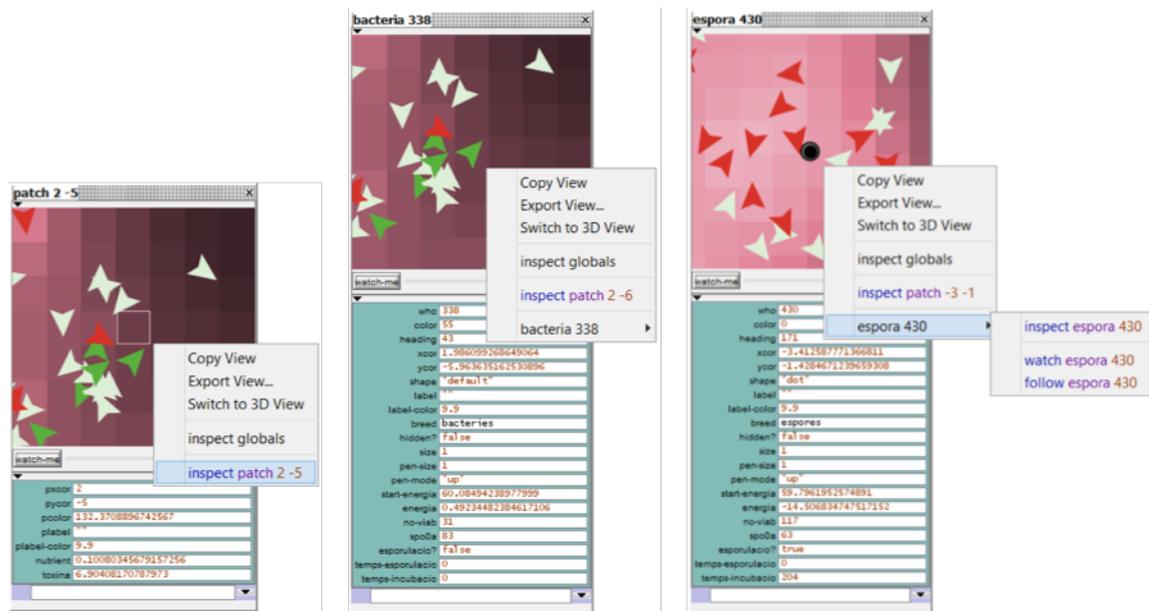


Figura 2: Ejemplos de las características de un *patch* o celda espacial y de las características de dos *turtles* o agentes de dos familias distintas (bacterias y esporas de *Bacillus subtilis*) que corresponden al simulador “MicrobialCannibalism” del caso de estudio en este trabajo. En el medio se controla la cantidad de nutriente y la cantidad de toxina. Para los agentes que pueden ser bacterias o esporas se controlan diferentes características: la energía inicial del individuo (*start-energia*), la energía en ese momento temporal (*energia*), el tiempo en situación desfavorable que ha soportado el individuo hasta ese momento y que si es suficientemente grande lo puede conducir a un cambio de estado o de familia, pasando de ser bacteria a espora (*no-viab*), cantidad de un producto que almacena en su interior (*spo0A*), si ha iniciado o no el proceso de esporulación, el tiempo que de permanencia en el proceso de esporulación y en el proceso de incubación, dos procesos de transformaciones metabólicas modelizados durante el ciclo vital de estas bacterias.

En <http://sites.google.com/site/manualnetlogo/> se puede encontrar un manual de NetLogo (en castellano) que permite familiarizarse rápidamente con este lenguaje de programación así como referencias a publicaciones diversas (por ejemplo, Railsback y Grimm, 2012; Wilensky y Rand, 2015; García-Vázquez y Sancho-Caparrini, 2016). También incluye una galería de ejemplos de ABMs que pertenecen a áreas temáticas muy diversas (arte, biología, química, física, ciencias de la tierra, juegos, filosofía, psicología, ciencias sociales,...) preparados para ser ejecutados y están destinados a ser ejemplos de codificación y documentación en el ámbito de los ABMs (<http://ccl.northwestern.edu/netlogo/models/>).

2.2. Ejemplos de simuladores que representan interacciones biológicas en la plataforma NetLogo

En una revisión de la biblioteca de modelos del ámbito de la biología de NetLogo (<http://ccl.northwestern.edu/netlogo/models/>) se han encontrado simuladores relacionados con interacciones biológicas específicas de tipo distinto: la depredación a través del modelo “Wolf sheep predation”, la cooperación y la competencia intraespecífica para un mismo recurso energético en el modelo “Cooperation”, y la competencia interespecífica en la ocupación del espacio en el modelo “Tabonuco Tagrumo Hybrid”.

El modelo “Wolf sheep predation”

“Wolf sheep predation” es un modelo que explora la estabilidad del sistema “depredador-presa” incorporando la interacción de tipo depredación establecida de forma local, directamente con el control del espacio (en un dominio bidimensional), aconteciendo únicamente la depredación de una presa por parte de un depredador cuando estos dos individuos coinciden en el espacio y en el tiempo (Wilensky, 1997). En este caso se consideran ovejas como presas y lobos como depredadores. El sistema se denomina inestable si se produce la extinción de los individuos de la población de una de las dos especies, o la de los individuos de ambas especies. Mientras que el sistema es estable si individuos de las dos especies que configuran el sistema tienden a mantenerse con el paso del tiempo, todo y las fluctuaciones en la medida de las respectivas poblaciones.

Este modelo presenta dos variaciones principales que dan lugar a dinámicas poblacionales diferentes. En la primera variación, los lobos y las ovejas se mueven por el dominio al azar. Cada paso de tiempo (paso de programa) tiene un coste de energía para los lobos, y éstos tienen que comer ovejas para reponer la energía. Cuando se quedan sin energía, mueren. En buenas condiciones, cada lobo y cada oveja tienen una probabilidad fija de reproducirse en cada paso de tiempo, para permitir que las poblaciones continúen. Se supone que el recurso energético de las ovejas no está limitado. En la segunda variación se incluye el control de la hierba en el espacio bidimensional, aparte del control que ya se hacía sobre los lobos y las ovejas. El comportamiento de los lobos es idéntico a la primera variante, pero esta vez las ovejas también tienen que comer hierba para obtener la energía que permita su mantenimiento y reproducción. Cuando las ovejas se quedan sin energía mueren. Una vez la hierba es consumida y después de un determinado tiempo, ésta se renueva. Esta segunda variación, más compleja que la primera, hace que el sistema sea estable, mientras que con la primera variación, el sistema siempre es inestable, con la desaparición primero de las presas y posteriormente de los depredadores, o con la desaparición primero de los depredadores con el posterior crecimiento exponencial de las presas (dependiendo de la ocupación del espacio y del azar que condicionan el encuentro entre presas y depredadores).

Este tipo de modelo ha sido ampliamente utilizado en la comunidad científica, tanto para mostrar el sistema depredador-presa como para introducir los ABMs. Son notables las opciones que este modelo ofrece en el ámbito académico para la enseñanza y aprendizaje de dinámicas de poblaciones que interaccionan representadas a partir de distintos procesos de modelización (Wilensky y Reisman, 2006; Ginovart, 2014).

El modelo “Cooperation”

En el modelo “Cooperation” los individuos compiten entre ellos por el recurso energético que proporciona el medio en el que se encuentran (Wilensky, 1997). Los individuos más eficientes al

conseguir y utilizar estos recursos se reproducirán más frecuentemente, y por lo tanto, tendrán un mayor éxito evolutivo. El modelo incluye dos familias de individuos de una misma especie, los individuos “greedy” o “egoístas” y los individuos “cooperative” o “solidarios”. Cada uno de los dos tipos de individuos tiene una estrategia de alimentación distinta, un comportamiento diferente en el momento de conseguir el recurso energético común que se encuentra distribuido en el dominio y que se va regenerando bajo determinadas condiciones.

Con este modelo se pueden analizar las dos estrategias alimentarias y comprender las consecuencias que tienen cuando compiten por el recurso en un espacio bidimensional delimitado a lo largo del tiempo. El propósito es investigar a nivel cualitativo como se ve afectado el comportamiento de la población, en este caso vacas que se mueven en un dominio que representa un pasto con hierba cuando se modifican valores de parámetros involucrados en sus acciones individuales. El individuo tipo “egoísta” utilizará todo el alimento disponible que encuentra a su alcance local, mientras que el individuo tipo “solidario” utilizará el alimento disponible a su alcance local pero sin agotarlo completamente, dejando un remanente del recurso. La probabilidad de regeneración de este recurso que es la hierba es función del estado en que ésta se encuentra. El simulador genera evoluciones temporales diversas según sean los valores de las variables implicadas en el modelo, donde se puede observar sistemas donde, o bien es el colectivo “egoísta” el que se impone con éxito a corto o a largo plazo sobre el colectivo *solidario*, o bien al revés, es el colectivo “solidario” el que se impone con éxito, a corto o a largo plazo, sobre el colectivo “egoísta”. También es posible observar sistemas estables con la convivencia de los dos colectivos, o sistemas inestables con la desaparición de uno de los dos colectivos (Ginovart et al., 2011).

El modelo “Tabonuco Yagrumo hybrid”

El modelo “Tabonuco Yagrumo hybrid” representa de forma simple un sistema de dos especies de árboles, Tabonuco y Yagrumo, que compiten por el espacio libre en el bosque (Wilensky, 2006). En este caso, cada árbol del bosque es un *turtle* inmóvil y nace y vive en un *patch*. Se asume que un árbol sólo puede reproducirse en un *patch* vacío de los 8 *patches* que lo rodean, los que se encuentra en su entorno local más inmediato. En el dominio reticulado finito que se considera como espacio a controlar, si crecen más árboles hay menos espacio libre y menos *patches* para colonizar, y si mueren más árboles, entonces se consigue espacio abierto para otros árboles, liberando *patches*. Los árboles de Tabonuco crecen más lentamente que los de Yagrumo con tasas representadas por las variables “Tabonuco-growth-rate” y “Yagrumo-growth-rate”. Sin embargo, los árboles de Tabonuco sobreviven a los de Yagrumo, se reproducen de manera más rápida y son los primeros a ocupar un *patch* vacío. Esta relación está representada por la variable “Tabonuco-outgrows-Yagrumo” en la simulación, los árboles de Yagrumo al morir favorecen la implementación de árboles de Tabonuco. Al mismo tiempo, el modelo hace un seguimiento de la cantidad de carbono y nitrógeno aportados por los árboles ya que ellos producen estos recursos mediante la fotosíntesis y el resto de seres vivos del bosque utiliza estos recursos. Las variables “Carbon” y “Nitrógeno” calculan las cantidades de estos productos químicos que son producidos por los árboles. También el simulador considera la acción externa de los huracanes sobre los árboles, pudiendo provocar su muerte. Las variables “Hurricane-strength” y “Hurricane-interval” determinan la magnitud de la perturbación que causa el huracán y el paso de tiempo entre un huracán y el siguiente respectivamente, lo cual incide sobre la supervivencia de estos árboles. Los resultados de simulación de dos escenarios diferentes se pueden observar en la Figura ???. En un caso se muestra la estabilidad del sistema con un número de árboles de Tabonuco superior al de Yagrumo, sometido a una magnitud externa de perturbación por parte los huracanes del 40% y un intervalo de tiempo entre ellos de 20 unidades temporales

(pasos de tiempo). En el otro caso se observa que al aumentar la magnitud de perturbación de los huracanes hasta un 90 %, el número de árboles de Yagrumo aumenta y sobrepasa al número de árboles de Tabonuco (éstos mueren debido a los huracanes y son los árboles de Yagrumo los que se imponen en la ocupación del bosque).

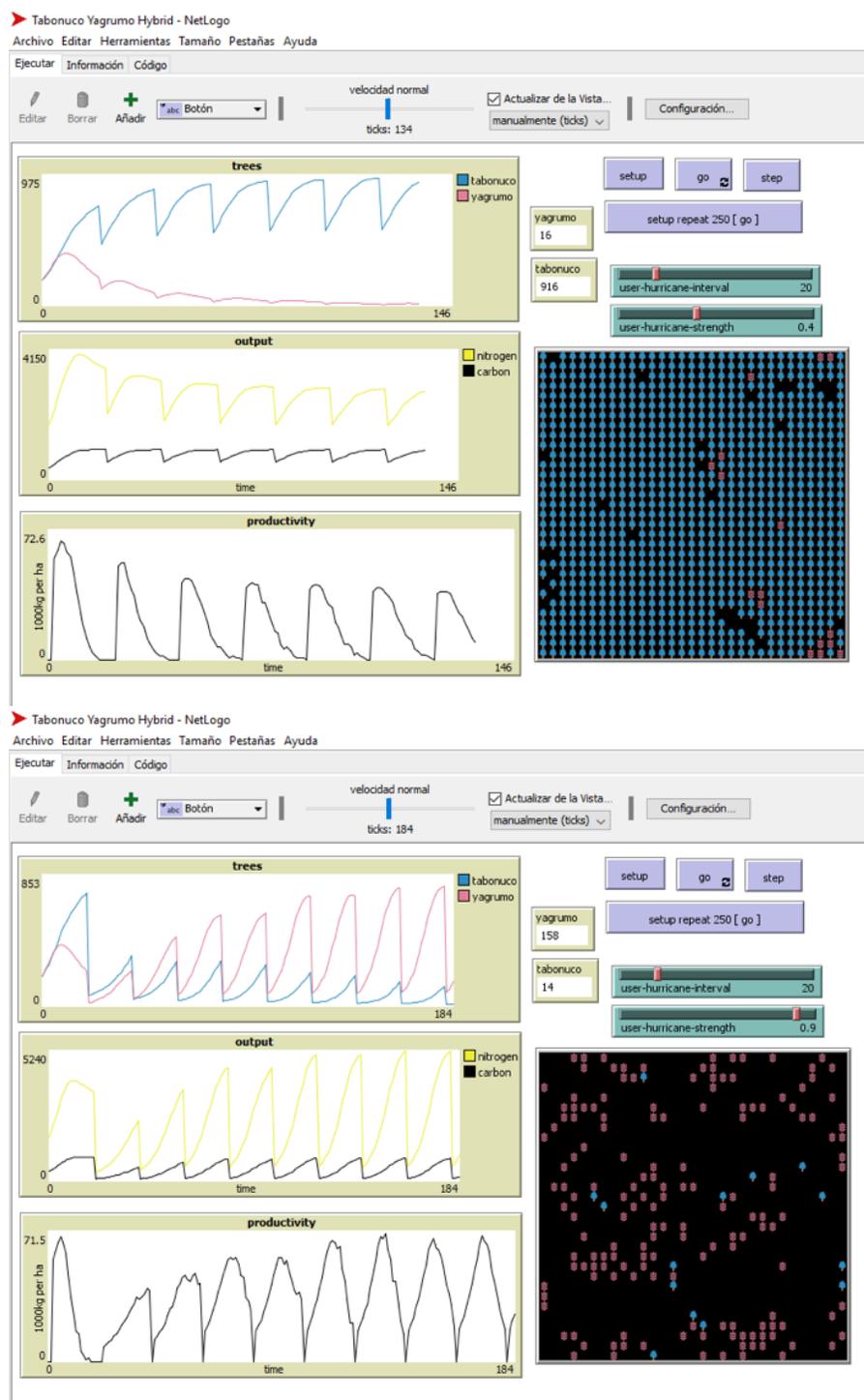


Figura 3: Evolución de las poblaciones de Tabonuco y Yagrumo con un grado de perturbación por huracanes del 40 % (superior) y del 90 % (inferior).

