

4. SIMULACIÓ DISCRETA DEL COMPORTAMENT DEL FONG FILAMENTOS



4. SIMULACIÓ DISCRETA DEL COMPORTAMENT DEL FONG FILAMENTOS

4.1. INTRODUCCIÓ

L'objectiu que volem assolir en aquest apartat del treball és la utilització de la metodologia desenvolupada, fonamentada en la simulació discreta, per a l'estudi d'un nou sistema viu amb característiques força diferenciades respecte les aplicacions presentades anteriorment (bacteris i llevats): els fongs filamentosos. Esperem que aquesta metodologia permeti un avanç qualitatiu en les possibilitats de modelatge d'aquest sistema biològic, millorant la comprensió sobre la seva manera de funcionar. Aquest coneixement pot revertir en la optimització d'aquells processos tecnològics i industrials on intervé.

Amb la primera versió del nou simulador elaborat, es vol aconseguir aprofundir i facilitar l'estudi conjunt del desenvolupament micelar dels fongs filamentosos i de les seves principals activitats metabòliques. De forma particular, el comportament del fong filamentos *Aspergillus niger* i la seva activitat metabòlica en la producció d'àcid cítric. L'objectiu és desenvolupar un model que aconsegueixi integrar el desenvolupament espacial i temporal d'aquest fong filamentos i la producció d'àcid cítric. La implementació d'aquest model en un simulador ha de demostrar la seva capacitat de reproduir el comportament global i específic d'aquest microorganisme en l'entorn, una superfície, escollit per al seu creixement.

Per a l'elaboració del model ha estat imprescindible primer fer una recerca bibliogràfica sobre el comportament biològic i metabòlic del fong filamentos, de forma principal sobre el grup d'*Aspergillus niger*, així com un recull de dades i resultats experimentals (Ibáñez i Vaquero, 1995). Algunes d'aquestes bases biològiques serviran de referència per al disseny d'aquest model, mentre que la recerca de dades experimentals és necessària per comparar i validar els resultats de les primeres simulacions fetes. És important assenyalar, com succeeix a l'inici d'aquest tipus d'investigació, que part de la informació recollida i no utilitzada en aquesta primera aproximació, possibilitarà millorar i sofisticar el model que presentem.

Amb el simulador s'han realitzat una sèrie d'evolucions i s'han comparat amb alguns dels resultats experimentals, provant la fiabilitat del model i validant-lo.

4.2. DESCRIPCIÓ DEL SISTEMA: ALGUNES CARACTERÍSTIQUES GENERALS DELS FONGS FILAMENTOSOS

4.2.1. INTRODUCCIÓ

Per poder abordar el model implementat al simulador és necessari un coneixement previ de l'organisme que volem estudiar, d'algunes de les seves principals característiques, principalment d'aquelles que es reflectiran directament en les hipòtesis formulades (Ibáñez i Vaquero, 1995). De forma molt breu i esquemàtica presentarem el sistema biològic objecte d'estudi, incidint en aquells aspectes que tenen especial importància en el procés de creixement, que més endavant seran utilitzats i introduïts com a paràmetres claus en la modelització i en la simulació.

Els llevats (tractats en el capítol anterior) són fongs que tenen com a forma vegetativa normal la unicel·lular. Aquest és l'aspecte a que es fa referència per distingir entre les "podridures" o fongs filamentosos, i els llevats o fongs unicel·lulars. En el fongs filamentosos, la unitat de reproducció, l'espóra, quan troba condicions favorables que permetin el seu creixement vegetatiu germina. En un punt de l'espóra la paret sofreix una elongació filamentosa, emetent un llarg filament que porta a l'aparició de la primera hifa. Aquesta creix pel seu extrem i també es ramifica de forma repetida. A mesura que s'allarga, es va obtenint un sistema ramificat de hifes que constitueixen el que s'anomena miceli. Aquest miceli consta d'una massa de citoplasma plurinucleat tancada en una estructura o sistema de tubs rígids i ramificats. Per tant, el sistema que ens proposem estudiar és força diferent dels sistemes utilitzats prèviament: els bacteris i els llevats. Aquesta forma de creixement té algunes avantatges, ja que per exemple les cèl·lules no s'apilen unes sobre les altres, i la seva tendència a envair el substrat en el medi permet la utilització de nutrients que d'altre forma només serien aprofitables gradualment per difusió. Els llevats difícilment desenvolupen miceli.

D'entre els fongs filamentosos, les espècies del gènere *Aspergillus* es poden trobar en molts tipus de medi, tenen capacitat de créixer i expandir-se sobre una gran varietat de substrats orgànics. Estan implicats en un gran nombre de processos industrials. D'aquest gènere, *Aspergillus niger* és un dels més comuns i més utilitzats per la indústria en la producció d'àcids, d'enzims i de pigments. En particular, és el principal productor d'àcid cítric a partir de la glucosa.

