

SIMULACIÓN DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS UTILIZANDO EL MÉTODO DE MONTE CARLO

Ledda I. Larcher ^a, Carlos A. Cattaneo ^b

^a Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero
Av. Belgrano Sur 1912; 4200 Santiago del Estero, e-mail llarcher@unse.edu.ar, web page
<http://faa.unse.edu.ar>

^b Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero
Av. Belgrano Sur 1912; 4200 Santiago del Estero, e-mail cacatta@unse.edu.ar, web page
<http://faa.unse.edu.ar>

Palabras clave: simulación, Monte Carlo, crecimiento de microorganismos

Resumen. El objetivo de este trabajo es presentar un modelo de simulación de crecimiento de microorganismos, aplicando el método de Monte Carlo.

Aunque el crecimiento microbiano está gobernado por la acción simultánea de diferentes factores físicos y químicos limitantes y, por ende, la capacidad de sobrevivir e iniciar el crecimiento de cada tipo de microorganismo se ve influida por la acción conjunta de los mismos, en una primera aproximación se parte de condiciones ideales de desarrollo, fundamentalmente a los efectos de comparar las curvas de crecimiento obtenidas contra otras expuestas por trabajos basados en experimentación.

El sistema presentado estudia el crecimiento en un plano (sistema bidimensional), con tamaño fijo de microorganismo.

Para estudiar el crecimiento, se han tomado como parámetros, el período de vida del microorganismo, la cantidad de alimento disponible, la capacidad de reproducción.

Como resultado se obtienen las curvas de crecimiento en función del tiempo de Monte Carlo.

Las curvas obtenidas por simulación presentan coherencia con las curvas obtenidas experimentalmente. En las curvas de crecimiento pueden observarse las cuatro fases fundamentales de crecimiento de microorganismos: fase de latencia, fase de crecimiento, fase estacionaria y fase de muerte.

Para el análisis de la dinámica de crecimiento, se utilizan los modelos de crecimiento microbiano de Gompertz, el modelo logístico, y de Von Bertalanffy.

1 INTRODUCCION

El campo de la microbiología es muy amplio, abarcando el estudio de microorganismos que pueden tener un efecto tanto beneficioso como adverso en la salud humana, por ejemplo en la calidad y seguridad de comidas procesadas o su acción en el campo de los agroecosistemas. La principal herramienta de los microbiólogos es la posibilidad de identificar y cuantificar microorganismos; sin embargo, la inexactitud inherente a los procesos de enumeración, y la variación natural encontradas en las colonias, complican el trabajo. Acumular suficientes datos acerca del comportamiento de los microorganismos requiere mucho trabajo y es costoso. Además, aunque los datos pueden describir la respuesta de los microorganismos, expresan muy poco acerca de la relación entre los procesos fisiológicos y el crecimiento o la supervivencia. Una manera de reflejar estas relaciones es a través del uso de modelos matemáticos y de simulaciones.

Los modelos y simulaciones han sido ampliamente usados en todas las disciplinas científicas. Empezaron a usarse en microbiología de los alimentos a principios del siglo XX, buscando describir la inactivación de patógenos durante el procesamiento de alimentos. Desde entonces, con los avances realizados en informática, tanto hard como software, el uso de modelos y simulaciones en microbiología creció al punto de ser reconocida como una disciplina de la microbiología de alimentos, denominada “microbiología predictiva”, concepto introducido por [McMeekin *et al* \(1993\)](#). Entre las ventajas más notorias del uso de modelos computacionales y simulaciones se encuentra el potencial ahorro en lo referente al desarrollo de experiencias, la posibilidad de obtener respuestas confiables en menor tiempo, y el beneficio de poder almacenar datos que servirán de base a posteriores estudios.

[M. Ginovart \(2002\)](#) desarrolla un simulador denominado INDISIM (INDividual DIScrete SIMulations) que es discreto en espacio y tiempo y controla un grupo de bacterias en cada paso de tiempo usando variables aleatorias. Además considera variables dependientes del tiempo para cada bacteria. Mediante este simulador obtiene relaciones para propiedades microscópicas y globales de las colonias de bacterias en función de diferentes variables. En trabajos subsiguientes ([2002](#)), modela el crecimiento de bacterias en yogurt utilizando INDISIM para observar la influencia del tamaño de las bacterias en el procesamiento del mismo.

[Cickovski *et al* \(2004\)](#) desarrolla un software (COMPUCELL3D) para simulaciones tridimensionales para morfogénesis de diferentes organismos, que emplea modelos biológicos de crecimiento e interacciones con campos químicos. Parte del sistema se basa en el método de Monte Carlo utilizando el algoritmo de Metrópolis para implementar los posibles cambios de configuración en la red analizada.

[Whiting \(1995\)](#) distingue tres niveles entre los modelos de microbiología predictiva: los modelos de nivel primario describen los cambios en el número de microorganismos en el tiempo; los de nivel secundario brindan datos acerca del efecto de las condiciones ambientales y los modelos de nivel terciario combinan los dos primeros. Sobre esta base, [K. Grijspeerdt y P. Vanrolleghem \(1999\)](#) utilizaron los conceptos presentados en “Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth”, aunque se aplican a todos los tipos de modelo, la implementación práctica se restringe a un modelo de nivel 1.

El objetivo de este trabajo es presentar un modelo de simulación de crecimiento de microorganismos, aplicando el método de Monte Carlo.

Aunque el crecimiento microbiano está gobernado por la acción simultánea de diferentes factores físicos y químicos limitantes y, por ende, la capacidad de sobrevivir e iniciar el crecimiento de cada tipo de microorganismo se ve influida por la acción conjunta de los

mismos, en una primera aproximación se parte de condiciones ideales de desarrollo, fundamentalmente a los efectos de comparar las curvas de crecimiento obtenidas contra otras expuestas por trabajos basados en experimentación.

2 MODELO COMPUTACIONAL

En este trabajo, se ha seleccionado el método de Monte Carlo por ser un método estadístico que usa números aleatorios para elegir muestreos representativos de eventos de un conjunto extremadamente grande de posibles eventos. El método resulta extremadamente apropiado en sistemas que tienen un gran número de grados de libertad; éste es el caso de la simulación de crecimiento de microorganismos.