2.3. Interacciones microbianas, ABMs y NetLogo

Hasta hace unos años, no se consideró especialmente necesario o relevante utilizar los ABMs para tratar y estudiar cultivos microbianos creciendo en un entorno líquido. Generalmente se suponía que este crecimiento microbiano se realiza con poblaciones puras o axénicas (con una sola especie de microorganismo asumiendo que todos los microorganismos son exactamente iguales) en un medio perfectamente homogéneo. No obstante, recientemente se ha constatado que microorganismos o grupos de microorganismos que son descendientes o genéticamente idénticos a un único progenitor, como por ejemplo una colonia bacteriana que ha surgido a partir de un único organismo, pueden mostrar heterogeneidad biológica en el comportamiento individual (González-Cabaleiro et al., 2017).

El comportamiento de una población microbiana emerge del comportamiento de todos los microorganismos existentes en un momento determinado y que la configuran, un comportamiento acumulativo de interacciones que son a nivel individual, interacciones bióticas (entre células) e interacciones abióticas (entre células y medio ambiente circundante). Al mismo tiempo, las dinámicas a nivel de sistema o población (perspectiva macroscópica) limitan el comportamiento de las células (perspectiva microscópica). Considerando estas ideas, los ABMs también pueden facilitar la comprensión y la formulación de las conexiones entre los comportamientos y características de los microbios individuales y las propiedades observadas a nivel de población (Ginovart et al., 2018), así como las interacciones de los microbios dentro de la población y con su entorno local cambiante a lo largo del tiempo (Hellweger y Bucci, 2009; Hellweger et al., 2016).

Es importante remarcar que la individualidad de los microbios es cada vez más reconocida como crucial en muchos sistemas biológicos. La heterogeneidad individual, las interacciones locales que acontecen en condiciones específicas, los comportamientos adaptativos que desarrollan los microorganismos de forma individual atendiendo a acondicionamientos diversos, entre otros, son temas que cada vez tienen más presencia en proyectos de investigación y acaparan una mayor atención dentro de la comunidad científica. Durante el año 2017, la revista científica *Frontiers in Microbiology* activó una edición especial para aglutinar trabajos alrededor de una línea de investigación que visualizó o identificó con el título: “Research Topic. The Individual Microbe: Single-Cell Analysis and Agent-Based Modelling”:

<https://www.frontiersin.org/research-topics/5193/the-individual-microbe-single-cell-analysis-and-agent-based-modelling>

En el pasado, esta perspectiva de modelización había sido limitada por la carencia de observaciones fiables a nivel celular individual y de experimentos diseñados expresamente con esta finalidad. De hecho, hasta hace poco no se han podido identificar los microbios y registrar sus actividades, principalmente invisibles incluso al laboratorio, como por ejemplo el consumo de nutrientes o la producción de toxinas a nivel de la célula individual. Los adelantos tecnológicos recientes en microbiología de células individuales, utilizando citometría de flujo, fluorescencia de rayos X, controles exhaustivos y detallados sobre una única célula, entre otras opciones, permiten la observación de estos individuos dentro de sus poblaciones.

Son muchas las maneras en las que podemos encontrar los microorganismos en la naturaleza, y diversas son las formas que tienen de crecer, desarrollarse, organizarse o de invadir el espacio susceptible de ser colonizado por ellos. En medio líquido y con los microorganismos libres en este medio tenemos el crecimiento planctónico, no obstante, es una realidad que una gran parte de poblaciones microbianas se encuentran viviendo en medios o entornos que dan lugar a crecimientos no planctónicos. Existen sistemas que tienen una estructura semi-sólida o sólida

y heterogénea, medios no líquidos ni homogéneos donde los microorganismos crecen de manera desigual formando colonias o agrupaciones. Cada una de estas colonias individuales muestra un comportamiento diferente de las otras como consecuencia, principalmente de la competencia local que existe entre los organismos de cada colonia y por los efectos que generan localmente los productos que se excretan. Para poder desarrollar un modelo que incorpore la competencia por los recursos locales y no uniformemente repartidos, o las diferencias e interacciones entre células individuales, es interesante y atractivo poder incorporar ideas que se encuentran en la metodología de los ABMs. Por ejemplo, la accesibilidad o no de nutrientes, así como su difusión en el medio son factores importantes que condicionan la estructura que exhiben las agrupaciones microbianas o las colonias. Por ejemplo, la competencia microbiana intraespecífica por un recurso ha sido representada por un ABM implementado en la plataforma NetLogo (Font y Ginovart, 2016).

Es interesante poder explorar otros tipos de interacciones microbianas que también acontecen en estas comunidades microbianas, la proximidad y el contacto directo entre microorganismos confinados en un espacio limitado favorecen que acontezcan distintos tipos de interacciones. Por ejemplo, el trabajo de Wilmoth et al. (2018) desarrolla y utiliza un ABM para representar el comportamiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* creciendo en superficie, ayudando en la interpretación de patrones de organización espacial de dos mutantes del sistema de secreción tipo Type VI (T6SS) de *P. aeruginosa* observados experimentalmente cuando crecen bajo el confinamiento espacial. Las entidades básicas y discretas del modelo representan células bacterianas de los dos mutantes, el mutante T6SS+ atacante y el mutante T6SS- susceptible a la secreción del tipo Type VI. Las células activas T6SS+ dirigen la inyección de toxinas hacia las células susceptibles T6SS- que no tienen inmunidad, provocando su muerte por contacto directo. Las simulaciones obtenidas con la implementación del ABM implementado en la plataforma NetLogo han sido comparadas y discutidas con datos experimentales (Wilmoth et al., 2018).

Las comunidades microbianas formadas por múltiples especies se pueden organizar a través de estructuras microbianas cuyas características parecen surgir de la coordinación entre los microorganismos. Investigar y comprender si estos microorganismos cooperan y/o compiten entre sí es fundamental para cualquier modelo de predicción. La heterogeneidad espacial habitual en comunidades muy pobladas por múltiples especies se suele revelar de forma que las especies que tienen diferente actividad metabólica ocupan regiones distintas, o bien, que las especies pueden ir cambiando su actividad metabólica según sean las condiciones de su entorno local. Por ejemplo, la existencia de especies aerobias y anaerobias en regiones oxigenadas y anóxicas de una comunidad microbiana respectivamente, o bien a la posibilidad de que una especie pueda activar o desactivar la vía metabólica aerobia o anaerobia según sea en ese momento su entorno inmediato, da lugar a interesantes aplicaciones de los ABMs.

Dos ejemplos, entre otros, de ABMs microbianos implementados en NetLogo que abordan estas cuestiones se encuentran en los trabajos de Banitz et al., (2015) y Araujo et al., (2016). El trabajo de Araujo et al., (2016) presenta el modelo INDISIM-Paracoccus sobre la actividad de bacterias desnitrificadoras en un bioreactor que trabaja bajo diferentes protocolos de manejo del cultivo, con un control del oxígeno para poder activar y/o desactivar el metabolismo aeróbico y/o metabolismo anaeróbico de estas bacterias según las condiciones de su entorno. A partir de un conjunto de resultados experimentales obtenidos para estas bacterias, el uso de la opción del “BehaviourSpace” de NetLogo facilitó el proceso de parametrización y calibración de este modelo. El trabajo de Banitz et al. (2015) presenta una versión revisada y simplificada del ABM microbiano denominado INDISIM-SOM (previamente publicado e implementado en el lenguaje Fortran), que permite estudiar la actividad de microorganismos heterotróficos descomponedores

y la actividad de microorganismos autotróficos nitrificadores, actividades que acontecen en la materia orgánica del suelo. El simulador permitió representar y estudiar las dinámicas de estas dos poblaciones microbianas, así como las evoluciones temporales de los diferentes nutrientes y productos utilizados y/o excretados por estas dos poblaciones que trabajan conjuntamente en los procesos implicados en los ciclos de carbono y nitrógeno del suelo, participando en la circulación de nutrientes en los ecosistemas.

En el contexto microbiológico, son aún muchos los procesos o las situaciones no comprendidas en su totalidad, todavía no se sabe con seguridad cómo se tienen que programar, manipular o cultivar células individuales para asegurar la aparición de un determinado comportamiento colectivo requerido o deseado. Estos modelos computacionales discretos, junto con un trabajo experimental adecuado, pueden facilitar el abordaje de estos problemas, ofreciendo un marco para simular y experimentar virtualmente con estos sistemas.

3. Caso de estudio: canibalismo de la bacteria *Bacillus subtilis*

3.1. Canibalismo bacteriano

El canibalismo es un tipo de competencia intraespecífica, y se da entre individuos de la misma especie cuando la capacidad nutricional del medio es desfavorable para la población, es decir, cuando la cantidad de nutriente es insuficiente para la población. Provocando y aprovechando la muerte directa o indirectamente de individuos de la misma especie, se evita la extinción de la población y del medio (eventualmente).

El comportamiento de canibalismo de la especie bacteriana *Bacillus subtilis* que se produce durante el proceso de esporulación fue estudiado por González-Pastor et al. (2003). Se trata de una bacteria con la habilidad de formar una resistente endospora protectora cuando las condiciones ambientales son desfavorables (López et al., 2009). En situación de estrés por falta de nutriente en el medio, un número determinado de miembros de la colonia *B. subtilis* empieza el proceso de esporulación gobernado por el regulador genético llamado Spo0A-ON como sistema de resistencia a las condiciones adversas del entorno (Grimsley et al., 1994; Molle et al., 2003). Se sincronizan sus patrones de expresión génica con la expresión de operón *skf*, que permite la síntesis y liberación de una toxina (*skf killing factor*) inductora de la muerte celular por *lisis*. Simultáneamente, sintetizan un transportador tipo ABC de membrana, codificado por el mismo operón, que aporta resistencia a esta toxina. A continuación, se produce la muerte de aquellas bacterias de la misma colonia que no han empezado el proceso de esporulación (Spo0A-OFF) como consecuencia del efecto que tiene la toxina sobre ellas. Con su muerte se produce también su *lisis* y regreso al medio de los productos que las constituían. Las bacterias con menor concentración del regulador genético Spo0A empiezan antes el proceso de esporulación y las que tienen mayor concentración tardan más tiempo en empezarlo. De este modo las bacterias que tardan más tiempo en iniciar el proceso de esporulación, se ven afectadas por la toxina producida por las bacterias que se encuentran inmersas en este proceso de esporulación (Fujita et al., 2005). Las bacterias que aún no han acabado el proceso de esporulación utilizan (consumen) los productos provenientes de la degradación celular de las bacterias muertas por *lisis*, consiguiendo nutrientes que le permiten continuar el proceso de diferenciación celular (esporulación). Estas esporas después de un tiempo y bajo ciertas condiciones pueden volver a la forma bacteriana, permitiendo la supervivencia local de esta población bacteriana. Resumiendo, el canibalismo como depredación entre individuos de la misma especie, acontece cuando una colonia de bacterias se ve amenazada debido a la pobreza de nutrientes del medio y se ve obligada a llevar a cabo el proceso de esporulación para sobrevivir, aprovechando los productos

de la lisis que las bacterias que han sido muertas como consecuencia de las acciones de otras bacterias (González-Pastor, 2010).

3.2. Descripción del modelo para representar el canibalismo de la bacteria *Bacillus subtilis*

La descripción del modelo se efectúa de acuerdo con el protocolo Overview - Design concepts - Details (ODD) propuesto por Grimm et al. (2006, 2010), aceptado por la comunidad científica para hacer las descripciones de los ABMs, como un intento de uniformizar la información que se presenta y facilitar su comprensión. La explicación y comunicación de un modelo computacional se encuentra muy ligada a la implementación que se hace del modelo conceptual. Disponer del código de computación garantiza la reproductibilidad de los resultados simulados, y disponer de una descripción completa y bien estructurada del modelo avala la posibilidad de poder implementar el modelo conceptual en cualquier entorno de programación.

Overview

Propósito. Se pretende representar y explorar la dinámica de un tipo de interacción biológica que acontece en el mundo microbiano, la depredación intraespecífica o canibalismo que desarrolla una colonia de bacterias de la especie *Bacillus subtilis*, analizando un conjunto de factores y parámetros que afectan y hacen variar la dinámica de la población bajo protocolos de manejo del sistema diferentes que condicionan la disponibilidad de nutriente, favoreciendo o no condiciones de estrés para estas bacterias.

Entidades, variables de estado y escalas. El modelo consta de dos entidades fundamentales: los individuos que configuran una población y las celdas espaciales que forman el dominio en el que esta población de individuos se encuentra.

Los individuos son entidades autónomas y discretas con características propias que van cambiando con el tiempo. Hay dos tipos de individuos, las bacterias y las esporas. Las bacterias son individuos con capacidad de moverse en el dominio en el cual se encuentran, de ingerir nutriente que encuentran a su alcance, de reproducirse en caso de que su estado vital sea óptimo y de llevar a cabo el proceso de esporulación cuando las condiciones son adversas, mientras que las esporas no realizan ninguna acción, se encuentran en el medio (manteniendo su posición, con posibles pequeñas perturbaciones al entorno de ésta). Una bacteria puede iniciar el proceso de esporulación, y acabar transformándose en una espora al finalizar este proceso. En esta versión de modelo no se considera el proceso de que una espora transcurrido un tiempo suficientemente largo y con condiciones óptimas en su entorno se vuelva a convertir en una bacteria (esta opción podría formar parte de una posterior versión del modelo).

Inicialmente los individuos están representados gráficamente en el dominio que habitan por símbolos triangulares (icono por defecto de NetLogo) de color verde claro, son las bacterias con un estado óptimo (Figura 1 y 2). Cuando empieza a haber escasez de nutriente en el medio, las bacterias que no pueden consumir y sufren restricciones energéticas de forma continuada, inician el proceso de esporulación (unas lo hacen antes que otras, según sea su cantidad interna del regulador genético *spo0A*), y su representación gráfica en el dominio cambia de color y pasan a ser de color rojo. Durante el proceso de esporulación estas bacterias empiezan a sintetizar una toxina que liberan al medio y que afecta a las bacterias que no han empezado todavía su proceso de esporulación. Estas bacterias afectadas por la toxina liberada se pueden diferenciar visualmente en el dominio porque son representadas en el dominio con un color verde oscuro (esta toxina no afecta a las que se encuentran esporulando). Una vez finalizado el proceso

de esporulación, las bacterias convertidas en esporas pasan a ser representadas por símbolos circulares de color negro (Figura 1 y 2). Se representa el sistema a estudiar como un cultivo virtual con bacterias y esporas en un medio donde habrá nutriente y toxina.

El dominio espacial donde se encuentra el cultivo virtual es un espacio bidimensional cuadrado, reticulado y limitado, con dimensiones $IQ \times IQ \mu m^2$. Se encuentra dividido en pequeños cuadrados (*patches*) de $1 \mu m^2$. Es un conjunto de celdas espaciales que serán caracterizadas por su ubicación en el dominio (coordenadas cartesianas enteras (x, y) del centro del *patch*), y por la cantidad de nutriente y de toxina que contienen (dos variables que dependen del tiempo). Cada *patch* está caracterizado por la cantidad de nutriente, cantidad de toxina, y por el número de bacterias que contiene. Existe la posibilidad de visualizar el mundo virtual atendiendo a una coloración diferente de los *patches* del medio si queremos representar la cantidad de nutriente que se encuentra en cada *patch* con gradientes de color marrón, o la cantidad de toxina presente en cada *patch* con gradientes de color rosa.