4.2.2. ESTRUCTURA

D'entre els principals elements cel·lulars dels fongs que es troben en el protoplasma (nucli cel·lular i citoplasma) i dels que formen part de la membrana cel·lular, referenciem

en aquest apartat només alguns orgànuls que estan localitzats en el citoplasma, i que relacionarem més endavant amb el creixement, les vacuoles i les vesícules:

1) Les vacuoles han estat reconegudes com uns orgànuls amb una extensa sèrie de funcions dins del metabolisme cel·lular. Estan probablement relacionades amb l'adaptació de nutrients, i amb importants funcions de regulació interna, emmagatzement de substàncies de reserva i enzims. En les regions on existeix creixement actiu hi ha poca presència de vacuoles, però a mesura que la hifa madura i envelleix es formen més vacuoles que s'incorporen a les regions subapicals, zones per darrera de la punta de la hifa. En micelis relativament vells, una proporció elevada del volum de la hifa està ocupada per vacuoles.

2) Tot creixement de la hifa suposa una agregació de vesícules (orgànuls que es troben en el citoplasma), ja sigui en les puntes de les hifes, els àpexs, en les regions on es produeixen ramificacions, o en els punts de desenvolupament dels òrgans de fixació. Així la majoria de les vesícules es troben en la regió apical de les hifes, les seves puntes, i en alguns punts de ramificació. Són molt poques les que es troben en el citoplasma subapical, on de vegades es troben associades a algunes estructures membranoses que semblen correspondre als "aparells o cossos" de Golgi. Això suggereix que les vesícules sorgeixen de les estructures membranoses de les regions subapicals i que són transportades a través del citoplasma fins l'àpex de la hifa. Les vesícules emmagatzemen enzims que intervenen en la síntesi i lísis de la paret cel·lular.

El tal·lus dels fongs, el conjunt de porcions vegetatives (hifa-miceli) i estructures especialitzades, està format típicament per filaments microscòpics que es ramifiquen en totes les direccions, desplegant-se per sobre o per dins del substrat que li serveix d'aliment. Cadascun d'aquest filaments o hifes formen part del conjunt, del miceli. La hifa és en essència un tub format per una paret cel·lular rígida per on flueix el protoplasma, de longitud variable i en general de diàmetre constant, depenent aquest de l'espècie de fong i de les condicions externes. La hifa acaba en una punta i a la regió cònica de la mateixa se l'anomena zona d'extensió, la regió de creixement més actiu de la paret.

Les hifes de molts fongs tenen parets transversals espaiades regularment que s'anomenen septes, i que es poden apreciar amb el microscòpic òptic. Generalment aquestes parets tenen un porus o obertura central que permet la continuïtat de citoplasma entre els compartiments adjacents, els quals es troben interconnectats i on es possible veure aquest flux constant de citoplasma cap a l'àpex de la hifa, aportant-li el material per al seu creixement. Podem dir que les hifes consten de compartiments, i no de cèl·lules.

La longitud del compartiment apical de la hifa varia entre les diferents espècies i en una mateixa colònia. Té un citoplasma molt dens i petites vacuoles. En el seu extrem s'observa una notable acumulació de vesícules. En compartiments per darrera d'aquest, les

vacuoles que es troben són cada cop més grans a mesura que ens allunyem de l'apex. La funció dels septes és probablement, entre d'altres, de sostenir per a les hifes i de línia de defensa contra danys soferts. Progressivament els porus d'aquests septes es tanquen a mesura que envelleixen les hifes. Una altra de les funcions a les que actualment es presta atenció és a la diferenciació. Aquests septes poden aïllar completament compartiments adjacents de manera que dintre d'ells es duen a terme diferents processos bioquímics i fisiològics, com per exemple la esporulació.

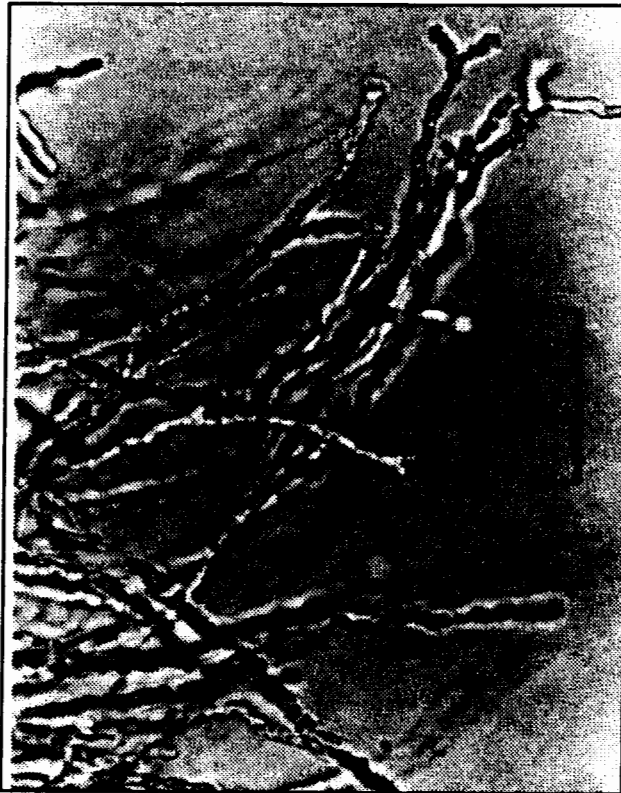


FIGURA 4.1. Creixement de *Aspergillus niger* a les 50 hores de la incubació. Font: Kisser (1980) dins de Ibáñez i Vaquero, 1995.