El crecimiento de microorganismos se estudia en un plano, sistema bidimensional, que es representado por una matriz cuadrada de dimensión ($N \times N$), y se considera que el microorganismo tiene tamaño fijo. La unidad fundamental de vida microbiana es un microorganismo y se representa en una posición de la matriz.

Las condiciones iniciales del simulador presentado son tamaño de la matriz; tiempo de simulación; población inicial de microorganismos, que está distribuida en lugares determinados de la matriz; cantidad de alimento disponible en cada elemento de la matriz; capacidad de los microorganismos para absorber alimentos; capacidad de reproducción de los microorganismos; período de viabilidad para un microorganismo y factor de disminución de vida para el microorganismo.

2.1 Funcionamiento:

Para realizar cada microensayo de Monte Carlo, se elige una posición al azar de la matriz; si la posición ya se encuentra ocupada por un microorganismo, se controla si hay alimento disponible para esa posición, en cuyo caso el microorganismo se alimenta. Como resultado, se disminuye la cantidad de alimento en un valor determinado, y luego se analiza la posibilidad de reproducción del microorganismo. Para ello, se genera una nueva posición al azar en las posiciones circundantes al microorganismo seleccionado, si este lugar está vacío se reproduce, generando un nuevo microorganismo que tiene el mismo período de viabilidad establecido en las condiciones iniciales. El microorganismo inicialmente seleccionado decrece su vida de acuerdo al factor de disminución de vida establecido en caso que el microorganismo se alimente. Si no hay alimento disponible en el primer lugar elegido, la vida del microorganismo decrece de acuerdo al factor de disminución de vida establecido para el caso que el microorganismo no se alimente (que puede ser igual o distinto al anterior). Si la posición elegida inicialmente no se encuentra ocupada por ningún microorganismo, se vuelve a generar otra posición al azar y se repite el ciclo.

La [Figura 1](#) muestra un diagrama de bloques del proceso antes referido.

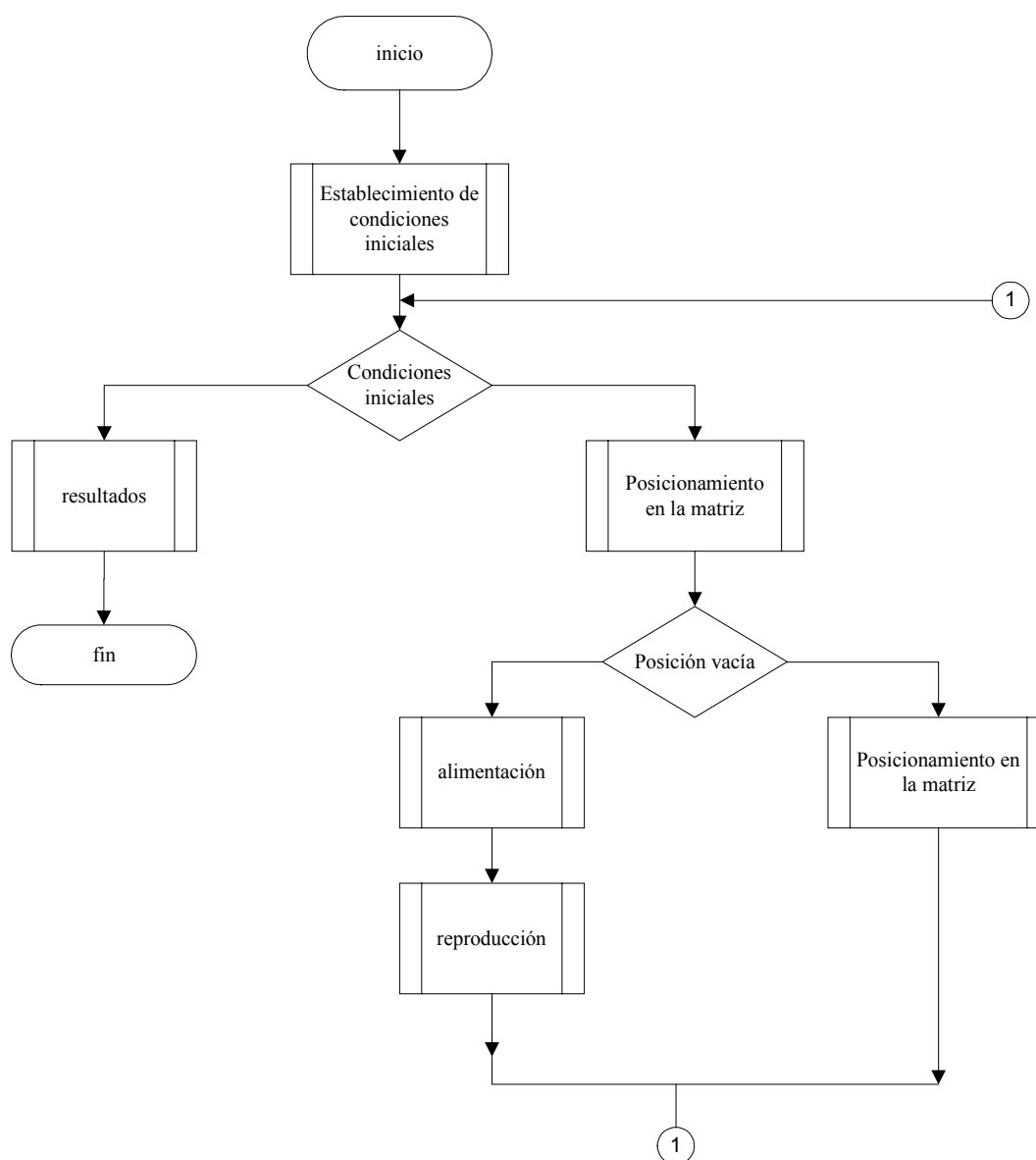


Figura 1. Diagrama de bloques del algoritmo

La unidad de tiempo de simulación se define como un paso de Monte Carlo (MCS) por sitio de matriz, el cual corresponde a $N \times N$ microensayos, donde $N \times N$ es el tamaño de la matriz.

Como resultado se obtienen la cantidad de microorganismos existentes, cantidad de alimento disponible, velocidad de crecimiento, a determinados tiempos de Monte Carlo.