La evolución temporal del sistema se encuentra dividida en intervalos iguales llamados pasos de tiempos (*ticks* o pasos de programa)..

Perspectiva del proceso y programación. El modelo ha sido implementado en el entorno de programación que ofrece la plataforma NetLogo, y el esquema de su implementación es:

- ▷ Inicialización: Lectura de los datos de entrada y distribución del nutriente y de los individuos iniciales (bacterias), con la definición de variables globales y específicas.
- ▷ Acciones sobre cada uno de los individuos que configuran la población (bacterias o esporas), y sobre las celdas espaciales que determinan el medio en el que se encuentran los individuos durante la evolución temporal del sistema.
- ▷ Recogida, almacenamiento, y representación gráfica de los valores simulados de las variables que son controladas.

El conjunto de reglas y acciones que llevan a cabo los individuos tipo bacteria, y que se producen a cada paso de tiempo (o paso de programa, “tick”) son las siguientes:

- Movimiento
- Consumo de nutriente
- Reproducción
- Control de la viabilidad
- Esporulación
- Producción de toxina
- Degradación y lisis con retorno de componentes en el medio.

Las acciones que llevan a cabo los individuos tipo espora, y que se producen a cada paso de tiempo son únicamente las relacionadas con el mantenimiento de su posición en el espacio.

Las acciones que se llevan a cabo con los *patches* del dominio, y que se producen a cada paso de tiempo son:

- Difusión de nutriente
- Difusión de toxina

Las acciones individuales que se producen en relación al consumo de nutriente o al regreso de sustancias al medio que pueden ser consideradas como nutriente como consecuencia de la lisis de las bacterias, sólo afectan a la celda espacial en la que se encuentra la bacteria, y la variable que controla la cantidad de nutriente a cada celda (y en el sistema) es actualizada en el momento en que se modifica su valor. En caso de producción de toxina, esta se deja en el mismo *patch* que ocupa la bacteria que la produce, modificando tanto su concentración local como la cantidad total del sistema, en el mismo momento de ser producida. El número de individuos de cada tipo (bacterias o esporas) que hay en cada celda (y en el sistema) también se actualizan cada vez que son modificados como consecuencia del movimiento de las bacterias, o por la muerte y lisis de las bacterias.

“Design concepts”

Principios básicos. En relación al diseño conceptual del modelo, se ha utilizado fundamentalmente la información procedente de los trabajos titulados “High -and low- threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*” (Fujita et al., 2005), “Cannibalism by sporulating bacteria” (Gonzalez-Pastor et al., 2003), y “Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*” (González-Pastor, 2010), completada de forma más puntual con información bibliográfica diversa incorporada en las referencias.

Emergencia. El principal fenómeno que emerge de este modelo es la supervivencia de los organismos de una población, como bacterias o como esporas, en un medio pobre en nutriente (su recurso energético). El defecto de nutriente en el medio influye en la inicialización del proceso de esporulación por parte de las bacterias, y la cantidad de la proteína Spo0A que hay en cada bacteria influye en el tiempo que tarda esta bacteria en empezar el proceso de esporulación, y a producir y excretar toxina al medio. El comportamiento global de la población emerge de la competición por el nutriente y de la caracterización individual en relación a la cantidad interna de la proteína Spo0A asignada inicialmente a cada bacteria, que actúa como regulador esencial de entrada en el proceso de esporulación y en su tolerancia para sobrevivir a la toxina que encuentre en su entorno. La emergencia global del sistema bacteriano es el resultado de las interacciones de tipo local a cada *patch* y del comportamiento a cada paso de tiempo de cada bacteria.

Interacción. Los individuos interaccionan entre ellos a través de las celdas espaciales con la competencia por el nutriente y con la afección que pueden sufrir unas bacterias por la toxina producida y excretada al medio por otras bacterias. Afectando las características de las celdas espaciales en cuanto a la cantidad de nutriente y cantidad de toxina, se generan interacciones entre individuos de forma local (en cada *patch*). En lo referente a la observación del sistema, obtenemos una evolución temporal de las bacterias y de las esporas, y la distribución de estos individuos en las celdas espaciales del dominio, condicionada por la difusión de nutriente y de toxina (a partir de la aparición de bacterias esporulando).

Sensibilidad. A pesar de que no se ha modelado explícitamente el mecanismo de detección de sustancias, se asume que los individuos son capaces de percibir la cantidad de nutriente y toxina que hay en el *patch* en el que están situados. Como consecuencia, el consumo de nutriente se ajusta a la disponibilidad local de nutriente. Además, la detección local y continuada de toxina en el entorno del individuo lo penaliza. También se supone que el individuo conoce su propia masa, para adaptar su consumo, mantenimiento y reproducción según sea su valor.

Aleatoriedad. Encontramos aleatoriedad en muchos de los procesos implementados mediante el uso de variables aleatorias, mayoritariamente variables aleatorias con distribución de probabi-

alidad normal y algunas con distribución de probabilidad uniforme, tanto en la caracterización individual como en la realización de una acción individual específica. Las variables aleatorias normales se definen con una media poblacional y una desviación típica poblacional que corresponden a parámetros del modelo. La asignación de las desviaciones típicas poblacionales se hace a partir del valor del coeficiente de variación especificado. En cada paso de tiempo los individuos son llamados a realizar sus acciones de forma secuencial con una lista confeccionada de forma aleatoria, evitando así tener individuos “privilegiados” con un orden de actuación específico frente a otros.

Los procesos o sucesos en los que interviene el azar están ligados a:

- La distribución del nutriente en el dominio
- La distribución inicial de las bacterias iniciales dentro del mundo virtual
- La energía inicial de las bacterias que configuran la población inicial
- La cantidad de proteína Spo0A que un individuo tiene en su interior
- La dirección y distancia de los movimientos de los individuos en el dominio
- La cantidad de nutriente que consume un individuo en cada paso de tiempo
- La energía necesaria para la reproducción de un individuo
- La entrada o no en el proceso de esporulación de una bacteria
- La finalización o no del proceso de esporulación
- La muerte por toxicidad de una bacteria

Observación. El comportamiento del sistema se visualiza mediante la recogida y representación de datos relacionados con la comunidad bacteriana a dos niveles, a nivel poblacional y a nivel individual: a) evoluciones temporales de la cantidad de nutriente, del número total de bacterias y número total de esporas (y los correspondientes porcentajes), del número de bacterias que están esporulando, del número de bacterias que no están esporulando, y de la evolución temporal de la cantidad de toxina en el medio, y b) distribuciones de propiedades individuales de las bacterias como los tiempos de incubación bacteriana y el tiempo de no-viabilidad bacteriana (Figuras 1 y 4). En la Tabla 2 se hace una compilación de las variables del modelo, junto con los valores máximo y mínimos y los predeterminados por defecto que se pueden modificar desde la interfície del simulador.

“Details”

Inicialización. Al inicio de la simulación un número de individuos (bacterias) que se puede escoger desde la interfície del simulador y se disponen aleatoriamente en el espacio. Se fijan también los valores iniciales de las variables o parámetros del modelo, como por ejemplo la masa de los individuos, la cantidad de energía, la cantidad de proteína Spo0A, el estado del individuo (si está esporulando o no), su estado de viabilidad, y la concentración inicial de nutriente. Asimismo, se puede elegir el coeficiente de difusión del nutriente y de la toxina (parámetro del modelo que condiciona la velocidad en la redistribución de estos productos en las celdas del espacio), la distancia de movimiento de las bacterias, y el protocolo o modo de manejo del sistema activando o no una reserva externa de nutriente de forma que éste va entrando en el medio de forma periódica. Desde la interfície del simulador se pueden también modificar otros valores de parámetros implicados en el modelo y que se detallan a continuación.

Variable (código)	Mínimo	Máximo	Predeterminado
Nutriente-inicial-local	0	100	50
Bacterias-iniciales	0	100	30
Disponibilidad	0	1	0.10
Rendimiento	0	1	0.50
Ingerir	0	10	5
Energía-reproducción	0	100	50
Índice-no-viab	0	100	10
Límite-regulador	0	100	65
Máxima-toxicidad	0	100	25
Energía-mantenimiento	0	100	20
Máximo-tiempo-incubación	0	1000	250
Coefficiente-difusión	0	1	0.50
Radio-movimiento	0	1	0.1
Coefficiente-variación	0	1	0.20
Fed-nutriente-local	0	100	50
Length-time-feed	0	1000	500

Tabla 2: Valores de las variables

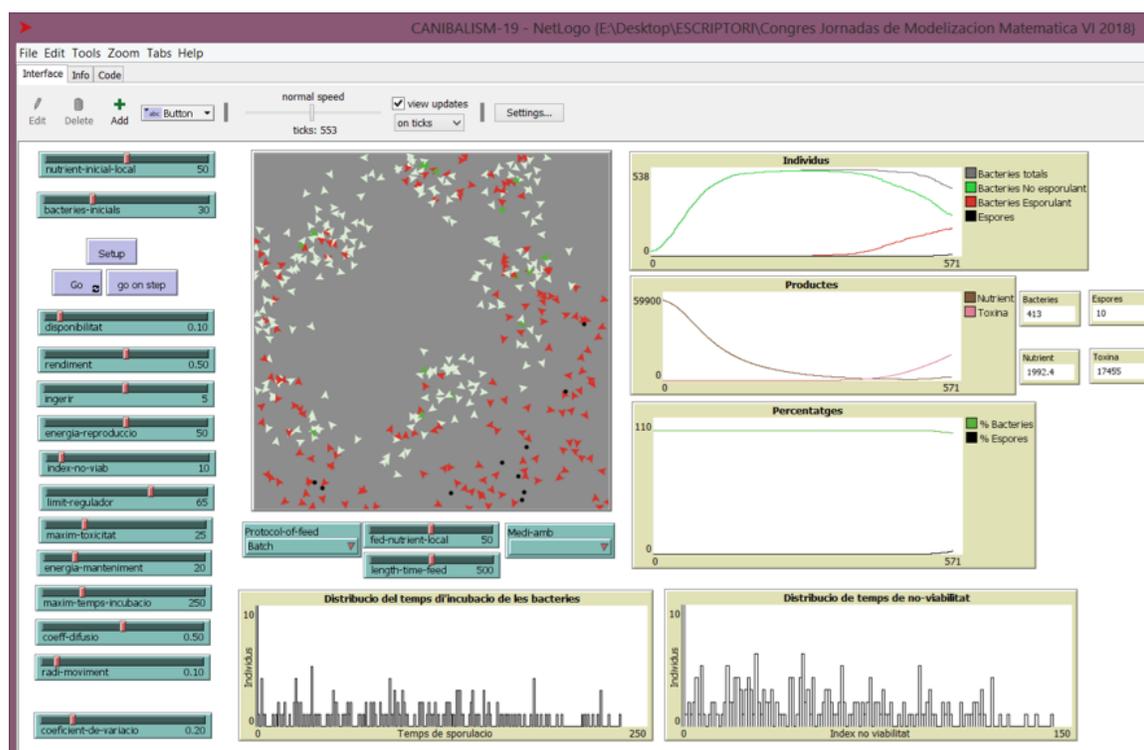


Figura 4: Captura de pantalla de la interfície del simulador “MicrobialCannibalism” donde se pueden ver los valores de los parámetros de entrada y la representación gráfica de diversas variables que permiten hacer un seguimiento del estado del sistema virtual representado con el modelo cualitativo desarrollado.

Variables relacionadas con el medio:

- *Nutriente-inicial-local*: Media poblacional de la variable aleatoria normal que se utilizará para asignar la cantidad de nutriente inicial presente en cada una de las celdas del dominio.
- *Bacterias-iniciales*: Número de bacterias iniciales que constituyen el inóculo para arrancar con el crecimiento microbiano.

- *Disponibilidad*: Porcentaje (expresado en tanto por uno) del nutriente presente en una celda espacial y que determina la cantidad máxima disponible que el individuo podrá utilizar para su consumo.
- *Coefficiente-difusión*: Coeficiente de difusión del nutriente y de la toxina que indica qué porcentaje del que hay en cada celda del dominio se reparte equitativamente entre las ocho celdas de su alrededor para representar el fenómeno de la difusión de estas sustancias en el medio,
- *Batch*: Protocolo de manejo de cultivo cerrado, donde no hay entrada ni salida de nutriente en el medio.
- *Fed-batch*: Protocolo de manejo de cultivo abierto, semi-continuo, donde hay una entrada periódica de nutriente al sistema desde el exterior y con una cierta periodicidad (entra nutriente en el medio en determinados pasos de tiempos).
- *Fed-nutrient-local*: Determina la cantidad de nutriente desde el exterior que entra al sistema en cada celda espacial
- *Length-time-feed*: Determina el periodo de tiempo entre entradas sucesivas de nutriente exterior al medio.

Variables relacionadas con los individuos-bacterias:

- *Rendimiento*: Porcentaje que determina la cantidad de energía que la bacteria obtiene a partir del nutriente consumido.
- *Ingerir*: Cantidad máxima de nutriente que una bacteria puede llegar a consumir en el periodo temporal considerado como un paso de programa.
- *Energía-reproducción*: Energía obtenida y acumulada por el individuo durante un tiempo a partir de la cual el individuo se puede reproducir.
- *Index-no-viab*: Tiempo máximo que la bacteria puede mantenerse sin conseguir energía suficiente antes de dejar de ser viable e iniciar el proceso de esporulación.
- *Límite-regulador*: Valor de la cantidad de proteína Spo0A que determina que bacterias empiezan el proceso de esporulación antes y cuales lo empezaran más tarde. Las bacterias que tienen cantidades internas de proteína inferiores a este límite, cuando las características del medio no son aptas para la supervivencia de las bacterias, es decir, han pasado cierto tiempo sin nutriente suficiente para satisfacer su mantenimiento, inician el proceso de esporulación.
- *Máxima-toxicidad*: Nivel máximo que un individuo puede tolerar de toxina en su entorno antes de morir y lisar.
- *Energía-mantenimiento*: Energía que la bacteria tiene que obtener a partir del nutriente ingerido para poder mantenerse adecuadamente, o para poder frenar el proceso de esporulación en el caso que la bacteria ya lo haya iniciado.
- *Máxim-tiempo-incubación*: Tiempo que dura el proceso de esporulación de una bacteria, y que una vez superado este tiempo se formará una espora.
- *Radio-movimiento*: Alcance máximo que puede tener el movimiento aleatorio de una bacteria.

- *Coefficiente-variación*: Coeficiente de variación que se utilizará en las distribuciones de probabilidades normales para fijar sus desviaciones típicas a partir de sus medias.