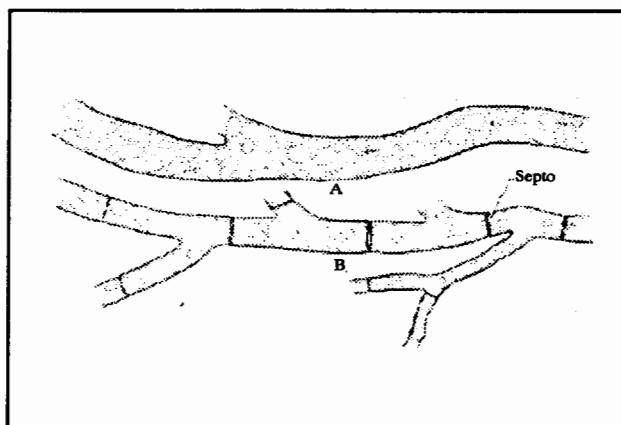


FIGURA 4.2. A. Porció de hifa no septada. B. Porció de hifa septada. Font: Alexopoulos (1985) dins de Ibáñez i Vaquero, 1995.

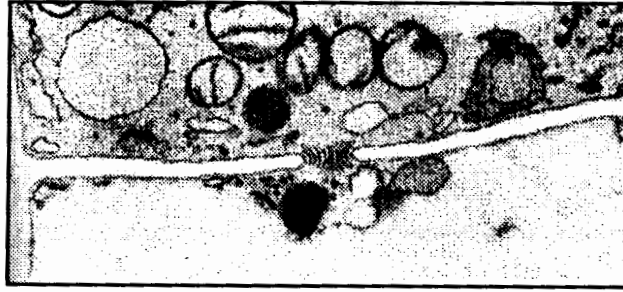


FIGURA 4.3. Micrografia electrònica de transmissió d'una secció longitudinal mitjana d'un septe amb porus central. Font: Alexopoulos (1985) dins de Ibáñez i Vaquero, 1995.

Al llarg d'una hifa, en condicions normals, les ramificacions es poden originar en punts diversos, exceptuant en l'àpex, formant noves branques que a la vegada també poden ramificar, fins assolir un aspecte per a la colònia com el que mostra la figura 4.4..

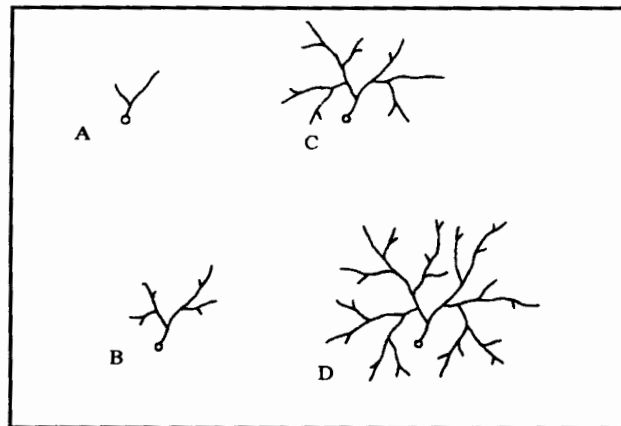


FIGURA 4.4. Etapes del desenvolupament d'una colònia fúngica a partir de la germinació d'una espóra. Font: Deacon (1988) dins de Ibáñez i Vaquero, 1995.

La cèl·lula de reproducció dels fongs és l'espóra, de les quals n'hi ha de diferents tipus amb estructures extremadament variades (asexuals i sexuals). Els fongs posseeixen mecanismes suficientment desenvolupats com per poder superar la inèrcia que els uneix al miceli progenitor, moltes de les espècies estan especialitzades en explosions o expulsions per alliberar les espores per a la seva difusió, i en assegurar que el moment d'alliberació d'aquestes sigui l'apropiat per als seus futurs desenvolupaments.

4.2.3. NUTRICIÓ

Els fongs filamentosos obtenen els components orgànics del substrat que conté el medi on es desenvolupen, preferentment humit per poder mantenir la permeabilitat de la membrana estable i permetre la difusió lliure de nutrients. Les molècules orgàniques més simples, com els monosacàrids, aminoàcids i àcids orgànics passen a través de la membrana cel·lular,

mentre que molècules més complexes s'han de degradar a monòmers en l'exterior de l'organisme mitjançant enzims alliberats a través de la membrana o units a aquesta. Obtenen la seva energia per respiració o fermentació de materials orgànics solubles, essent la glucosa el principal i més important, encara que poden utilitzar altres compostos com la sacarosa, la maltosa, el midó, i el nitrogen orgànic. Molts d'ells també tenen capacitat de fer ús del nitrogen inorgànic, l'amoni o els nitrats. En el laboratori es cultiven els fongs sobre medis sintètics, tant líquids com sòlids.