3 RESULTADOS

Para las simulaciones realizadas se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros,

- Tamaño de la matriz donde se van a desarrollar los microorganismos
- Cantidad inicial de microorganismos
- Posición inicial de estos microorganismos
- Cantidad de alimento disponible por sitio de matriz (CA)
- Período de viabilidad para cada microorganismo (CV)

- Factor de disminución de vida para microorganismos si éste se alimenta (DV)
- Factor de disminución de vida para microorganismos si éste no se alimenta (DVSA)

Primero, se vio cómo variaban las curvas de crecimiento en función del tiempo de Monte Carlo para matrices de desarrollo de tamaño diferente, colocando inicialmente un microorganismo en el centro de la matriz. Los tamaños de matrices utilizados son 50x50; 100x100 y 200x200. Se asignaron los siguientes valores a los parámetros de desarrollo: CA=10, CV=150, DV=1, DVSA=1. Los resultados se muestran en la [Figura 2](#).

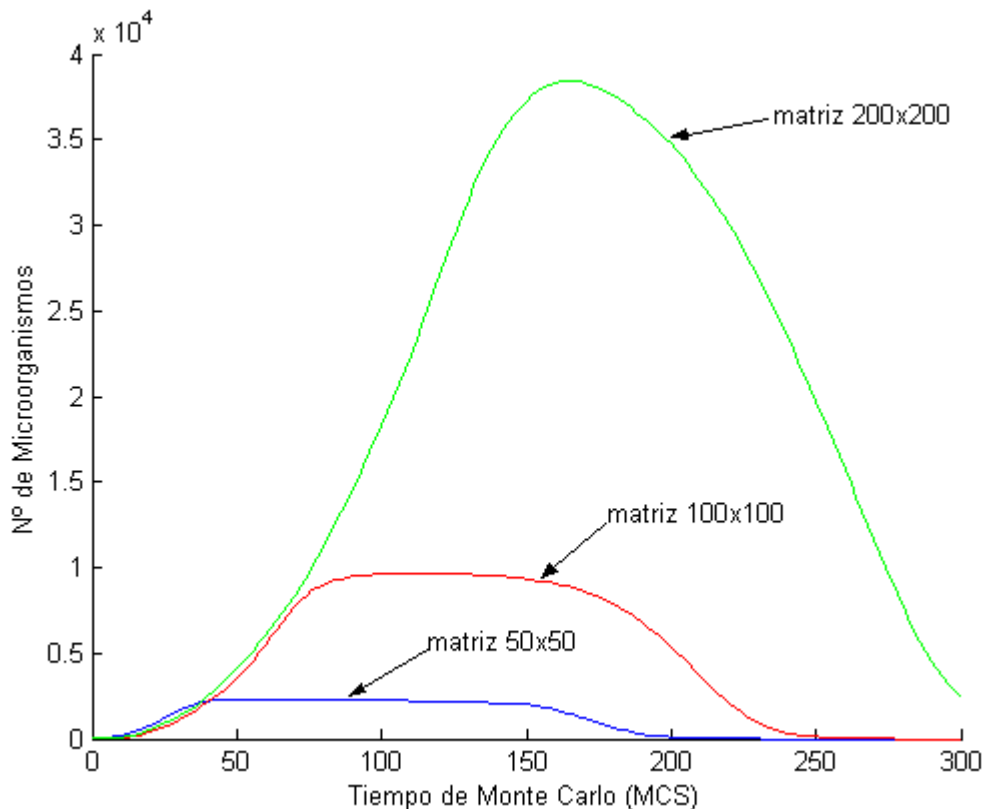


Figura 2. Evolución del crecimiento de microorganismos en función del tiempo de Monte Carlo, para distintos tamaños de matriz en la cual se desarrollan los microorganismos. Con CA=10, CV=150, DV=1, DVSA=1

Para todas las curvas se observa que se corresponden con las curvas de crecimiento experimentales de microorganismos en las que se pueden diferenciar las cuatro fases principales, como se indica en la Figura 3 donde se muestran las diferentes fases de crecimiento correspondientes a la matriz de 100x100. Hasta el punto 1, la fase de adaptación al medio (fase de lag). Del punto 1 al 2, la fase de crecimiento acelerado. Entre 2 y 3, la fase de crecimiento estacionario; y del punto 3 en adelante, la fase de muerte.

Además en la [Figura 2](#) podemos observar que el número máximo de microorganismos que se desarrollan está en relación directa con el tamaño de la matriz ([P. Vadasz et al, 2005](#)).