La Figura 5 muestra una captura de pantalla de la parte de código que corresponde a la definición de variables y a la inicialización del sistema.

```

* CANIBALISM-18 - NetLogo
File Edit Tools Zoom Tabs Help
Interface Info Code
Find... Check Procedures Indent automatically

globals [ total-nutrient total-toxina CV nutrient-per-ingerir nutrient-ingerit nutrient-disponible
total-bacteries bacteries-no-esporulant bacteries-esporulant total-espores
percentatge-bacteries percentatge-espores ]

turtles-own [ start-energia energia no-viab Spo0A esporulacio? temps-esporulacio temps-incubacio ]
breed [bacteries bacteria]
breed [espores espora]
patches-own [nutrient toxina]

to setup
clear-all
set CV coeficient-de-variacio
setup-patches
setup-bacteries
setup-espores

set total-nutrient sum [nutrient] of patches
set total-toxina sum [toxina] of patches

setup-output ;; setup the output file
reset-ticks
write-outputfile
end

to setup-patches
ask patches [
set pcolor grey
set nutrient abs ( random-normal nutrient-inicial-local (CV * nutrient-inicial-local) ) ]
set total-nutrient sum [nutrient] of patches
set total-toxina sum [toxina] of patches
end

to setup-bacteriae
create-bacteries bacteries-inicials [
set color green + 4
setxy random-xcor random-ycor
set energia abs ( random-normal (0.5 * energia-reproduccio) (CV * 0.5 * energia-reproduccio) )
set start-energia abs ( random-normal energia-reproduccio (CV * energia-reproduccio))
set no-viab 0
set Spo0A random 100
set esporulacio? false
set temps-incubacio 0]
set total-bacteries count bacteries
set bacteries-no-esporulant count bacteries with [esporulacio? = false]
set bacteries-esporulant count bacteries with [esporulacio? = true]
set percentatge-bacteries ( total-bacteries / count turtles ) * 100
end

to setup-espores
set-default-shape espores "dot"
set total-espores 0
set percentatge-espores ( total-espores / count turtles ) * 100
end

```

Figura 5: Captura de pantalla de la parte de código implementado en la plataforma NetLogo que corresponde a la definición del modelo "MicrobialCannibalism" (además de las que se definen en la interficie, ver Figura 4) y a la inicialización del sistema. Cada procedimiento va precedido por la palabra "to" y termina con la palabra "end".

Submodelos. En cada paso de programa o de tiempo de la simulación, los siguientes procesos se ejecutan para cada uno de los individuos que configuran la población. Los cambios generados sobre las variables de estado de cada bacteria como consecuencia de estas sucesivas acciones individuales se van asignando, actualizando también todas las variables de medio o de sistema que hayan podido quedar afectadas. La Figura 6 muestra la captura de pantalla de la parte de código que corresponde al bucle principal del programa, con la implementación de las sucesivas acciones sobre todas las bacterias y esporas que configuran la población virtual y sobre las celdas del medio.

```

to go
  if count bacteria = 0 or ticks = 3000 [stop]
  ask bacteria [ move consum_nutrient reproduccio spo0A-active ]
  ask bacteria [ ifelse esporulacio? = true [ viabilitat-E ] [ viabilitat-NE ] ]
  ask esporas [ right random 360 forward radi-moviment * 0.01 ]
  update-medium
  set total-bacteria count bacteria
  set bacteria-no-esporulant count bacteria with [esporulacio? = false]
  set bacteria-esporulant count bacteria with [esporulacio? = true]
  set percentatge-bacteria ( total-bacteria / count turtles ) * 100
  set total-esporas count esporas
  set percentatge-esporas ( total-esporas / count turtles ) * 100
  write-outputfile
  tick
end

```

Figura 6: Captura de pantalla de la parte de código que corresponde a la implementación de las sucesivas acciones sobre todas las bacterias y esporas que configuran la población virtual y sobre las celdas del medio del modelo "MicrobialCannibalism" ..

Submodelo "move": Asigna un cambio de posición en el dominio bidimensional de forma aleatoria dentro de un círculo de radio fijado por el parámetro radio de movimiento, y supone para el individuo un gasto energético (movimiento activo).

Submodelo "consum-nutrient": Determina la energía conseguida por la bacteria a partir de la cantidad de nutriente que ésta ha ingerido. La cantidad de nutriente que se ingiere es función del valor obtenido de una variable aleatoria normal con media *ingerir* (que se asume como valor máximo por unidad temporal o paso de programa), y por la cantidad que está disponible de la que contiene la celda a partir del parámetro *disponibilidad*. Si la cantidad de nutriente que hay en el *patch* es inferior a la cantidad de nutriente asignado para ser ingerido, el consumo asignado será la cantidad de nutriente que hay en el *patch*, mientras que si la cantidad es superior, el consumo de nutriente coincidirá con la capacidad máxima que la bacteria tiene de consumir. La bacteria incrementa su energía con una cantidad proporcional a la cantidad finalmente ingerida a través del parámetro *rendimiento*.

Submodelo "reproducción": Reproducción por bipartición cuando la energía acumulada de la bacteria es superior al valor de start-energía que tiene asignado (función del parámetro *energía-reproducción*). La bacteria se divide en dos, y por lo tanto aparece un nuevo individuo. La bipartición hace que se actualicen las variables individuales de las dos bacterias, se reparta equitativamente la energía acumulada por la progenitora y las condiciones de no viabilidad (en caso de tener), y que se reasignen nuevos valores a las características individuales.

Submodelo "spo0A-active": Representa el regulador genético Spo0A asociado a una proteína, la cantidad de la cual determina el momento en que empieza el proceso de esporulación cuan-

do la bacteria se encuentra en condiciones extremas del medio (con bajas concentraciones de nutriente durante mucho tiempo). Si la energía acumulada de la bacteria se encuentra durante mucho tiempo (determinado por el parámetro *index-no-viab*) por debajo del 10 % de la energía requerida en la reproducción (que se considera un estado óptimo), el proceso de esporulación se puede iniciar. Las bacterias que tengan una cantidad de esta proteína por debajo del *límite-regulador* iniciarán de inmediato este proceso, mientras que en el resto de casos, tendrán que esperar más tiempo para poder iniciar la esporulación (un tiempo establecido como el triple de este índice de no viabilidad que se controla).

Submodelo “viabilidad-E”: Controla la viabilidad de la bacteria una vez ha iniciado el proceso de esporulación. Se controla y determina la duración del proceso, de forma que en el final de éste, la bacteria pasa a ser una espora. El tiempo necesario para acabar siendo espora viene condicionado por el tiempo en que la bacteria que sufre este proceso se encuentra con una energía acumulada inferior a la energía de mantenimiento, y que se controla como tiempo de incubación. Alcanzar el valor máximo para este tiempo de incubación implicará el final del proceso de esporulación, la conversión de la bacteria en espora. Mientras dura el proceso de esporulación, en cada paso de tiempo, la bacteria excreta toxina en la celda espacial donde se encuentra.

Submodelo “viabilidad-NE”: Controla la viabilidad de la bacteria que no ha iniciado el proceso de esporulación (la que no está esporulando), y que por lo tanto, se puede encontrar afectada por la toxina que puede haber en su entorno local (en la celda espacial que ocupa). Si el valor de la toxina que encuentra la bacteria es superior al valor máximo de toxina que puede soportar esta bacteria, morirá y se producirá la lisis o ruptura de membrana, devolviendo al entorno local su biomasa en forma de nutriente. Se asume que el regreso de nutriente que puede hacer la lisis de la bacteria está simbolizado a través de la energía que la bacteria tiene.

Submodelo “update-system”: Actúa sobre el medio, sobre todas las celdas espaciales del dominio, representando la difusión de nutriente y toxina, y controlando si hay o no entrada exterior de nutriente según sea el protocolo elegido. En el caso de simular un sistema modo *Fed-batch* cada cierto número de pasos de tiempo, con una frecuencia preestablecida por el parámetro *length-time-feed*, entrará una determinada cantidad de nutriente en cada celda espacial fijada por el parámetro *fed-nutrient-local*.

La Figura 7 muestra la captura de pantalla correspondiente a la implementación en la plataforma NetLogo del conjunto de submodelos expuestos anteriormente.

El simulador obtenido para este caso de estudio será manejado en el entorno académico (su origen fue un Trabajo Final de Grado de la titulación Ingeniería de Sistemas Biológicos de la Universitat Politècnica de Catalunya), será útil tanto en la docencia como para la realización de investigaciones vinculadas con estas interacciones microbianas, abriendo expectativas para futuras aplicaciones prácticas.

3.3. Resultados de simulación y un primer análisis del modelo implementado

En el contexto de los ABMs es imprescindible prestar atención a la manera en que se presentan y se tratan los resultados de simulación, a la transparencia de los códigos empleados, la replicabilidad y la confianza en las salidas obtenidas con el simulador. La complejidad de la mayoría de los ABMs es indiscutible, lo que se traduce en modelos con múltiples interacciones entre parámetros, y con resultados multivariantes que requieren de enfoques estadísticos específicos y avanzados. En esta sección donde se presentarán los primeros resultados obtenidos con el simulador “MicrobialCannibalism” construido, únicamente se hará uso de alguno de los

```

to move
  right random 360
  forward radi-moviment
  set energia energia - 0.1
end

to consum_nutrient
  set nutrient-per-ingerir abs (random-normal ingerir (CV * ingerir) )
  set nutrient-disponible disponibilitat * nutrient

  ifelse nutrient-per-ingerir > nutrient-disponible [set nutrient-ingerit nutrient-disponible] [set nutrient-ingerit nutrient-per-ingerir]

  set nutrient nutrient - nutrient-ingerit
  set energia energia + rendiment * nutrient-ingerit
end

to reproduccio
  if energia > start-energia
  [ if esporulacio? = false [ set energia energia / 2 set start-energia abs ( random-normal energia-reproduccio (CV * energia-reproduccio) ) set no-viab no-viab / 2
    hatch 1 [ set start-energia abs ( random-normal energia-reproduccio (CV * energia-reproduccio) )
      set Spo0A random 100 set esporulacio? false set temps-incubacio 0 ] ] ]
end

to spo0A-active
  if (energia <= 0.10 * start-energia) [ if random 2 < 1 [ set no-viab no-viab + 1 ] ]
  if no-viab >= index-no-viab
  [ ifelse spo0A < limit-regulador [ set esporulacio? true set color red ]
    [ ifelse no-viab >= 3 * index-no-viab [ set esporulacio? true set color red ] [set esporulacio? false set color green ] ] ]
end

to viabilitat-E
  if energia < energia-manteniment [ set temps-incubacio temps-incubacio + 1 set toxina toxina + 1 ]
  if temps-incubacio >= abs ( random-normal maxm-temps-incubacio (0.5 * CV * maxm-temps-incubacio) ) [ set breed espores set color black ]
end

to viabilitat-NE
  if toxina > abs ( random-normal maxm-toxicitat (0.5 * CV * maxm-toxicitat) ) [ set nutrient nutrient + start-energia die ]
end

to update-medium
  diffuse nutrient coeff-difusio
  diffuse toxina coeff-difusio
  if Protocol-of-feed = "Fed-batch" [ if ( ticks >= length-time-feed ) and ( ticks mod length-time-feed = 0 )
    [ ask patches [ set nutrient nutrient + abs ( random-normal fed-nutrient-local (CV * fed-nutrient-local) ) ] ] ]
  set total-nutrient sum [nutrient] of patches
  set total-toxina sum [toxina] of patches
  ask patches
  [ if Medi-amb = "Nutrient"
    [ let max-value max [nutrient] of patches
      if max-value > 0 [ set pcolor scale-color brown nutrient 0 max-value ] ]
    if Medi-amb = "Toxina"
    [ let max-value max [toxina] of patches
      if max-value > 0 [ set pcolor scale-color pink toxina 0 max-value ] ] ]
end

```

Figura 7: Captura de pantalla del código implementado en NetLogo correspondientes al conjunto de submodelos del simulador “MicrobialCannibalism”.

posibles recursos o técnicas que pueden ser usadas para analizar las salidas de un ABM (Lee et al., 2015).

Sistema “Batch” y sistema “Fed-batch”

Una vez implementado el modelo, y con el simulador “MicrobialCannibalism” construido, se ha llevado a cabo un conjunto de simulaciones bajo dos escenarios diferentes, uno considerando el protocolo “Batch” (sistema cerrado sin salida de medio ni entrada de nutriente) y el otro con el protocolo “Fed-batch” (sistema abierto con una entrada periódica de nutriente en el sistema pero sin salida de medio). Aprovechando las salidas directas que proporciona la interfaz de este simulador (salidas gráficas y numéricas) se hace un primer análisis de los comportamientos de las poblaciones bacterianas que resultan y de sus dinámicas.

La Figura 8 muestra el inicio de la evolución de un cultivo bacteriano en modo “Batch” (Simulación A). Con una cantidad inicial de nutriente en el medio, las bacterias irán consumiendo este nutriente. La distribución espacial de este nutriente en el dominio está representada por un gradiente de color, siendo el color blanco utilizado cuando esta concentración es elevada y el color oscuro cuando es muy baja o próxima a cero. Las bacterias con el consumo de este nutriente obtendrán energía y se reproducirán, la población crecerá y el nutriente del medio disminuirá (su distribución espacial en el dominio representada con el gradiente del color marrón, determina zonas con tonalidades distintas, cada vez más oscuras cuando menor sea su concentración). Cuando la cantidad de nutriente del medio sea excesivamente baja hará inviable el sostenimiento de la población establecida, apareciendo entonces las primeras bacterias que inician el proceso de esporulación (bacterias representadas con color rojo). Al mismo tiempo aparecen también bacterias (representados con color verde oscuro) que no han iniciado la es-

populación pero que ya están siendo afectadas por la toxina producida por las bacterias que están en proceso de esporulación. Coexisten con estas bacterias también bacterias que aún se encuentran en un estado viable óptimo (representadas con color verde claro), aquellas que no han sufrido aún ni restricciones importantes de nutriente, ni el efecto adverso de la toxina por no encontrarse en las proximidades de las bacterias que están esporulando.

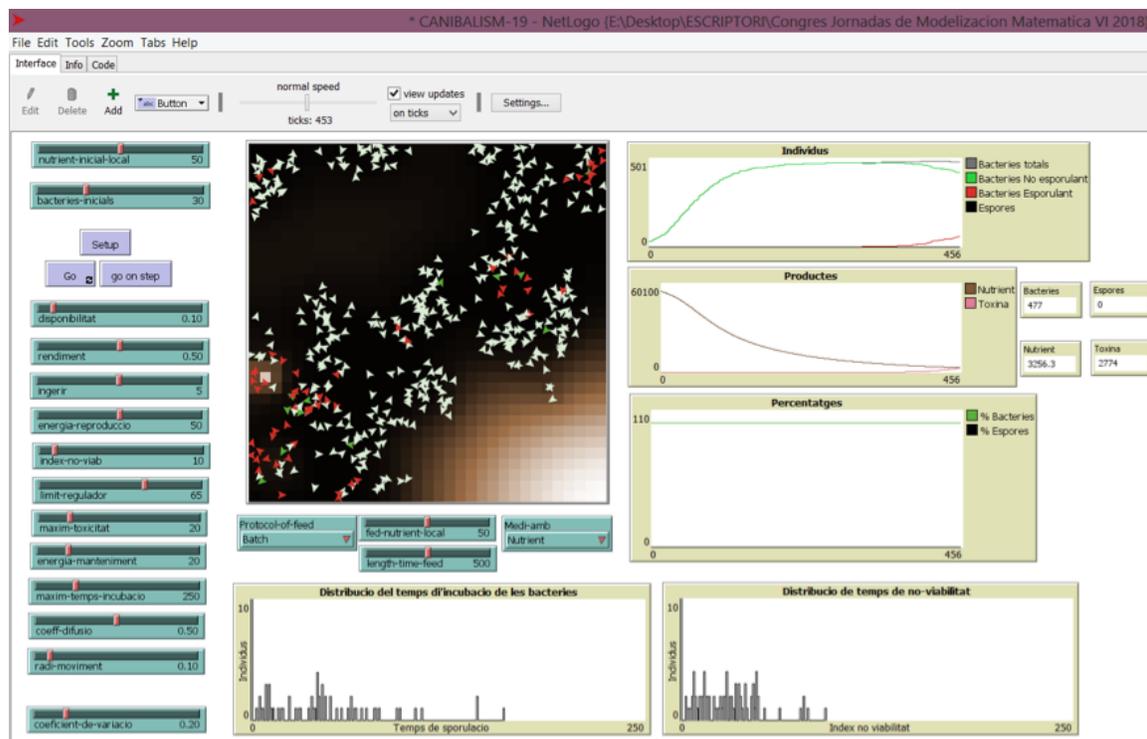


Figura 8: Captura de pantalla del simulador “MicrobialCannibalism” de la simulación A, reflejando el estado del sistema bacteriano bajo el protocolo “Batch” cuando el nutriente inicial se agota (la distribución espacial de nutriente en el medio está representada con un gradiente para el color marrón, blanco para una concentración muy elevada de nutriente y negro para la ausencia de nutriente).