El pas de materials, entre l'interior i l'exterior de la hifa, es produeix per la permeabilitat selectiva que té la membrana plasmàtica, que pot seleccionar nutrients d'una mescla i captar preferentment algunes molècules. Algunes molècules passen a través de la membrana per difusió passiva, entren al compartiment mitjançant un moviment sotmès a un gradient electroquímic, que no utilitza energia metabòlica. Aquest flux és la resposta a un gradient de concentració entre els dos costats de la membrana. Altres passen per difusió facilitada, amb l'ajut de proteïnes transportadores, ja que individualment serien impermeables a la membrana. Els fongs també són capaços de transportar nutrient en contra d'un gradient, la qual cosa requereix l'ús d'energia metabòlica (transport actiu).

Els fongs en degradar certes substàncies produeixen zones d'erosió enzimàtica o zones d'esgotament de substrat al voltant de les hifes. A mesura que decreix la seva eficiència per a l'obtenció de nutrients el fong ha de créixer de forma continuada cap a noves zones. Tot el citoplasma que queda aleshores en les zones velles es torna superflu, ja que no pot aconseguir més nutrient. Pot ser sigui aquesta una de les raons per al seu tipus de creixement filamentós i ramificat. Les puntes hifals creixen per tant en regions que tenen nutrients no explotats pel miceli. També en trobar-se el fong en medis de distribució irregular i deficient de nutrients, les colònies que es formen poden anar alterant la seva forma i distribució.

4.2.4. METABOLISME

Podríem distingir dos tipus de metabolismes que anomenarem metabolisme primari i metabolisme secundari.

En el metabolisme primari, quan els materials nutritius han estat absorbits del medi, les molècules són degradades per a la producció d'energia o per a la provisió de materials bàsics, tant per a la biosíntesi de metabolits cel·lulars, com per als components cel·lulars necessaris per al creixement del miceli i el seu manteniment.

La conversió del substrat consumit i la seva eficiència en aquest procés és de força interès en la indústria, on el principal objectiu és la producció de certs productes de gran valor comercial per part del fong. Els factors ambientals i l'edat del cultiu semblen tenir un gran

efecte sobre aquesta eficiència sintètica.

La utilització que es fa del terme secundari és molt diversa, i fins i tot pot arribar a ser confusa, així, el concepte de metabolisme secundari pot ser molt ampli. Succeeix quan les vies metabòliques no són utilitzades per al creixement, el qual aleshores es restringeix. L'interès d'aquest metabolisme és dona en relació a la producció de certs components o productes per part dels fongs que no es troben relacionats amb el creixement del miceli.

Si la regulació de les vies metabòliques primàries s'ha trencat, les vies secundàries entren en funcionament, produint com a resultat components o productes que anomenem metabolits secundaris, formats a partir de diversos intermediaris involucrats en els processos de creixement i obtenció d'energia. Aquests són alliberats a l'exterior de la hifa. Malauradament, la situació cel·lular de la síntesi i dels mecanismes de secreció d'aquests productes, que poden ser produïts a gran escala, és encara en general desconeguda. Es coneixen pocs que tinguin alguna funció determinada o útil per a l'organisme que el produeix, i no se sap la raó de la seva aparició, encara que actualment es creu que el que és més important de tot això són els processos que els porten a terme, una mena de "vàlvula de seguretat" per deixar escapar intermediaris de les vies metabòliques bàsiques. Sembla també possible que la producció d'aquests components serveixi per a mantenir la maquinària bioquímica dels fongs intacte i funcionant, de forma que es pugui reempendre el metabolisme primari en produir-se un canvi favorable en les condicions externes. També pot està considerat com una forma de diferenciació bioquímica en els cultius d'edat, en envellir els compartiments s'alteren els seus mecanismes reguladors (alguns autors suposen que durant el creixement normal actuen a nivells molt baixos), a més de poder anar acompanyat amb una diferenciació morfològica. La producció d'aquestes substàncies és extremadament específica en relació a les espècies que la porten a terme, o fins i tot a certes soques d'una mateixa.

Si tenim en compte que les hifes dels fongs filamentosos creixen només per les puntes, les cèl·lules més velles queden endarrera i per tant aquests metabolits secundaris es poden acumular en les parts més velles de la colònia, mentre aquesta encara segueix creixent en les seves vores o perifèria.

Alguns fongs tenen la capacitat d'acumular àcids orgànics en el medi de cultiu. Per exemple, l'àcid cítric es produït comercialment pel fong filamentós *Aspergillus niger* en medis rics en glucosa (15% - 20%) amb un pH baix (aproximadament de 2). Fins el 95% de la glucosa subministrada pot convertir-se en àcid cítric en aquestes condicions. Aquest procés està relacionat amb la inhibició, al menys parcial, del creixement vegetatiu normal i el tractarem en l'apart 4.2.6. de forma específica.

4.2.5. CREIXEMENT

El creixement del fong filamentos, en medi líquid o en medi sòlid, pot ser considerat a nivell de colònia o a nivell d'hifa. El creixement superficial de la hifa en medi sòlid (el que volem modelar en aquesta primera etapa) s'origina de tal manera que aquesta prolifera i ramifica en totes direccions des del seu punt original d'inoculació. El creixement en extensió de la colònia s'esdevé a través de les puntes de les hifes. En un medi líquid estàtic el creixement pot ser submergit o, més usualment, en la superfície de forma similar al que es produeix en medi sòlid. En medis líquids amb agitació el creixement pot ser en totes les direccions, i les formes filamentoses formen colònies esfèriques.