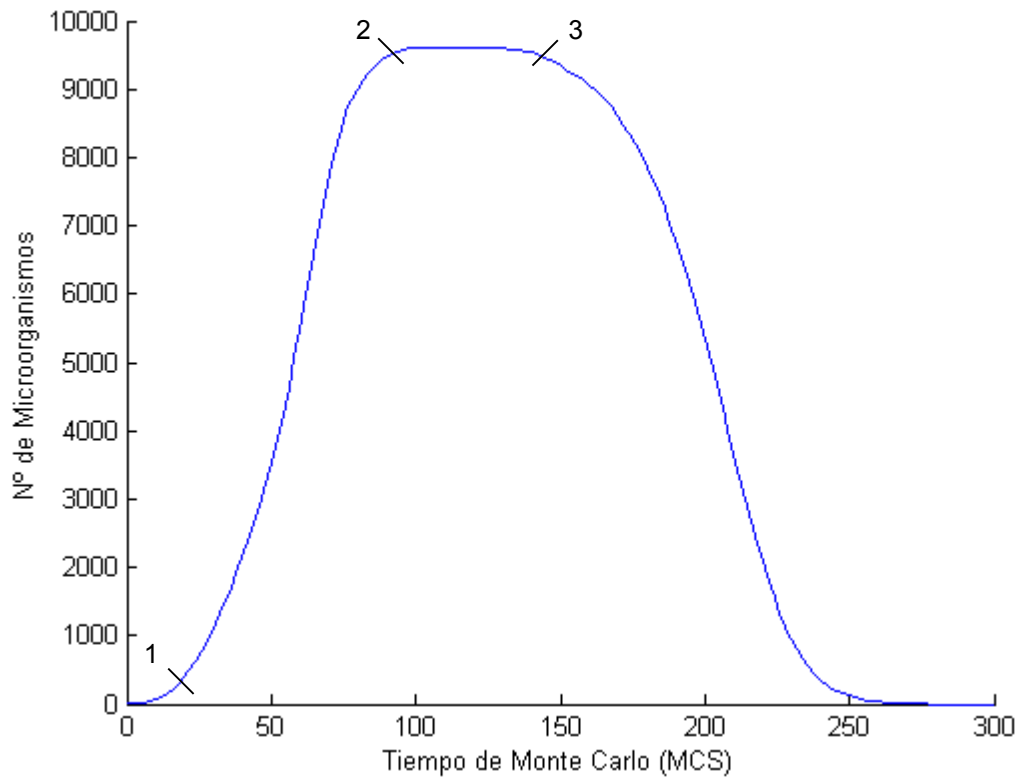


Figura 3. Distinción de las fases de crecimiento de microorganismos

Para analizar cómo afecta la posición del microorganismo inicial a las curvas de crecimiento, se consideraron las siguientes posiciones iniciales sobre una matriz de 100×100 , manteniendo los valores de los parámetros CA, CV, DV y DVSA. Las posiciones elegidas fueron el centro de la matriz, en una esquina de la matriz, y en el centro de un lateral de la matriz como se muestra en la [Figura 4](#).

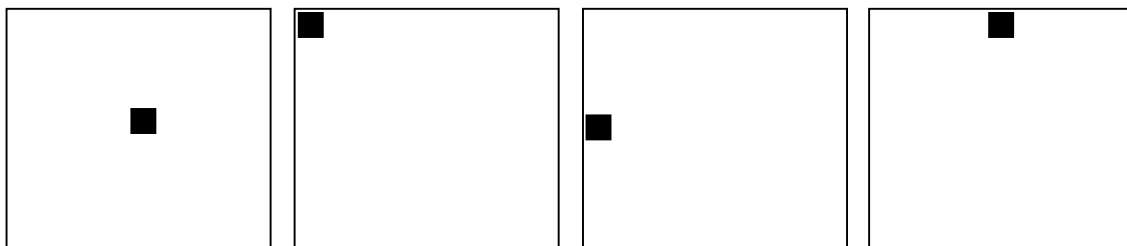


Figura 4. Posicionamiento inicial de microorganismos en la matriz $N \times N$

Los resultados obtenidos se muestran en la [Figura 5](#) donde se puede observar que la posición del microorganismo inicial producen un corrimiento hacia la derecha en la curva de crecimiento, mostrando que se necesita un tiempo mayor para obtener el mismo número de microorganismos: un microorganismo ubicado en el centro de la matriz tiene mayores posibilidades de desarrollarse pues tiene un mayor número de grados de libertad de elección para crecer, respecto de uno colocado en un lateral o en un vértice.

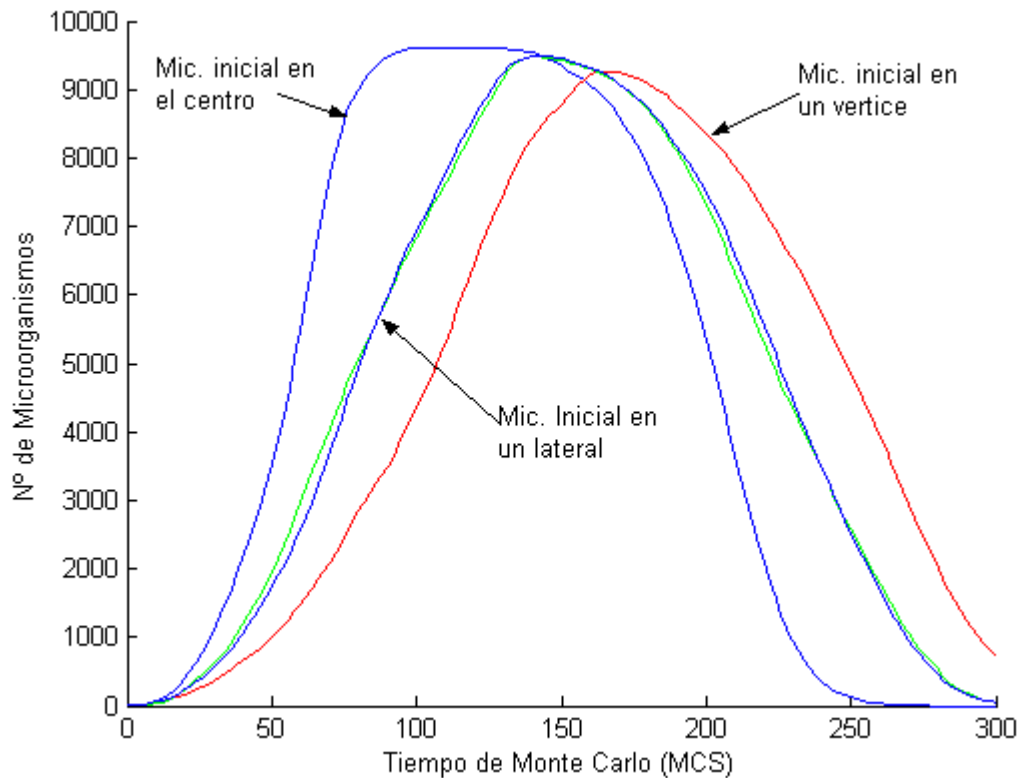


Figura 5. Evolución del crecimiento de microorganismos en función del tiempo de Monte Carlo, para distintas posiciones del microorganismo inicial. Tamaño de la matriz de desarrollo 100x100, con CA=10, CV=150, DV=1, DVSA=1

Para analizar la manera en que la cantidad inicial de microorganismos incide sobre las curvas de crecimiento, se consideraron distribuciones iniciales diferentes sobre una matriz de 100x100, manteniendo constantes los valores de los parámetros CA, CV, DV y DVSA. Las distribuciones elegidas fueron un microorganismo en el centro de la matriz; cinco microorganismos que se colocaron de la siguiente manera: un microorganismo en el centro $(N/2, N/2)$; y los restantes en las siguientes posiciones $(N/4, N/4)$, $(N/4, 3N/4)$, $(3N/4, N/4)$, $(3N/4, 3N/4)$. Y para nueve microorganismos iniciales, a los cinco anteriores se agregaron en las posiciones $(N/4, N/2)$, $(N/2, N/4)$, $(N/2, 3N/4)$, $(3N/4, N/2)$, donde N es la dimensión de la matriz. La Figura 6 muestra un esquema de las distribuciones mencionadas. La Figura 7 muestra los resultados obtenidos.