En la Figura 9 se observa el estado del sistema bacteriano en el momento en que aparecen las primeras esporas. El nutriente ya hace tiempo que es muy escaso, y únicamente la lisis de las bacterias que se mueren van aportando pequeñas cantidades de nutriente al medio. La mayoría de las bacterias se encuentran en medio del proceso de esporulación y los niveles de toxina en el medio empiezan a subir (su distribución espacial en el dominio pasa de color negro para representar la ausencia de toxina a gradientes de color fucsia, más intenso el color cuando mayor es la concentración de toxina, llegando al color blanco para las concentraciones máximas). En estos momentos de la evolución simulada, las bacterias o están iniciando la esporulación, o están siendo afectadas por esta toxina llegando a su muerte con su consiguiente lisis (y el regreso de su biomasa al medio como producto aprovechable por otras bacterias).

En la Figura 10 se observa el final de esta simulación donde sólo las esporas pueden mantenerse en el sistema, una parte de la población bacteriana ha logrado la transformación en esporas a la espera de que las condiciones del medio mejoren y poder volver a generar una nueva población bacteriana, mientras que otra parte de la población ha desaparecido. Algunas bacterias, por la falta de nutriente o por ser afectadas por la toxina generada por los propios individuos que están esporulando de la población, han muerto y lisado. Otras, han conseguido frenar temporalmente el proceso de esporulación gracias a consumir el nutriente que, las primeras que han muerto y lisiado, han aportado al medio, retrasando un poco más en el tiempo

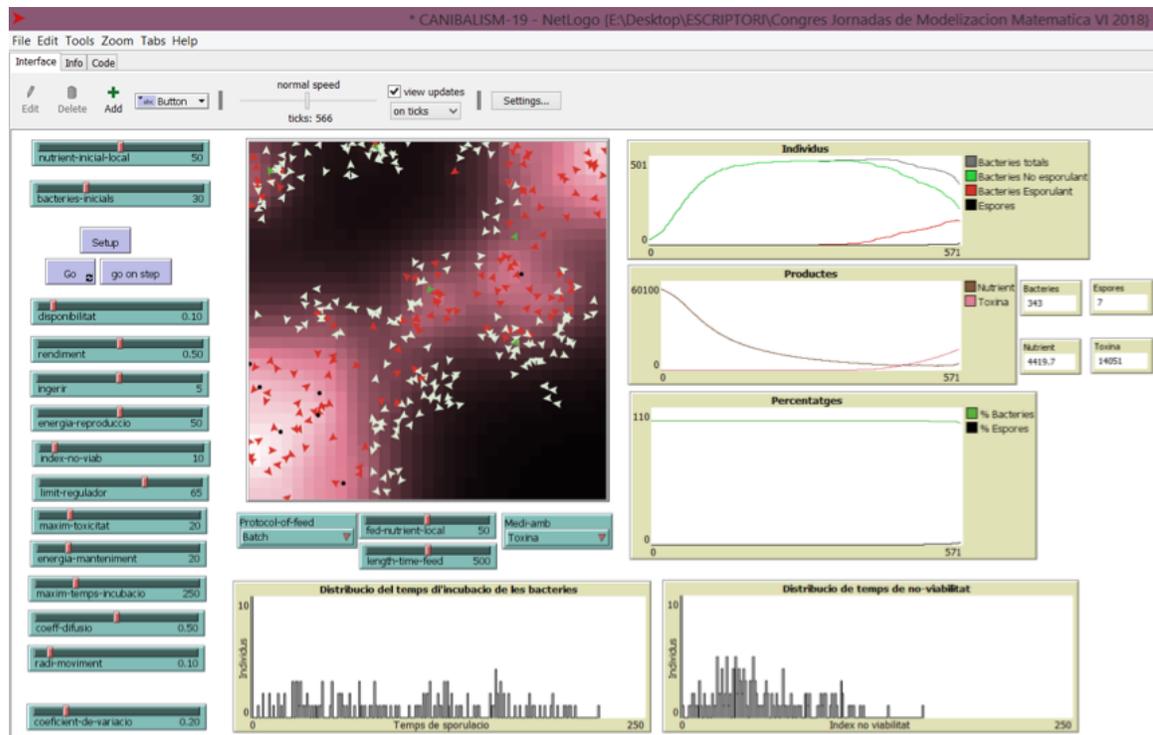


Figura 9: Captura de pantalla del simulador “MicrobialCannibalism” de la simulación A, reflejando el estado del sistema bacteriano que se encuentra bajo el protocolo “Batch” en el momento en que aparecen las primeras esporas. En el medio se encuentra representada la distribución espacial de toxina en el medio a través del gradiente de color fucsia (con el negro para su ausencia y llegando al blanco para las concentraciones más elevadas).

la consecución de la espora. En la evolución temporal del nutriente total del sistema se puede observar un pequeño incremento de éste en el medio, como consecuencia de la lisis de una parte de la población bacteriana que ha devuelto al medio su biomasa en forma de nutriente (Figura 10). No obstante, sin entrada externa de nutriente, el nutriente que aún se encuentra en el sistema termina por desaparecer, y al final se tiene una población de esporas.

La Figura 11 muestra la evolución de un cultivo bacteriano en modo “Fed-Batch” (Simulación B). Se observa como los individuos de la población bacteriana se encuentran en estados individuales diferentes, existen bacterias en estado óptimo (color verde claro), han aparecido las primeras bacterias que están esporulando (color rojo), y hay otras bacterias que ya se encuentran afectadas por la toxina que ha comenzado a ser generada y excretada por las bacterias esporulantes (color verde oscuro). También se puede observar la aparición de alguna espora. No obstante, en la primera parte de la simulación, y después de la primera aportación exterior de nutriente al medio (gráfico superior de la Figura 11), aún son mayoría las bacterias que no han sido afectadas ni por la toxina ni por la falta de nutriente. Después de la segunda aportación exterior de nutriente al medio, el estado de la mayoría de los individuos que configuran la población cambia (gráfico inferior de la Figura 11). Aunque todavía hay nutriente en el medio, la toxina que también se encuentra en el medio ha afectado de forma irremediable el estado de las bacterias, hay un menor número de bacterias que no están esporulando y un mayor número de esporas en el sistema.

La Figura 12 muestra el final de la simulación B con el protocolo “Fed-batch”, donde la dinámica del sistema se ha estabilizado. Las sucesivas entradas externas de nutriente al medio han ido regularizando los crecimientos y decrecimientos de los diferentes grupos de individuos

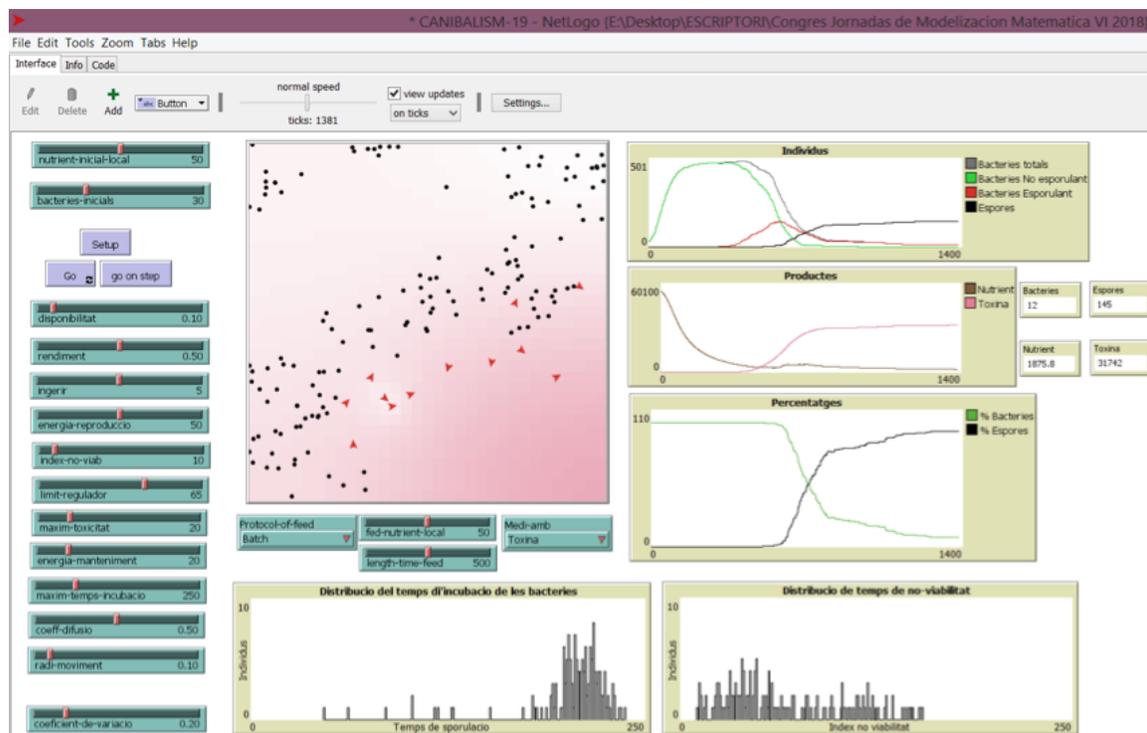


Figura 10: Captura de pantalla del simulador “MicrobialCannibalism” de la simulación A, con el sistema bacteriano bajo el protocolo “Batch”, en el momento en que la mayoría de las bacterias han lisado o se han convertido en esporas, con muy pocas bacterias a punto de finalizar el proceso de esporulación, en un medio en el que en todas partes se encuentran altas concentraciones de toxina (color fucsia uniforme en el dominio).

que configuran la población, con una coexistencia final de esporas y bacterias (mayoritariamente bacterias que han iniciado el proceso de esporulación pero que lo han podido frenar, ya que se pueden ir manteniendo con el nutriente que encuentran en el medio). La cantidad de nutriente aportado desde el exterior del sistema de forma periódica permite mantener estable esta configuración de la población de individuos (bacterias y esporas).

Es evidente que los resultados observados para estas dos simulaciones presentadas dependen fuertemente del conjunto de valores asignados a los parámetros del modelo. El modelo sólo representa de forma cualitativa el canibalismo microbiano, la depredación intraespecífica para este tipo de bacteria. Es la primera etapa que hay que cubrir para poder continuar con el proceso de modelización y llegar a la parametrización y calibración del modelo, lo cual requiere de datos experimentales. Es por tanto, indispensable para avanzar en el ciclo de modelización, la realización de experimentos controlados bajo estos protocolos de manejo del sistema, con la consecuente recogida de datos experimentales, recogidos tanto en relación a la composición de la población que se genera en el espacio como la que se mantiene a lo largo del tiempo, según sean las condiciones del medio en el cual se encuentre.

En este proceso previo de análisis y comprensión de cómo trabaja y responde el modelo cualitativo diseñado bajo escenarios de simulación diferentes, permite identificar aspectos relevantes o elementos significativos que deben ser considerados en una posterior etapa del estudio. Observar si las salidas del simulador se corresponden con las hipótesis hechas y con los comportamientos planteados permite verificar la correcta implementación del modelo. Constatar si el comportamiento simulado es compatible con el conocimiento que se tiene del sistema real permite avanzar en este proceso de modelización que no ha hecho más que empezar. Son muchos y diversos los escenarios de simulación que se podrían seguir investigando para verificar y

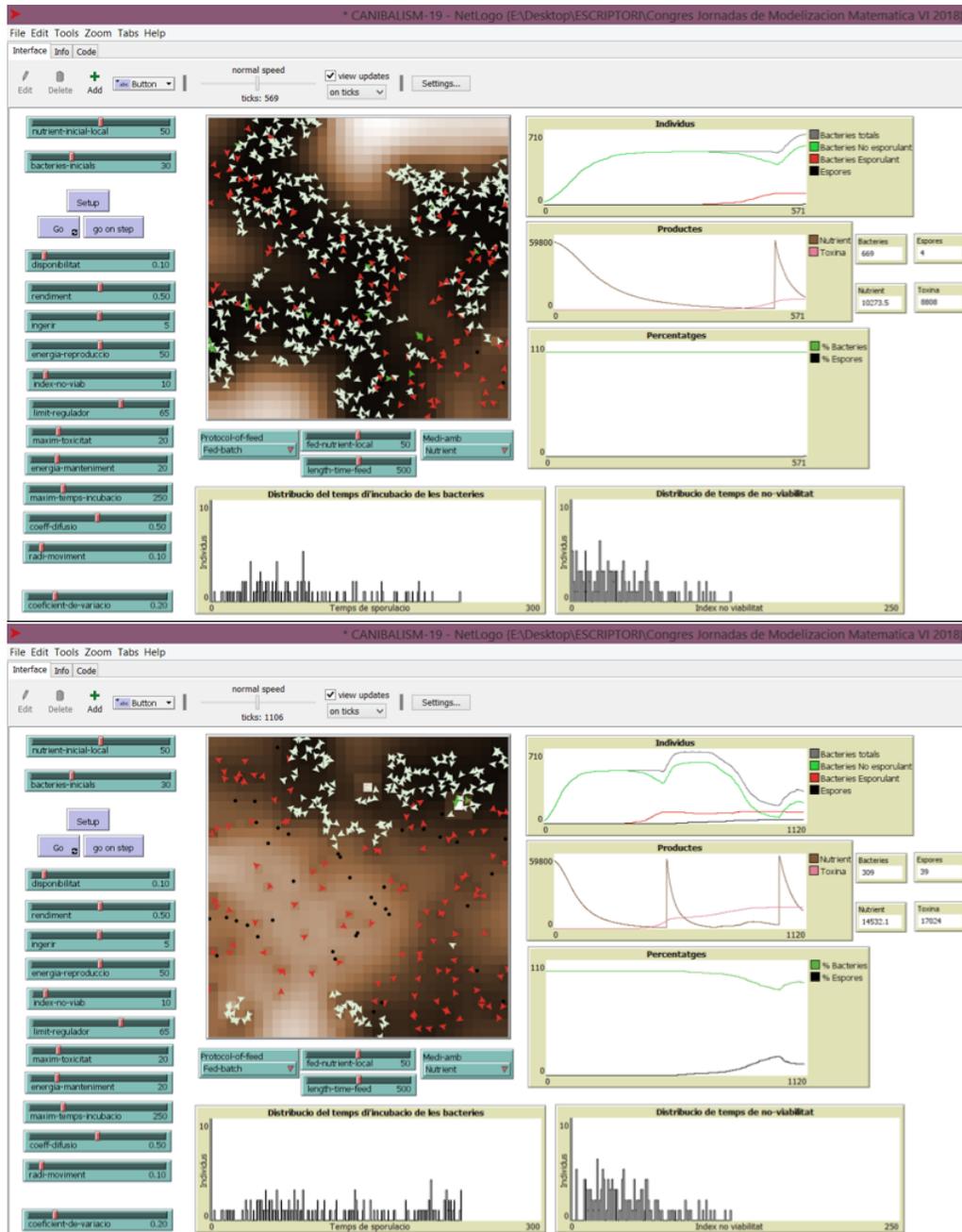


Figura 11: Captura de pantalla del simulador “MicrobialCannibalism” de la simulación B, donde el sistema bacteriano se encuentra bajo el protocolo “Fed-batch”, en los momentos temporales en que ha habido una primera entrada desde el exterior de nutriente al medio (imagen superior) y una segunda entrada desde el exterior de nutriente en el medio (imagen inferior).

validar este ABM. Una comprensión cualitativa del modelo es esencial para la aceptación del modelo.