El ritme de creixement de la colònia fúngica i el diàmetre aconseguït per aquesta durant un període de temps fixat en un medi específic difereix entre espècies i grups, existint moltes possibilitats diferents. Els fongs tenen gran capacitat per adaptar-se a qualsevol medi, i el seu creixement es troba fortament influenciat per les condicions ambientals. Les formes de la hifa són variables entre fongs d'un mateix grup, especialment pel que fa al diàmetre, al model de ramificació, al tipus i a la freqüència de septació i, com a conseqüència d'això, a la longitud dels compartiments que la constitueixen.

Tots els mecanismes involucrats en la formació de les ramificacions, en la seva iniciació i en la seva freqüència, així com en la manera d'integrar-se tot el conjunt, encara no estan completament esbrinats i entesos. S'han formulat diverses hipòtesis i manquen encara constatacions de tipus experimental.

4.2.5.1. Extensió de la hifa

Amb la germinació de l'espóra i l'aparició del tub germinatiu, una hifa jove, s'inicia el procés d'expansió del fong filamentos. Les hifes del fong filamentos romanen immòbils, i el seu creixement es caracteritza per la prolongació d'aquestes hifes per les puntes.

L'extensió de la hifa, la prolongació de l'àpex, és un procés de tres fases:

1) Producció de vesícules en la zona subapical.

La generació de vesícules succeeix en una gran part de la colònia, però només les produïdes en la zona de creixement perifèria (la zona compresa entre la punta i el primer septe tancat de la hifa) contribueixen al creixement apical de la hifa. Les vesícules generades en la regió subapical es poden desplaçar cap a l'àpex mentre no trobin un septe tancat que talli el seu flux. No hi ha unanimitat en l'explicació

de com es generen aquestes vesícules dins del reticle endoplasmàtic i quin és el seu contingut amb exactitud (Ibáñez i Vaquero, 1995). Es creu que les funcions de les vesícules en el creixement apical són tres:

- a) Transportar enzims que trenquin les unions entre els components ja existents de la paret i enzims que intervinguin en la síntesi d'aquesta.
- b) Transportar nous materials per a la paret.
- c) Incrementar l'àrea superficial.

2) Transport de vesícules cap a la zona apical.

Les vesícules generades en la regió subapical són transportades fins la zona apical mitjançant un mecanisme encara desconegut. No es tenen encara evidències experimentals que el justifiquin, però s'han postulat diverses hipòtesis per explicar la causa d'aquest flux vesicular:

- a) L'existència d'un gradient electrogènic al llarg de la hifa, la diferència de potencial (relacionat amb les bombes de protons de la membrana) entre l'apex i les zones posteriors, al llarg de la hifa, podria fer que les vesícules es desplaressin per electroforesis.
- b) L'existència d'un gradient electroosmòtic al llarg de la hifa (relacionat amb les bombes de ions), de forma que el flux iònic aniria acompanyat d'un flux d'aigua que desplaçaria a les vesícules.
- c) Un sistema contràctil que ajudi al desplaçament de les vesícules.

En el seu desplaçament cap a l'apex, les vesícules van trobant septes que fan disminuir el seu flux, deixant passar a través d'aquests només una petita proporció de les mateixes.

3) Fusió de les vesícules a la membrana plasmàtica de l'apex.

El creixement de la punta de la hifa es pot interpretar com el resultat d'un balanç entre la lisi i la síntesi dels polímers de la paret en

conjunció amb la pressió de turgència. Els enzims lítics alliberats per les vesícules a l'arribar a l'àpex debiliten els components fibrilars de l'estructura de la paret cel·lular. L'alta pressió de turgència interior produeix aleshores una expansió de la regió de la paret. Com a conseqüència d'això els precursors dels polímers de la paret i els enzims sintètics, que són alliberats en la membrana plasmàtica de la mateixa forma, actuen sobre la paret per reorganitzar i donar rigidesa a la zona expandida.