Puede observarse que un aumento en la cantidad inicial de microorganismos produce un corrimiento de las curvas hacia la izquierda, lo que indica que al aumentar el número de microorganismos iniciales se dispone de mayor cantidad de núcleos para el desarrollo de colonias de microorganismos.

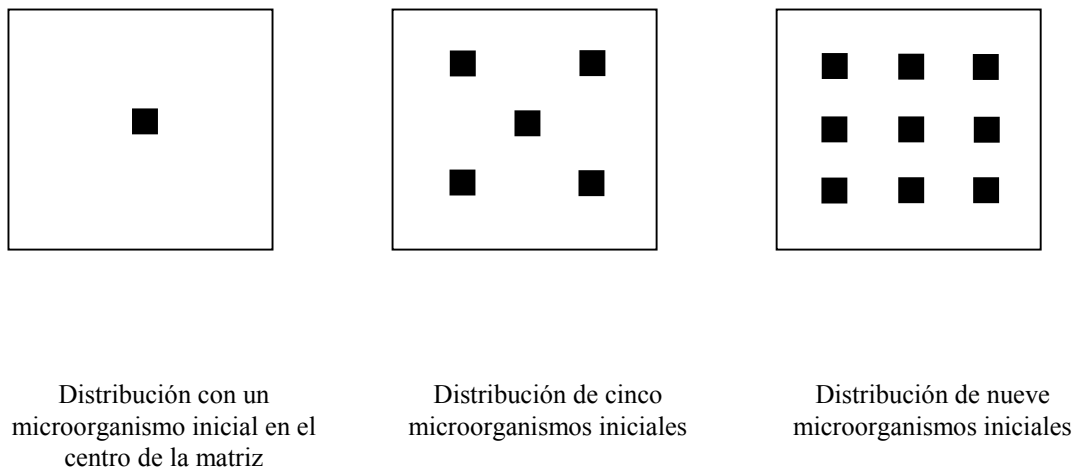


Figura 6. Distribución inicial con diferente cantidad de microorganismos sobre una matriz 100x100.

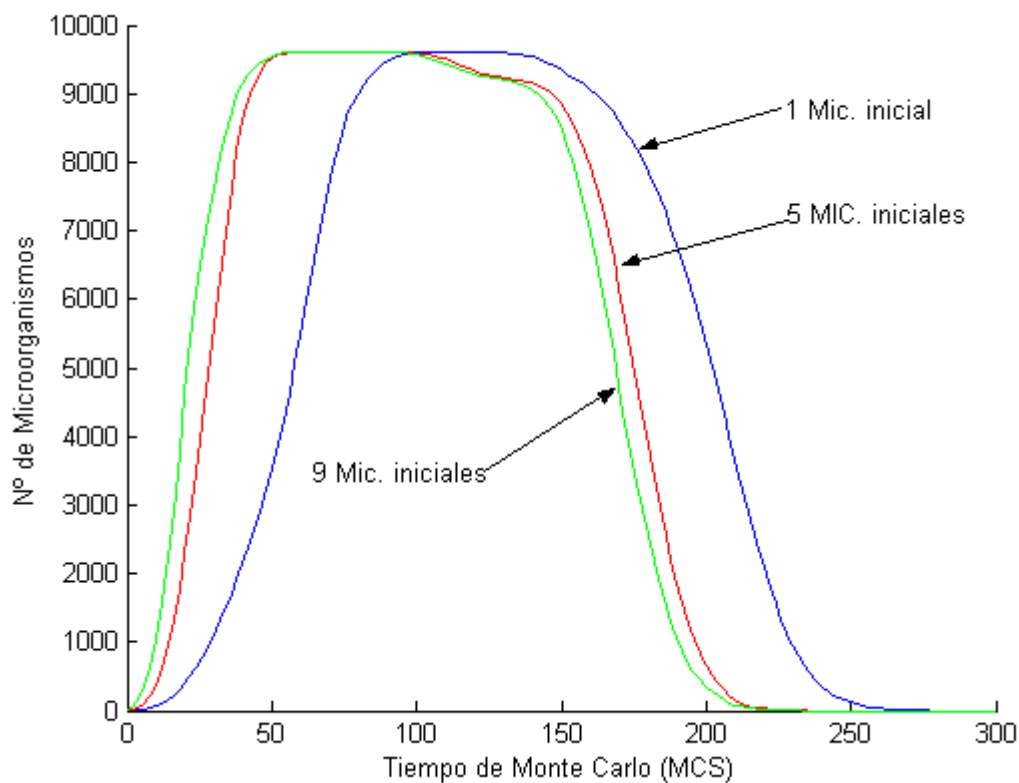


Figura 7. Evolución del crecimiento de microorganismos en función del tiempo de Monte Carlo, para distintas cantidades iniciales de microorganismo. Tamaño de la matriz de desarrollo 100x100, con CA=10, CV=150, DV=1, DVSA=1

A continuación se realizaron simulaciones variando el período de viabilidad de los microorganismos (parámetro CV) sobre una matriz 100x100, y manteniendo constantes la cantidad de alimento por microorganismo (CA), el coeficiente de disminución de vida para microorganismos si éste se alimenta (DV), el coeficiente de disminución de vida para microorganismos si éste no se alimenta (DVSA). Los resultados obtenidos se muestran en la

Figura 8. Puede observarse que el aumento de este factor produce un aumento en el número máximo de microorganismo hasta alcanzar la fase estacionaria, y también se observa el aumento de la fase de crecimiento estacionario a medida que este factor sigue aumentando (se prolonga la vida del microorganismo).