Aleatoriedad y réplicas

El ABM “MicrobialCannibalism” es un modelo estocástico. Las variables aleatorias utilizadas en la formulación del modelo y en su implementación son de dos tipos, variables aleatorias uniformes y variables aleatorias normales. Se han utilizado dos tipos de distribuciones de pro-

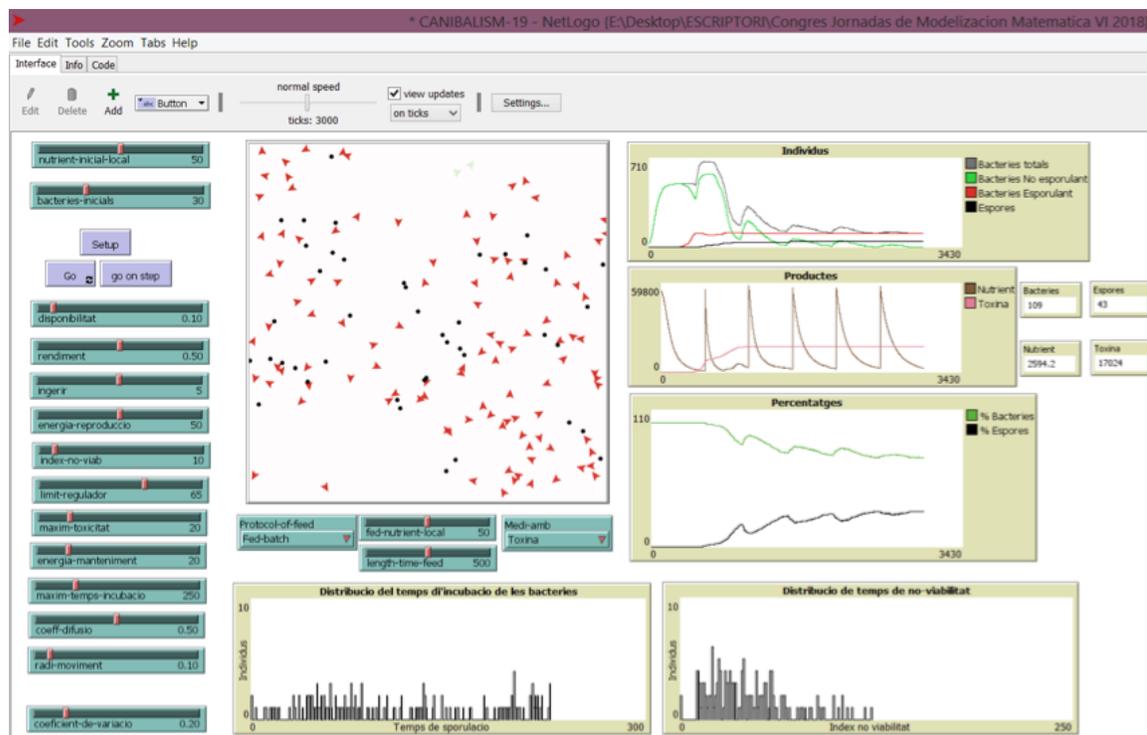


Figura 12: Captura de pantalla del simulador “MicrobialCannibalism” correspondiente al final de la simulación B, con el sistema bacteriano sometido al protocolo “Fed-batch”.

babilidad: i) la distribución uniforme en un determinado rango o intervalo y, ii) la distribución normal o gaussiana con una media poblacional y una desviación típica poblacional. Por tanto, cada simulación ejecutada o cada “experimento virtual” realizado dependen de un conjunto de valores que son realizaciones de estas variables aleatorias insertadas en los procedimientos implementados (tanto para llevar a cabo instrucciones o acciones de los individuos, como para asignar características individuales). Por ello, aún sin modificar ningún valor de entrada de los parámetros del modelo, los resultados que se generan con cada ejecución son evoluciones temporales diferentes, no son exactamente iguales. Cada realización del simulador con los mismos valores para los parámetros de entrada se considera una réplica o repetición de un experimento virtual.

Las Figuras 13 y 14 muestran los resultados de 15 repeticiones o réplicas ejecutadas correspondientes a dos escenarios distintos de simulación, utilizando el protocolo “Batch” (Simulación A) y el protocolo “Fed-Batch” (Simulación B) respectivamente. Las evoluciones temporales que se muestran en estas Figuras 13 y 14 corresponden a las variables: número de bacterias que no están esporulando, número de bacterias que están esporulando, número de esporas, porcentaje de bacterias sobre el total de individuos (complementario al porcentaje de esporas), y cantidad de nutriente y cantidad de toxina del medio. Se constata que las variabilidades que muestran las diferentes variables representadas no tienen siempre la misma magnitud, ni entre las distintas variables ni entre distintos momentos temporales de la evolución. También se confirma, que a pesar de la considerable variabilidad observada en los resultados simulados en algunos casos, las tendencias y los comportamiento globales del sistema para cada uno de los protocolos ensayados son iguales, las diferentes réplicas de un mismo escenario de simulación siguen un mismo patrón de comportamiento. Para este conjunto de valores de los parámetros del modelo utilizado, los resultados de la replicación en el escenario del modo “Fed-Batch” (Figura 14) muestran una mayor variabilidad que los del modo “Batch” (Figura 13). Es razonable suponer

que la entrada periódica de nutriente desde el exterior altera la composición del medio a lo largo del tiempo y la diversidad de respuesta de los individuos o la competencia entre ellos se hace más determinante para conducir a la población a una dinámica que a otra.

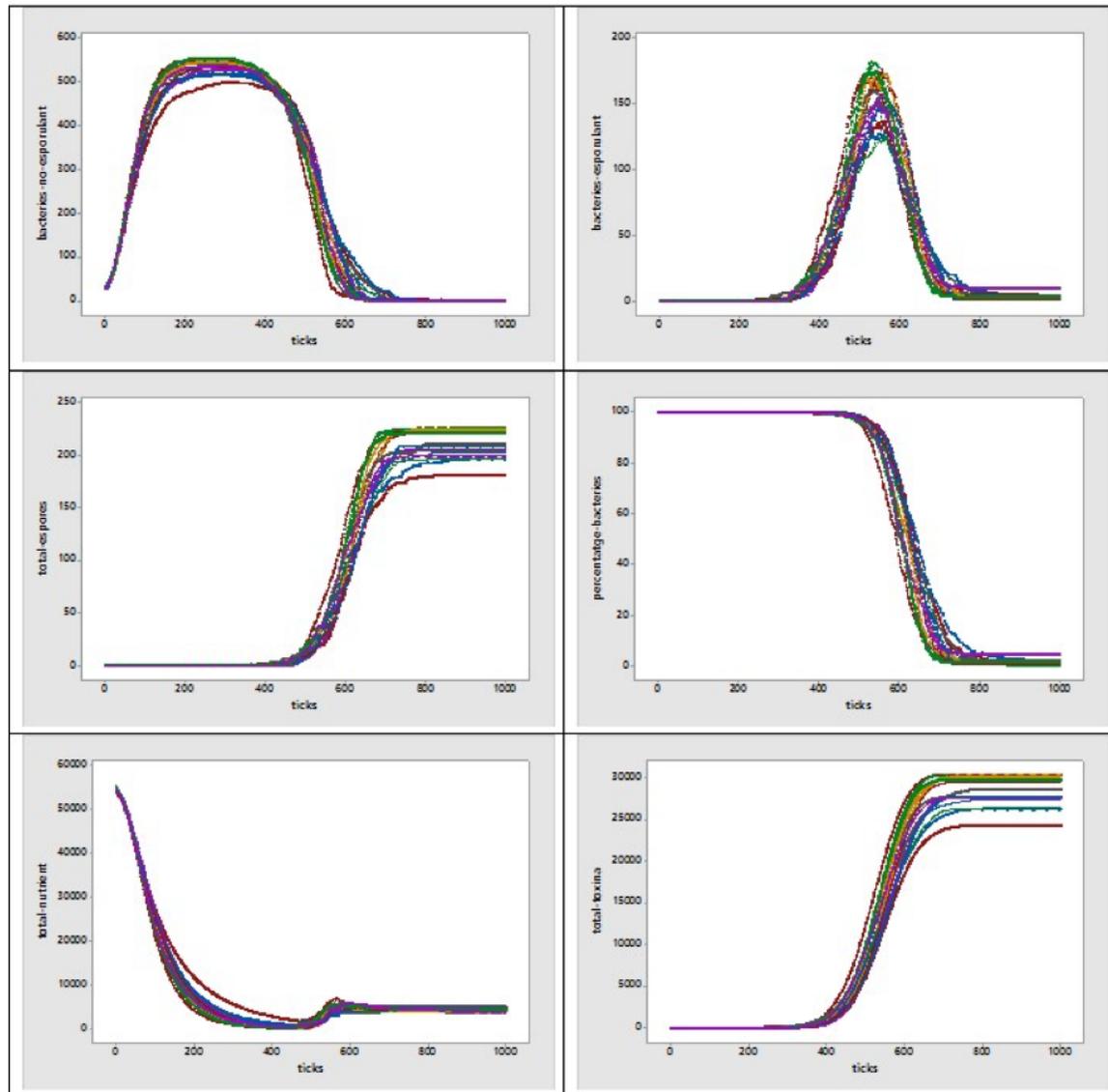


Figura 13: Resultados correspondientes a 15 repeticiones o réplicas obtenidas con el simulador “MicrobialCannibalism” y correspondientes al escenario de la simulación A (“Batch”) para las variables: número de bacterias que no están esporulando, número de bacterias que están esporulando, número de esporas, porcentaje de bacterias, cantidad de nutriente, y cantidad de toxina.

La variabilidad en las respuestas individuales mediante las acciones vitales programadas (consumo, viabilidad, reproducción, esporulación, muerte y lisis), o en la asignación de características individuales, pasa principalmente por el uso de variables aleatorias normales. Estas variables aleatorias con distribuciones de probabilidad en forma de campana de Gauss están definidas a través de su coeficiente de variación y de su esperanza o media poblacional. El valor del parámetro de entrada para el coeficiente de variación de las variables aleatorias normales utilizadas es del 20%. Es razonable suponer que el valor de este coeficiente de variación sea un factor importante para la variabilidad global observada en los diferentes conjuntos de

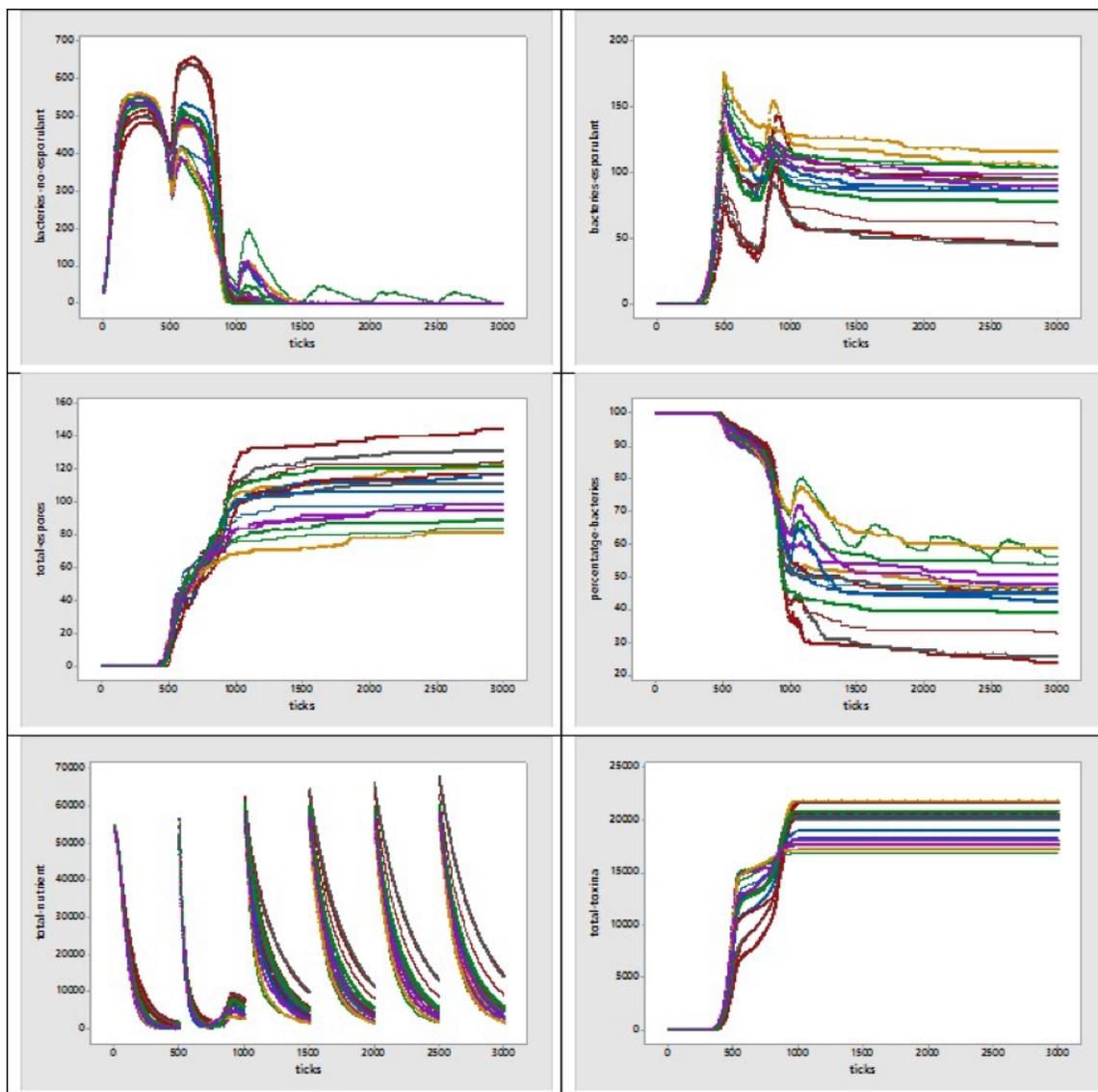


Figura 14: Resultados correspondientes a 15 repeticiones o replicas obtenidas con el simulador “Microbial-Cannibalism” y correspondientes al escenario de la simulación B (“Fed-Batch”) para las variables: número de bacterias que no están esporulando, número de bacterias que están esporulando, número de esporas, porcentaje de bacterias, cantidad de nutriente, y cantidad de toxina.

simulaciones (Figuras 13 y 14).