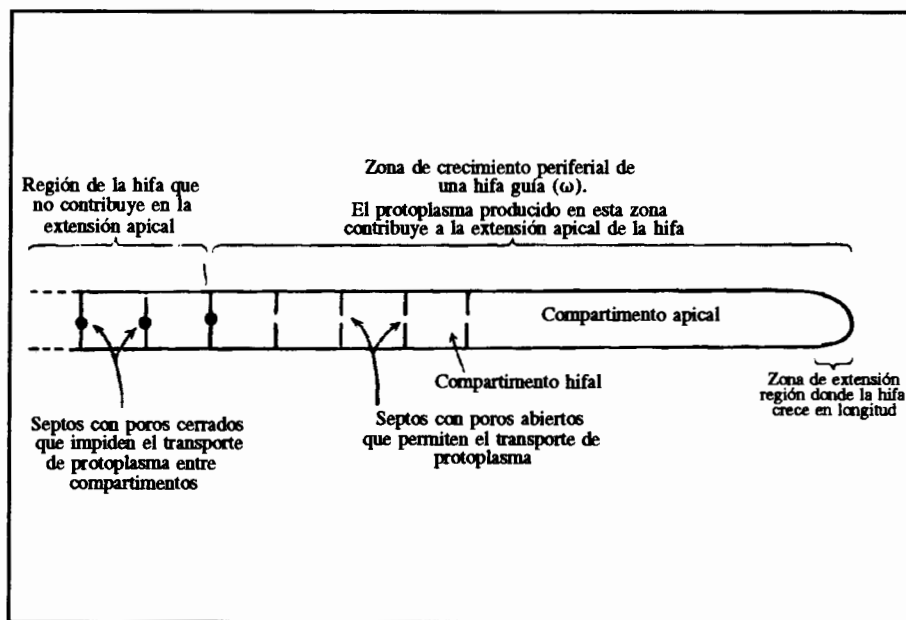


FIGURA 4.5. Diagrama esquemàtic de l'extensió de la zona de creixement periferal d'una hifa septada. Font: Trinci (1971) dins de Ibáñez i Vaquero, 1995.

4.2.5.2. Septació de la hifa

En les hifes velles i més desenvolupades, els septes es troben en les zones subapicals, dividint-les en compartiments, i possiblement incrementant la seva força de constitució. No obstant, les parts més noves o joves de la colònia d'un fong filamentós, periòdicament sofreixen el que s'anomena un cicle de septació. Després d'un determinat temps en que el compartiment apical ha estat creixent, en assolir una determinada longitud, hi apareixen un nombre determinat de septes amb una distribució específica. El septe més proper a la punta de la hifa, el darrer en formar-se, divideix el compartiment aproximadament per la meitat, i el resta dels septes es distribueixen de forma més o menys aleatòria en la meitat més allunyada de l'àpex, com il·lustra la figura 4.6.. Aquest procés succeeix de forma periòdica i continuada.

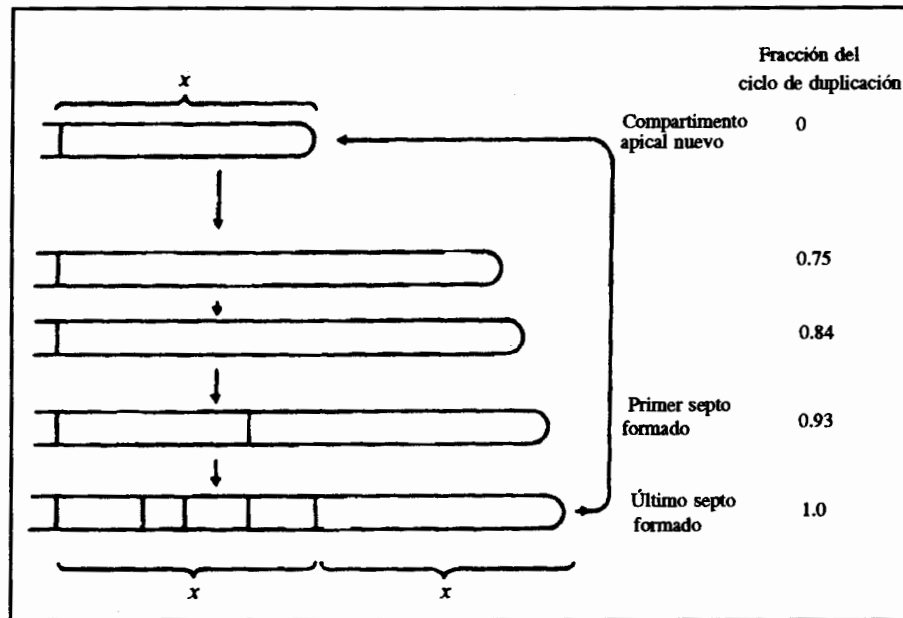


FIGURA 4.6. Diagrama que representa el cicle de septació de *Aspergillus nidulans* creixent a 25°C. Font: Burnet (1979) dins de Ibáñez i Vaquero, 1995.

En alguns fongs, només les parts més velles o les zones deteriorades de les hifes estan aïllades per la formació de septes. En altres, els superiors, aquests septes es troben més regularment. Els septes creixen cap a dins des de la paret cel·lular i, en principi, no estan tancats, ja que en la regió central presenten un porus, que permet la continuïtat entre els diferents compartiments adjacents. Existeixen uns orgànuls anomenats cossos de Woronin, associats amb els porus del septe, que són petits, densos, i de forma esfèrica. Es creu que la seva funció és la regularització del flux citoplasmàtic entre els compartiments de la hifa. En les hifes sanes aquest orgànul no obstaculitzen el pas a través del porus, mentre que en les àrees velles o deteriorades, aquests cossos de Woronin actuen com a segells, tanquen els compartiments i tallen la seva comunicació. Per segellar el porus del septe, un cos d'aquests s'ha de moure de la seva posició normal, mitjançant un mecanisme encara no conegut.