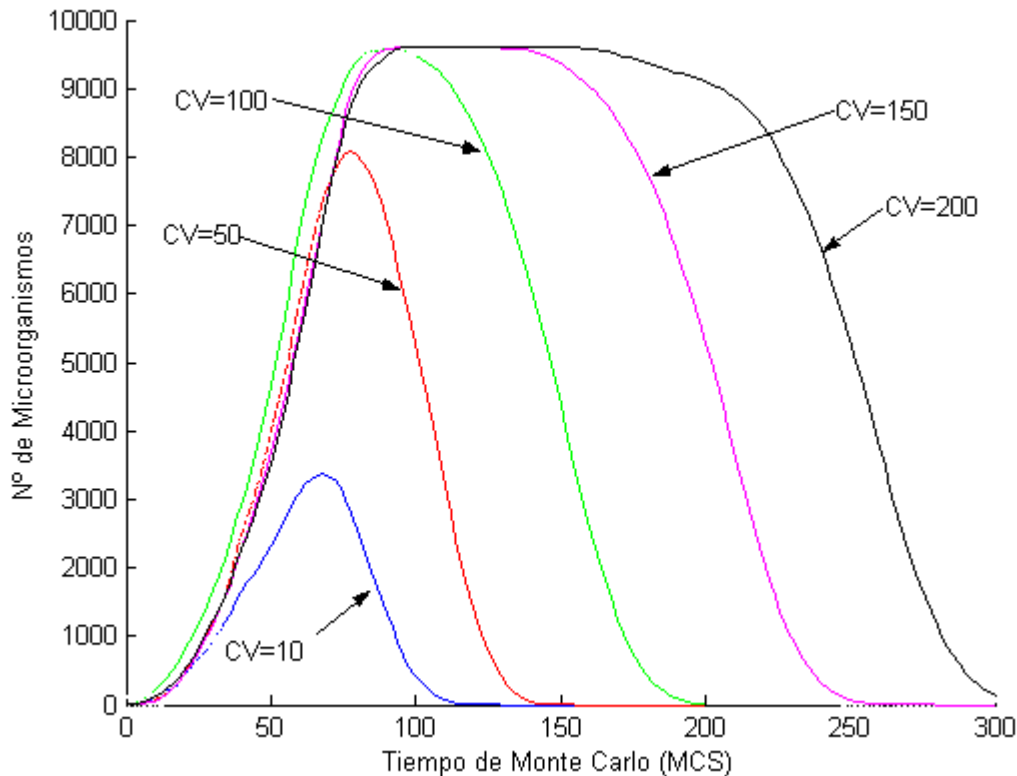


Figura 8 Evolución del crecimiento de microorganismos en función del tiempo de Monte Carlo, para distintas cantidades de vida disponible por microorganismo (CV). Tamaño de la matriz de desarrollo 100x100, con CA=10, DV=1, DVSA=1

Posteriormente, se realizaron pruebas sobre una matriz 100x100 variando el coeficiente de disminución de vida para microorganismos si éste no se alimenta (DVSA), esta vez manteniendo constantes la cantidad de alimento disponible por sitio de matriz (CA), el período de viabilidad cada microorganismo (CV) y el coeficiente de disminución de vida para microorganismos si éste se alimenta (DV). Los resultados se muestran en la Figura 9 en la que podemos apreciar que un aumento en el factor de disminución de vida por no contar con alimento, resulta en la reducción de la fase de crecimiento estacionario y en una aceleración de la fase de muerte.

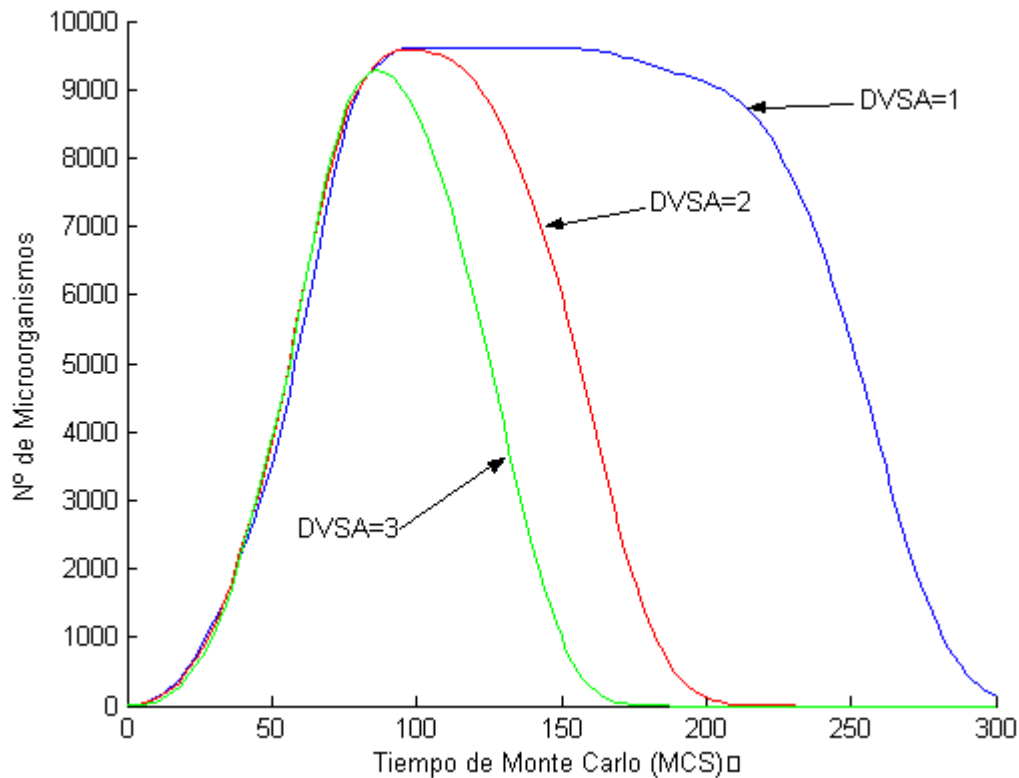


Figura 9 Evolución del crecimiento de microorganismos en función del tiempo de Monte Carlo, para distintas disminuciones de vida si el microorganismo no tiene alimento (DVSA). Tamaño de la matriz de desarrollo 100x100, con CA=10, CV=200, DV=1.

En corridas posteriores se mantienen constantes el coeficiente de disminución de vida para microorganismos si éste no se alimenta (DVSA), el período de viabilidad de cada microorganismo (CV) y el coeficiente de disminución de vida para microorganismos si éste se alimenta (DV), variando la cantidad de alimento disponible por sitio de matriz (CA). Se muestran los resultados en la [Figura 10](#). Se observa que al aumentar la cantidad de alimento se produce un aumento en el número máximo de microorganismos, y se prolonga la fase de crecimiento estacionario.