Un primer análisis unifactorial de sensibilidad del modelo

Son muchos los parámetros con los que se puede empezar a analizar la sensibilidad del modelo. Algunos parámetros del modelo son muy importantes desde el contexto propio de la biología, parámetros en relación al ciclo vital de la bacteria y a los procesos que ésta desarrolla, mientras que otros parámetros del modelo están más ligados a la metodología y perspectiva propia de la modelización. El análisis de sensibilidad de parámetros implicados en un modelo computacional pasa por generar una batería de simulaciones para diferentes combinaciones de valores de estos parámetros, por lo que hay que realizar un gran número de ejecuciones que respondan a un determinado diseño factorial. Si el análisis es unifactorial, para cada uno de los parámetros del modelo, se fija un rango de valores, y manteniendo fijos el resto de valores

para los otros parámetros, se hacen simulaciones variando el valor de este parámetro dentro de este rango para observar la evolución del sistema en cada caso. La observación del sistema se hace a partir de las diferentes variables respuesta o de salida que proporciona el modelo, para poder analizar la influencia que ejerce este parámetro en el comportamiento global que exhibe el sistema.

Ante la imposibilidad de presentar en esta sección un análisis unifactorial completo de todos los parámetros del modelo "MicrobialCannibalism", se ha escogido un parámetro para iniciar este estudio y que ilustrará la manera de proceder. El parámetro elegido es un parámetro implicado directamente en la aleatoriedad intrínseca del modelo (es un modelo estocástico), y es el coeficiente de variación (CV). El CV es un parámetro de entrada del modelo que se puede modificar desde la interfaz del simulador y que determina las desviaciones típicas poblacionales de las variables aleatorias normales. Las desviaciones típicas de estas variables se obtienen multiplicando la media fijada para la variable en consideración con el CV. El rango considerado para el CV va desde 5 % hasta el 35 %, y los valores ensayados son 5 %, 10 %, 15 %, 20 % (valor utilizado en las simulaciones de la sección de aleatoriedad y replicación, Figuras 8-14), 25 %, 30 %, y 35 %. Para cada uno de estos valores, se han ejecutado grupos de 10 simulaciones (réplicas) sin variar ninguno de los otros valores de los parámetros de entrada del modelo. Se quiere observar cómo responde el sistema con uno de los valores escogidos para el CV. Haciendo uso de la herramienta-recurso "Behaviour space" del NetLogo se han realizado, por tanto, 70 simulaciones, y la duración de cada una de estas simulaciones es de 1000 *ticks*, pasos de programa o de tiempo. Como son siete las variables reportadas (número total de bacterias, número de bacterias que no están esporular, número de bacterias que están esporular, número de esporas, porcentaje de bacterias, cantidad de nutriente, y cantidad de toxina), el conjunto total de datos generados es una muestra de 49000 datos. El análisis de estos datos se ha llevado a cabo con la ayuda del software estadístico Minitab (Minitab Inc. 2012). En esta sección sólo es factible mostrar, a modo de ejemplo, algunos de los resultados obtenidos.

Por ejemplo, la Tabla 3 presenta algunos resúmenes numéricos para una pequeña submuestra de los datos obtenidos con el protocolo de "Batch" (sistema cerrado), considerando los grupos de 10 réplicas ejecutadas para las diferentes variables controladas y para cada valor de CV ensayado. Los valores utilizados para la confección de esta tabla corresponden a los valores finales de las simulaciones realizadas. Se proporcionan estadísticos descriptivos de tendencia central y de variabilidad para valorar el promedio y la dispersión de los resultados finales conseguidos, cuando el nutriente ha sido consumido y la población de individuos se ha estabilizado. Los valores promedios alcanzados son distintos para las muestras correspondientes a los distintos valores de CV. Se observa, en general, que cuanto mayor es el valor de CV menor es la variabilidad de los datos reportados en las distintas muestras simuladas.

Variable	CV	Mean	SE Mean	CoefVar	Minimum	Median	Maximum
total-bacterias	0.05	8.6	3.7	136.0	1	6.0	39
	0.10	5.5	4.3	246.2	0	1.0	44
	0.15	2.6	1.0	120.5	1	1.0	9
	0.20	5.0	2.6	163.0	1	2.5	28
	0.25	3.4	0.5	42.1	1	3.0	6
	0.30	4.5	0.8	56.7	1	4.5	10
	0.35	3.6	1.0	90.9	1	2.0	12
bacterias-no-esporulantes	0.05	1.2	0.8	214.4	0	0	7
	0.10	0.0	0.0	*	0	0	0
	0.15	0.9	0.9	316.2	0	0	9
	0.20	0.3	0.2	225.0	0	0	2
	0.25	0.0	0.0	*	0	0	0
	0.30	0.0	0.0	*	0	0	0
	0.35	1.0	1.0	316.2	0	0	10
bacterias-esporulantes	0.05	7.4	3.8	163.1	1	1.5	39
	0.10	5.5	4.3	246.2	0	1.0	44
	0.15	1.7	0.7	133.1	0	1.0	8
	0.20	4.7	2.5	168.4	1	2.0	27
	0.25	3.4	0.5	42.1	1	3.0	6
	0.30	4.5	0.8	56.7	1	4.5	10
	0.35	2.6	0.5	55.0	1	2.0	6
total-esporas	0.05	228.3	8.8	12.2	178	234.5	256
	0.10	232.8	4.0	5.5	211	235.5	250
	0.15	221.5	5.7	8.1	197	220.5	249
	0.20	206.4	5.9	9.1	184	201.5	240
	0.25	198.0	4.7	7.4	176	200.5	214
	0.30	181.5	4.3	7.4	163	184.5	208
	0.35	157.6	2.9	5.8	141	158.5	170
porcentaje-bacterias	0.05	3.5	1.4	128.7	0.4	2.4	15.0
	0.10	2.2	1.7	242.1	0.0	0.4	17.3
	0.15	1.2	0.5	123.9	0.4	0.5	4.1
	0.20	2.4	1.2	158.3	0.4	1.2	12.9
	0.25	1.7	0.2	44.1	0.5	1.6	3.3
	0.30	2.4	0.4	56.0	0.6	2.4	5.2
	0.35	2.3	0.7	93.0	0.6	1.2	7.7
total-nutrientes	0.05	2834.5	243.5	27.2	1965.6	2712.2	4155.5
	0.10	3062.1	81.4	8.4	2633.4	3045.6	3387.5
	0.15	3626.3	123.9	10.8	3095.6	3637.0	4473.4
	0.20	4416.2	101.6	7.3	3884.1	4394.6	4862.2
	0.25	5031.4	132.7	8.3	4627.3	4924.6	5736.1
	0.30	5962.4	226.4	12.0	5000.2	5971.8	7143.2
	0.35	7259.6	204.5	8.9	5988.7	7309.4	7977.7
total-toxina	0.05	35801.3	1487.6	13.1	27258	36849.0	41264
	0.10	34943.5	523.4	4.7	32825	35358.0	37089
	0.15	31324.9	782.2	7.9	27962	31193.0	35242
	0.20	28054.9	743.4	8.4	25012	27871.5	32114
	0.25	25220.0	593.3	7.4	22373	25310.0	27631
	0.30	21657.6	530.1	7.7	19545	22107.0	24900
	0.35	17375.6	310.9	5.7	15626	17459.0	18639

Tabla 3: Medias muestrales, errores estándares, coeficientes de variación, mínimos, medianas y máximos de los grupos de 10 datos para las diferentes variables controladas al finalizar las simulaciones realizadas con el protocolo “Batch” (paso de tiempo o paso de programa 1000), según los diferentes valores fijados para el parámetro CV, parámetro implicado en la definición de las desviaciones típicas de las distribuciones de probabilidad normales del modelo.

Para ilustrar el tipo de resultado que se obtiene de forma global con el protocolo “Batch”, la Figura 15 presenta las evoluciones temporales correspondientes a la variable que da el número de esporas (“total-esporas”) del sistema para las 10 repeticiones realizadas para cada uno de los 7 valores diferentes que puede tener el parámetro CV en este análisis de sensibilidad. Se observa que según sea el valor de este CV el inicio del proceso de esporulación, con la aparición de las primeras esporas, se produce más tarde o más temprano. También se detectan diferencias en el logro que consigue el estado final estable del sistema, en cuanto al tiempo que tarda el sistema en conseguir este estado final de forma general, y en cuanto al número final de esporas que se han conseguido.

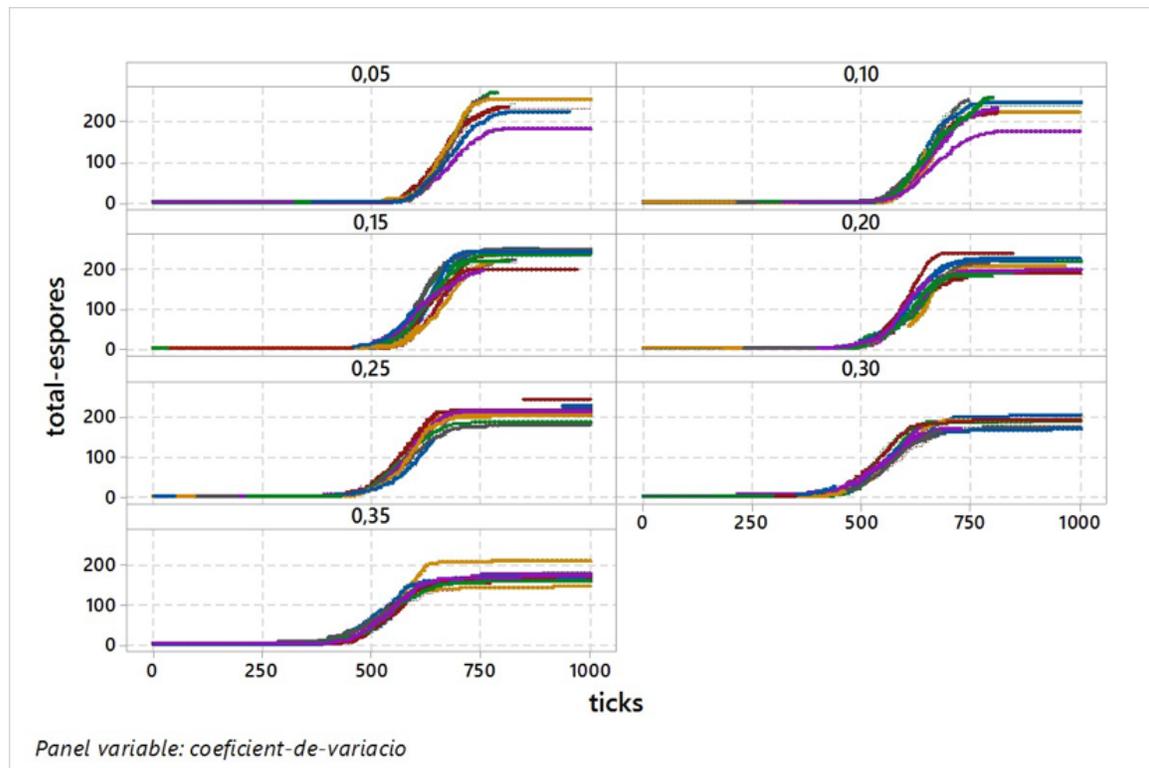


Figura 15: Evoluciones temporales correspondientes a la variable que da el número de esporas (“total-esporas”) del sistema con el protocolo “Batch” de las 10 repeticiones realizadas para cada uno de los 7 valores diferentes que puede alcanzar el parámetro CV (5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, y 35 %) en este análisis unifactorial de sensibilidad.

Se ha llevado a cabo un análisis estadístico para estudiar las medias correspondientes al número final de esporas conseguidas al final de las evoluciones temporales con los diferentes CV (Tabla 3 y Figura 15). Recogidos los datos finales correspondientes a esta variable “total-esporas” para cada una de las réplicas obtenidas bajo los diferentes escenarios simulados (distintos CV), se ha procedido a realizar un análisis de la varianza (ANOVA) para valorar la igualdad o no de las correspondientes medias de estos totales de esporas finales correspondientes a los diferentes CV. Se quiere contrastar si el factor CV que determina la dispersión de las campanas de Gauss utilizadas a nivel individual es un factor significativo para esta variable. Antes de proceder a realizar el ANOVA, se ha utilizado el test estadístico Bartlett para contrastar la igualdad de varianzas entre los diferentes grupos de datos. El nivel de significación utilizado en todos los análisis efectuados es del 5 %. Atendiendo que los datos recogidos proporcionan evidencia suficiente para concluir que existen diferencias significativas entre las varianzas de los diferentes grupos de datos (el valor P del test Bartlett fue 0.044), se utilizó la opción del test

Welch para llevar a cabo el correspondiente ANOVA que no requiere la suposición previa de igualdad de varianzas). El valor P de este test Welch fué inferior a 0.001, por lo que se puede concluir que los datos simulados proporcionan evidencia suficiente para rechazar la hipótesis de que todas las medias de los totales de esporas finales conseguidas para los diferentes CV son iguales. Podemos concluir que hay diferencias significativas entre estas medias de totales de esporas finales para los valores de CV considerados. Para la consecuente separación de medias, se ha utilizado el test estadístico Games-Howell, un método de comparaciones múltiples entre medias que no asume la hipótesis previa de igualdad de varianzas entre grupos. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 16, con el que se puede indicar que la media correspondiente al mayor valor de CV es significativamente distinta del resto de medias. Se obtienen varios grupos de medias homogéneas: un grupo con las medias correspondientes a los CV 5 %, 10 % y 15 %, otro grupo con las de los CV 5 %, 15 %, 20 %, 25 %, y otro con las de los CV 25 % y 30 %. Estos resultados hacen pensar que en el momento en que se deba trabajar con la parametrización y calibración del modelo, tan importante es investigar y conocer los valores de los parámetros implicados en el modelo como conocer la variabilidad que tienen o que debe atribuirse a estos parámetros.

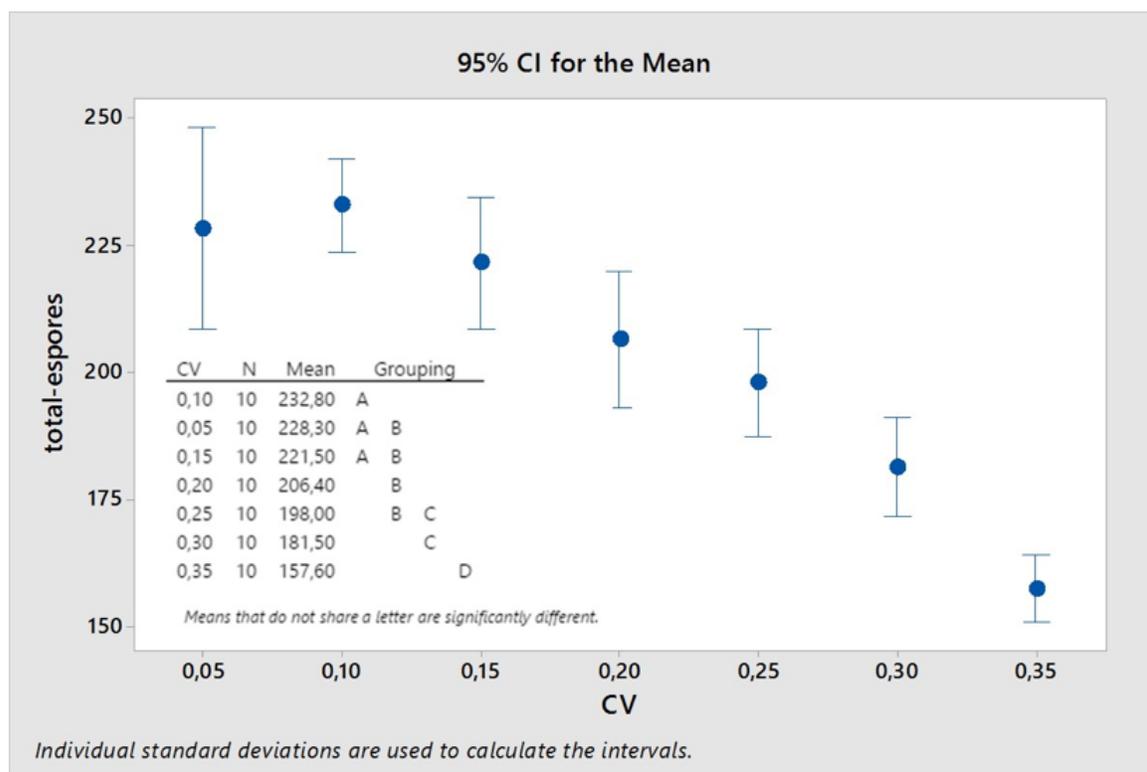


Figura 16: Intervalos de confianza al 95 % para las medias correspondientes al número final de esporas conseguidas en las simulaciones realizadas con “MicrobialCannibalism” para los distintos CV utilizados en la definición de las variables aleatorias normales del modelo, y la correspondiente separación de medias obtenida con el test estadístico Games-Howell con un nivel de significación del 5 %.