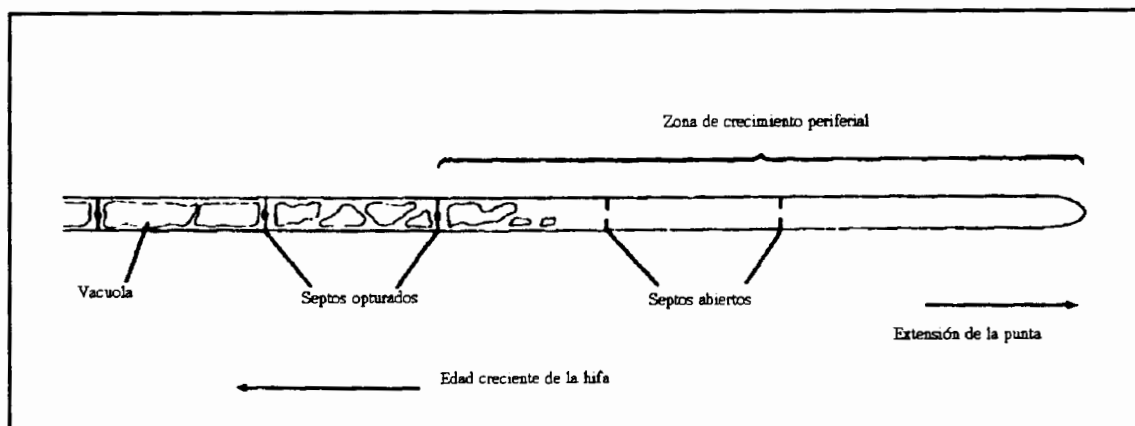


FIGURA 4.7. Representació esquemàtica de la zona de creixement periferal i l'augment de la vacuolació en les hifes velles. Font: Isaac (1992) dins de Ibáñez i Vaquero, 1995.

Els compartiments hifals contribueixen a l'extensió apical fins que es tanca el setpe. Després de l'obstrucció els materials no poden passar a la zona apical.

4.2.5.3. Ramificació de la hifa

La formació d'una rama o nova punta requereix la generació d'un nou àpex a partir de la paret hifal madura que existeix, i per tant, està relacionada amb l'acumulació de vesícules. En els fongs que presenten septes, les rames s'originen normalment per darrera d'aquests. Una hipòtesi, encara no comprovada, és que les vesícules que s'acumulen darrera d'un setpe, podrien arribar a debilitar la paret i, com a resultat de la pressió de turgència dins de la hifa, sorgiria la ramificació.

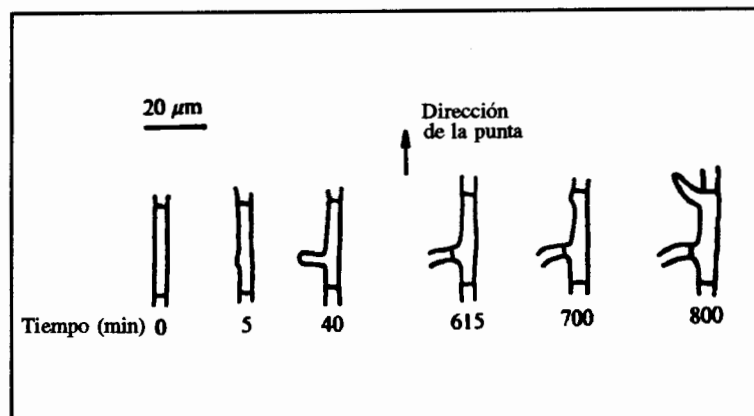


FIGURA 4.8. Formació de la primera i segona ramificació produïdes en un compartiment intercalar de *Aspergillus nidulans* creixent a 25°C en extracte de malta agar. Font: Trinci (1971) dins de Ibáñez i Vaquero, 1995.

La ramificació normalment està relacionada amb la presència de septes, encara que pot aparèixer una rama en algun lloc on no existeix cap setpe. També s'ha comprovat experimentalment que dins d'un mateix compartiment hifal, generalment, només apareix una segona ramificació quan en la base de la primera s'ha format un setpe (figura 4.8.).

Durant el creixement inicial de la hifa les ramificacions es produeixen a 90° de la hifa materna i es dirigeixen de forma radial. A mesura que passa el temps l'angle es va reduint, i progressivament el creixement de les rames és produeix de forma menys dirigida.

En el procés de ramificació de la hifa podem assenyalar altres punts:

- a) S'observa dominància apical, la majoria de les hifes només es ramifiquen a una certa distància dels seus àpexs, aquestes rames creixen i es ramifiquen

a la vegada, a mesura que s'allunyen de l'àpex principal.

b) Si una hifa es sotmet a un canvi de potencial osmòtic de l'entorn, els models i la freqüència de ramificació s'alteren. Això indica que el potencial per a la síntesi de noves parets existeix al llarg de tota la hifa.

c) Les rames de les hifes tendeixen a divergir unes de les altres, omplint els espais que existeixen entre elles. Així, es podria suposar que responen de forma positiva a gradients de nutrient, deixant les zones pobres i exhaurides, o bé que responen negativament als subproductes metabòlics excretats per altres hifes. Els canvis en l'angle de ramificació (inicialment en angle recte) pot ser el resultat d'una resposta quimiotròfica a l'acumulació d'aquests subproductes, o bé a la reduïda concentració d'oxigen que existeix a prop d'una hifa desenvolupant-se. Sembla ser que la presència d'oxigen determina la direcció de la ramificació. També es pot pensar en l'existència a la superfície de la hifa de receptors sensibles a les concentracions de productes del medi.