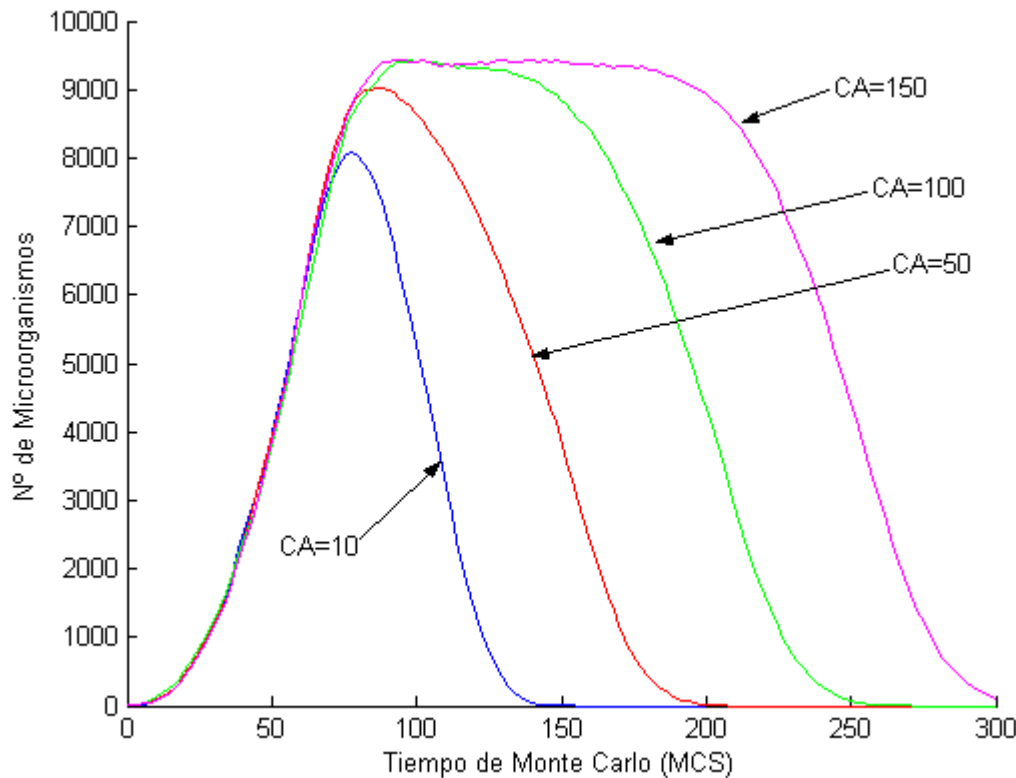


Figura 10 Evolución del crecimiento de microorganismos en función del tiempo de Monte Carlo, para distintas cantidades de alimento disponible (CA). Tamaño de la matriz de desarrollo 100x100, con CV=50, DV=1, DVSA=1.

Una vez comprobado que los cambios en las variables reflejan los comportamientos de crecimiento de microorganismos (A. Amézquita et al, 2005; K. Grijsperdt et al, 1999; S. Perni et al, 2005; M. Cayré et al, 2005) se analizó la dinámica de crecimiento.

Para estudiar el ajuste de estos modelos respecto de las curvas de crecimiento obtenidas con el algoritmo presentado en este trabajo, se utilizaron matrices de crecimiento de 1000x1000, con 9 microorganismos iniciales distribuidos al azar y CA=5000, CV=1000, DV=1, DVSA=1. La dimensión de la matriz es la máxima permitida por la cantidad de memoria RAM en la computadora utilizada para ejecutar los programas.

Si bien los modelos matemáticos desarrollados para modelizar el crecimiento microbiano son cada vez más elaborados y complejos, dentro del grupo de modelos continuos (basados en ecuaciones diferenciales) es posible distinguir dos grandes bloques. Los primeros consideran variables temporales y espaciales, el segundo grupo considera sólo variables temporales. Es con estos tipos de modelos que analizaremos las curvas de crecimiento obtenidas durante las simulaciones.

Se seleccionaron los modelos de Gompertz, modelo logístico y modelo de Von Bertalanffy. Estos modelos sirven para ajustar curvas de forma sigmoidal (O. García, 2005), como la obtenida al ejecutar las simulaciones (Figura 11)

La expresión del modelo logístico (Ricker, 1979) es:

$$S(t) = \frac{A}{1.0 + B \cdot 10^{(-k \cdot t)}} \quad \text{donde } B = \frac{A - S(0)}{S(0)} \quad (1)$$

El modelo de Gompertz (M. Zwietering et al. 1990):

$$S(t) = A \cdot 10^{(-B \cdot 10^{(-k \cdot t)})} \text{ donde } B = \log\left(\frac{A}{S(0)}\right) \quad (2)$$

El modelo de Von Bertalanffy (J. I. López Sánchez et al, 2005):

$$S(t) = \left[A^{1/3} - B \cdot 10^{(-k \cdot t)} \right]^3 \text{ donde } B = A^{1/3} - S(0)^{1/3} \quad (3)$$

donde $S(0)$ es la población inicial de microorganismos, A está relacionada con la máxima cantidad de microorganismos alcanzados y k es la constante de ajuste.

La Figura 11 muestra los tres modelos de ajuste para una simulación realizada con una matriz de 1000×1000 con 9 microorganismos iniciales distribuidos al azar y $CA=5000$, $CV=1000$, $DV=1$, $DVSA=1$.

Las constantes de ajuste son para el modelo Logístico $k = 0.025$; para el modelo de Gompertz $k = 0.0058$; y para el modelo de Von Bertalanffy, $k = 0.0035$.

Puede observarse en la Figura 11 que los modelos de Gompertz y Von Bertalanffy ajustan mejor el crecimiento mostrando una tendencia similar a la obtenida mediante las simulaciones.