El análisis de los datos simulados de la primera versión del simulador “MicrobialCannibalism” es una etapa previa e indiscutible para poder iniciar el proceso de la parametrización y calibración del modelo. Son muchos los métodos estadísticos y diversas las técnicas de visualización que pueden utilizarse en este análisis de datos simulados para garantizar una exploración suficientemente adecuada del comportamiento del modelo (Lee et al., 2015).

4. Conclusiones

En este trabajo se ha hecho una presentación de las principales interacciones biológicas tanto interespecíficas como intraespecíficas que se pueden dar en un sistema biológico. Se ha discutido en general, y mostrado con algunos ejemplos, como la modelización basada en agentes (o modelización basada en el individuo) es una metodología apta y muy atractiva para abordar la diversidad de interacciones que se pueden dar entre organismos tanto de forma local y directa por proximidad o contacto, o de forma indirecta a través del control del entorno o medio que rodea estos organismos.

Se ha presentado la manera de abordar la programación que requiere la implementación de estos ABMs en la plataforma de acceso libre NetLogo y se han explicitado algunas de sus herramientas u opciones disponibles, lo que puede permitir a los lectores interesados iniciarse en este tipo de modelización de forma rápida y sencilla. Se han examinado y discutido tres simuladores de referencia que su biblioteca de modelos tiene disponibles en el contexto de la biología. También, en el ámbito de la microbiología se han indicado trabajos diversos que han diseñado y utilizado ABMs microbianos implementados en esta plataforma NetLogo, con resultados exitosos para la representación de diversas interacciones microbiológicas. La potencialidad y diversidad de esta aproximación metodológica para la representación de sistemas biológicos, así como la idoneidad del entorno de programación que ofrece NetLogo para estos modelos, es innegable.

Con el propósito de mostrar con detalle el diseño de un ABM y la construcción del correspondiente simulador en NetLogo se ha escogido una interacción microbiológica para representar: el canibalismo desarrollado por la bacteria *Bacillus subtilis*. Para conseguir la supervivencia local de la población bacteriana en condiciones desfavorables estos microorganismos pueden desplegar esta estrategia que pasa por provocar la muerte a algunos de los organismos de la propia especie y poder completar el proceso de esporulación, llegando a culminar en espora y esperar un entorno más favorable para volver a la forma bacteriana. Esta depredación intraespecífica aparece por ejemplo cuando en el medio los recursos o nutriente son limitados para la población y no permite su supervivencia. A partir de una búsqueda bibliográfica de trabajos científicos sobre esta bacteria, se ha desarrollado el modelo conceptual y cualitativo para representar y explorar la dinámica de una población de bacterias *B. subtilis* que muestra la interacción canibalismo teniendo en cuenta los recursos nutritivos disponibles en el medio de cultivo. Se ha implementado el ABM desarrollado en el entorno de programación NetLogo para investigar determinados aspectos relativos a la dinámica de la población simulada. El simulador “MicrobialCannibalism” construido permite representar el comportamiento de una población bacteriana virtual de *B. subtilis* que puede desplegar el canibalismo según sean las condiciones del medio en que se encuentra. Se han considerado dos tipos de protocolos de manejo para este sistema microbiano, el modo “Batch” o sistema cerrado, y el modo “Fed-Batch” o sistema con entradas periódicas de nutriente desde el exterior en el medio donde se encuentran las bacterias. Se ha investigado como la dinámica de estas poblaciones esta fuertemente condicionada por los valores de los parámetros del modelo. Las variables globales de salida que proporciona el simulador son evoluciones espaciales y temporales de: número de bacterias, número de bacterias que están esporulando, número de bacterias que no están esporulando, número total de esporas, cantidad de nutriente y cantidad de esporas. También distribuciones de alguna de las características de estas bacterias se pueden observar a través de los histogramas de la interficie del simulador, la cual es una ventana muy amigable y versátil, tanto para la inspección de las simulaciones que se generan como para la manipulación del simulador por parte de un usuario interesado.

Se ha constatado que la aleatoriedad y la dispersión de las distribuciones de probabilidad normal utilizadas en la formulación e implementación de acciones individuales de este modelo computacional inciden en el comportamiento global de la población microbiana. Se ha realizado un análisis de sensibilidad unifactorial para el parámetro que determina la desviación típica de las variables aleatorias normales utilizadas en el modelo a partir de su media poblacional. No solo los valores de los parámetros del modelo deben ser examinados en un proceso posterior de parametrización y calibración con datos experimentales, sino que debe prestarse atención a la dispersión que se puede observar para estos parámetros. La variabilidad en los valores de los parámetros que condicionan acciones individuales o características específicas de los individuos ha resultado ser un factor significativo en la respuesta global del sistema virtual, y por tanto debe ser examinada con detenimiento en la validación del modelo.

El simulador “MicrobialCannibalism” puede ser utilizado en el ámbito de la docencia tanto en un entorno de microbiología como en un entorno de programación o estadística, permitiendo la formulación y ejecución de experimentos virtuales con su posterior análisis de datos. Asimismo, este simulador podrá ser utilizado en el ámbito de la investigación si se avanza en su parametrización y calibración que pasa necesariamente por poder disponer de datos experimentales bajo condiciones controladas en el laboratorio.

Referencias

- 

Abar, S., Theodoropoulo, G. K., Lemarinier, P., O’Hare, G.M.P. (2017).
Agent Based Modelling and Simulation tools: A review of the state-of-art software.
Computer Science Review, 24, 13–33.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.cosrev.2017.03.001>
- 

Araujo, P., Gras, A., Ginovart, M., Moulton, V. (2106).
INDISIM-Paracoccus, an individual-based and thermodynamic model for a denitrifying bacterium.
Journal of Theoretical Biology, 403, 45–58.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.05.017>
- 

Banitz, T., Gras, A., Ginovart, M. (2015).
Individual-based modelling of soil organic matter in NetLogo: Transparent, user-friendly, and open.
Zentralblatt für Didaktik der Mathematik, 38 (2), 86–95.
- 

Begon, M., Harper, J.L., Towsend, C.R. (1999).
Ecology: Individuals, Populations and Communities.
3a edició. Barcelona: Ediciones Omega. S. A.
- 

Deangelis, D.L., Gros, L.J. (1992).
Individual-Based Modelos and Approaches in Ecology.
Nueva York: Chapman and Hall.
- 

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.
<https://dx.doi.org/10.4995/mse1.2016.5789>

-  Fujita, M., Gonzalez-Pastor, J.E., Losick, R. (2005).
High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of Bacillus subtilis.
Journal Bacteriology, 187, 1357-1368.
<https://dx.doi.org/10.1128/JB.187.4.1357-1368.2005>.
-  García-Vázquez, J. C., Sancho-Caparrini, F. (2016).
NetLogo: Una herramienta de modelado. Payhip.
<https://payhip.com/b/VhKb>.
-  Ginovart, M. (2014).
Discovering the power of individual-based modelling in teaching and learning: the study of a predator-prey system.
Journal of Science Education and Technology, 23, 496–513.
<https://dx.doi.org/10.1007/s10956-013-9480-6>
-  Ginovart, M. (2015).
¿Qué pueden ofrecer los modelos basados en agentes vivos en el contexto docente?
Modelling in Science Education and Learning, 8, 5-26.
-  Ginovart, M., Carbó, R., Blanco, M., Portell, X. (2018).
Digital image analysis of yeast single cells growing in two different oxygen concentrations to analyze the population growth and to assist individual-based modeling.
Frontiers Microbiology, 8, 2628.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02628>
-  Ginovart, M., Portell, X., Ferrer-Closas, P., Blanco, M. (2011).
Modelos basados en el individuo y la plataforma NetLogo.
Union-Revista Iberoamericana de Educación Matemática, 27, 131–150.
-  Ginovart, M., Portell, X., Ferrer-Closas, P., Blanco, M. (2012).
Modelos basados en el individuo: una metodología alternativa y atractiva para el estudio de biosistemas.
Enseñanza de las ciencias, 30, 93–108.
-  González-Cabaleiro, R., Mitchell, A.M., Smith, W., Wipat, A., Ofiteru, I.D. (2017).
Heterogeneity in pure microbial systems: experimental measurements and modeling.
Frontiers Microbiology, 8, 1813.
<https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01813>
-  González-Pastor, J. E. (2010).
Cannibalism: a social behavior in sporulating Bacillus subtilis.
FEMS Microbiology Reviews, 35, 415-424.
<https://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00253.x>.
-  Gonzalez-Pastor, J.E., Hobbs, E.C., Losick, R. (2003).
Cannibalism by sporulating bacteria.
Science, 301, 510-513.
<https://dx.doi.org/10.1126/science.1086462>.

-  Gorochoowski, T.E. (2016).
Agent-based modelling in synthetic biology.
Essays in Biochemistry, 60, 325–336.
<https://dx.doi:10.1042/EBC20160037>.
-  Grimm, V., Railsback, S.F. (2005).
Individual-based modelling and ecology.
Princeton and Oxford: Princeton University Press.
-  Grimm, V., Berger, U., Bastiansen, F., Eliassen, S., Ginot, V., Giske, J., Goss-Custard, J., Grand, T., Heinz, S.K., Huse, G. (2006).
A standard protocol for describing individual-based and agent-based models.
Ecological Modelling, 198, 115–126.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.04.023>.
-  Grimm, V., Berger, U., de Angelis, D.L., Polhill, J.G., Giske, J., Railsback, S.F. (2010).
The ODD protocol: A review and first update.
Ecological Modelling, 221, 2760–2768.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2010.08.019>.
-  Hellweger, F.L., Bucci, V. (2009).
A bunch of tiny individuals—Individual-based modeling for microbes.
Ecological Modelling, 220, 8–22.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2008.09.004>.
-  Hellweger, F.L., Clegg, R. J., Clark, J.R., Plugge, C.M., Kreft J. (2016).
Advancing microbial sciences by individual-based modelling.
Nature Reviews Microbiology, 14, 461–471.
<https://dx.doi:10.1038/nrmicro.2016.62>.
-  Kaiser, H. (1979).
The dynamics of populations as result of the properties of individual animals.
Fortschritte der Zoologie, 25, 109–136.
-  Kaul, H., Ventikos, Y. (2015).
Investigating biocomplexity through the agent-based paradigm.
Briefings in Bioinformatics, 16, 137–152.
<https://dx.doi.org/10.1093/bib/bbt077>.
-  López, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. (2009).
Cannibalism enhances biofilm development in Bacillus subtilis.
Molecular Microbiology, 74, 609–618.
<https://dx.doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>.
-  Lee, J-S., Filatova, T., Ligmann-Zielinska, A., Hassani-Mahmoei, B., Stonedahl, F., Lorscheid, I., Voinov, A., Polhill, G., Sun, Z., Parker, DC. (2015).
The Complexities of Agent-Based Modeling Output Analysis.
Journal of Artificial Societies and Social Simulation, 18, 4.
<https://dx.doi:10.18564/jasss.2897>

-  Macal, C.M., North, M.J. (2013). *Successful approaches for teaching agent-based simulation*. Journal of Simulation, 7, 1-11. <https://dx.doi.org/10.1057/jos.2012.1>
-  Minitab Inc. 2012. *Minitab Statistical Software Version 17.2.1*. Minitab Inc., State College. PA. <http://www.minitab.com/>.
-  Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., González-Pastor, J.E., Liu, J.S., Losick, R. (2003). *The Spo0A regulon of Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology, 50, 1683–1701. <https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03818.x>.
-  Railsback, S.F., Grimm, V. (2012). *Agent-based and individual-based modeling: a practical introduction*. Princeton University Press: Princeton.
-  Ricklefs, R.E. (1998). *Invitación a la Ecología*. La economía de la naturaleza. 4ª edición. Panamericana: Buenos Aires.
-  Shiflet, A.B., Shiflet, G.W. (2014). *An Introduction to Agent-based Modeling for Undergraduates*. Procedia Computer Science, 29, 1392–1402. <https://dx.doi.org/10.1016/j.procs.2014.05.126>
-  Uchmanski, J., Grimm, V. (1996). *Individual-based modelling in ecology: What makes the difference?* Trends in Ecology & Evolution, 11, 437–440. [https://dx.doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)20091-6](https://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(96)20091-6)
-  Wilensky, U. (1997). *NetLogo Wolf Sheep Predation model*. Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University, Evanston, IL. <http://ccl.northwestern.edu/netlogo/models/WolfSheepPredation>.
-  Wilensky, U. (1997). *NetLogo Cooperation model*. Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University, Evanston, IL. <http://ccl.northwestern.edu/netlogo/models/Cooperation>
-  Wilensky, U. (1999). *NetLogo*. Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University, Evanston, IL. <http://ccl.northwestern.edu/netlogo/>

-  Wilensky, U. (2006).
NetLogo Tabonuco Yagrumo Hybrid model.
Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling,
Northwestern University, Evanston, IL.
<http://ccl.northwestern.edu/netlogo/models/TabonucoYagrumoHybrid>.
-  Wilensky, U., Rand, W. (2015).
*An Introduction to Agent-Based Modeling: Modeling Natural, Social,
and Engineered Complex
Systems with NetLogo.*
MIT Press: Hong Kong.
-  Wilensky, U., Reisman, K. (2006).
*Thinking like a Wolf, a Sheep, or a Firefly: Learning Biology through
Constructing and Testing
Computational & Theories – An Embodied Modeling Approach.*
Cognition and Instruction, 24, 171–209.
https://dx.doi.org/10.1207/s1532690xci2402_1
-  Williams, R. A. (2018).
*Lessons learned on development and application of agent-based models
of complex dynamical systems.*
Simulation Modelling Practice and Theory, 83, 201–212.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.simpat.2017.11.001>.
-  Wilmoth, J., Doak, P., Timm, A., Halsted, M., Anderson, J.D., Prats, C.,
Portell, X., Ginovart, M., Retterer, S., Fuentes-Cabrera, M. (2018).
*A microfluidics and agent-based modeling framework for investigating
spatial organization in bacterial colonies: the case of Pseudomonas
aeruginosa and Type VI Secretion Interactions.*
Frontiers Microbiology, 9, 33.
<https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00033>