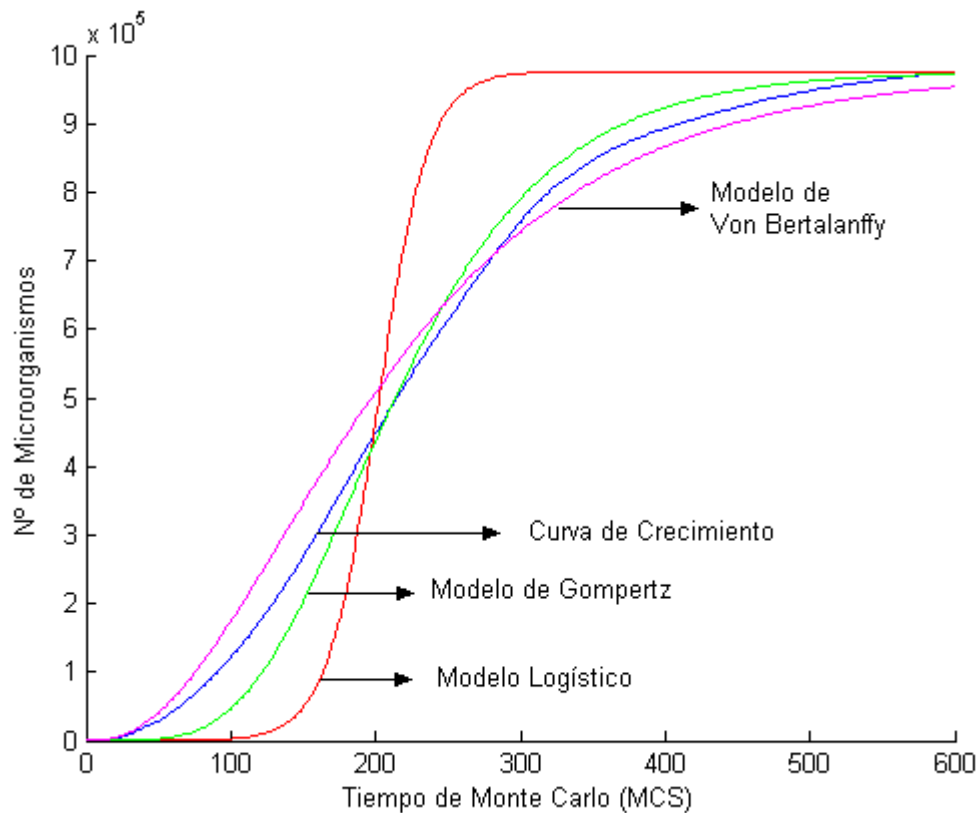


Figura 11. Ajuste de la curva de crecimiento obtenida en una matriz de 1000×1000 según los modelos logístico, Gompertz y Von Bertalanffy

4 DISCUSIONES

El modelo de simulación presentado tiene en cuenta el crecimiento de microorganismos sobre un sistema bidimensional. Se considera que dichos microorganismos son de tamaño fijo y que carecen de movilidad. El modelo se basa en el método de Monte Carlo para elegir los muestreos representativos de cada evento.

Las curvas de crecimiento obtenidas mediante la simulación presentan similitud con las curvas experimentales y con las obtenidas por otros modelos de simulación (Amézquita *et al*, 2005; Grijspeerdt *et al*, 1999; Perni, 2005; Cayré, 2005; Ginovart *et al*, 2002).

El modelo presentado permite obtener curvas de crecimiento de microorganismos en las que es posible observar las cuatro fases principales de crecimiento (Vadasz, 2005) como se observa en la Figura 3.

Se ha comprobado que el algoritmo planteado es sensible a las condiciones iniciales de la simulación, tamaño de la matriz; tiempo de simulación; población inicial de microorganismos, que está distribuida en lugares determinados de la matriz; cantidad de alimento disponible en cada elemento de la matriz; capacidad de los microorganismos para absorber alimentos; capacidad de reproducción de los microorganismos; período de viabilidad para un microorganismo y factor de disminución de vida para el microorganismo, mostrando que la curva de crecimiento obtenida por la simulación son sensibles a estos parámetros. Figuras 2, 5, 7, 8, 9 y 10.

Los modelos de Gompertz y Von Bertalanffy presentan un buen ajuste para las curvas obtenidas por simulación, no así el modelo logístico (Figura 11).

REFERENCIAS

- A. Amézquita, C. L. Weller, L. Wang, H. Thippareddi, D. E. Burson. Development of an integrated model for heat transfers and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. *International Journal of Food Microbiology*, 101:123-144, 2005.
- M. E. Cayré, G. Vignolo y O. A. Garro. Crecimiento e inhibición de *Brochothrix thermophacta* en productos cárnicos. Comunicación Científica y tecnológica. Universidad Nacional del Nordeste, Resumen E054, 2005.
- T. Cickovski, C. Huang, R. Chaturvedi *et al*. A framework for three-dimensional simulation of morphogenesis. *IEEE / ACM Transactions on computational biology and bioinformatics*, September 13th, 2004
- O. García. Unifying sigmoid univariate growth equations. *FBMIS*, Vol. 1, 63-68, 2005.
- M. Ginovart, D. López, J. Valls y M. Silbert. Simulation modelling of bacterial growth in yogurt. *International Journal of Food Microbiology* 73:415-425, 2002.
- M. Ginovart, D. López y J. Valls. INDISIM, An Individual-based Discrete Simulation Model to study bacterial cultures. *Journal theor. Biol* 214:305-319, 2002.
- K. Grijspeerdt y P. Vanrolleghem. Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. *Food Microbiology*, 16:593-605, 1999.
- J. L. López Sánchez y J. L. Arroyo Barrigüete. Modelos matemáticos de difusión tecnológica. *IX Congreso de Ingeniería de Organización*, 2005.
- T. McMeekin, J. Olley, T. Ross, D. Ratkowsky. Predictive Microbiology: Theory and application. John Wiley & Sons, Chichester, UK. 1993.
- S. Perni, P. W. Andrew y G. Shama. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. *Food Microbiology* 22:491-495, 2005.

- W. E. Ricker. Growth rates and models. *Fish Physiol.* 8:677-743, 1979.
- P. Vadasz y A. S. Vadasz. Predictive modeling of microorganisms: *LAG* and *LIP* in monotonic growth. *International Journal of Food Microbiology.* 102:257-275, 2005.
- R. C. Whiting. Microbial modeling in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition.* 35, 467-494, 1995.
- M. H. Zwietering, I. Jongen Burger, F. M. Rombouts, K. van't Riet, K. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1875-1881, 1990.