d) Sembla ser que no hi ha, en principi, punts de ramificació predeterminats. D'alguna forma encara desconeguda, és possible que els fongs tinguin mecanismes per poder escollir les posicions per al creixement de rames, les zones de la paret on s'acumulen les vesícules.

e) El nombre de rames formades per una colònia està directament relacionat amb la concentració de nutrient del medi. En medis pobres les colònies ramifiquen de forma molt escassa, mentre que en medis rics ho fan densament.

f) Sembla ser que els àpexs hifals de les vores de la colònia tenen prioritat per utilitzar els nutrients i el que queda després de cobrir aquestes necessitats està disponible per sostenir el procés de ramificació. S'ha observat que una colònia de fongs assoleix, dins dels seus límits i de forma aproximada, el mateix diàmetre en un temps fix, tant en un medi ric com en un medi pobre en nutrients (a partir d'un valor mínim que permeti el creixement).

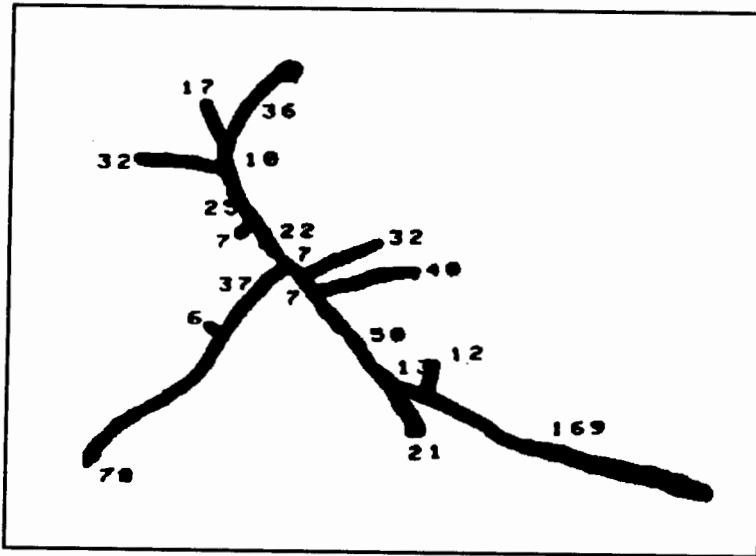


FIGURA 4.9. Imatge del miceli de *Aspergillus niger* (soca CH₄) creixent en una solució del 1% en glucosa amb sals minerals. Els números corresponen a micròmetres. Font: Viniestra-Gonzalez i al. (1993) dins de Ibáñez i Vaquero, 1995.

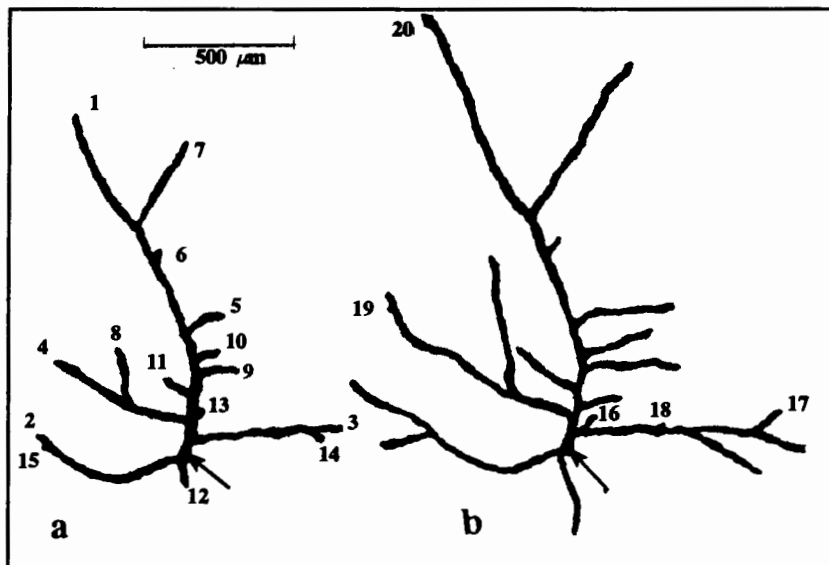


FIGURA 4.10. Creixement d'un miceli de *Mucor hiemalis*. (a) Aparença del miceli en el temps zero. (b) Aparença del miceli després d'una hora creixent a 25°C. Les rames estan numerades en l'ordre en el que s'han produït. La fletxa indica la posició de l'esporeja. Font: Trinci, 1973.

Número de rama	Longitud original de la rama (μm)	Longitud final de la rama (μm)	Increment de longitud en el període d'observació (μm)
1	1230	1544	314
2	458	787	329
3	501	787	286
4	472	736	264
5	129	329	200
6	36	57	21
7	286	615	329
8	207	458	251
9	122	300	178
10	72	229	157
11	93	243	150
12	86	272	186
13	21	136	115
14	43	243	200
15	7	157	150
16	-	64	64
17	-	143	143
18	-	14	14
19	-	14	14
20	-	21	21

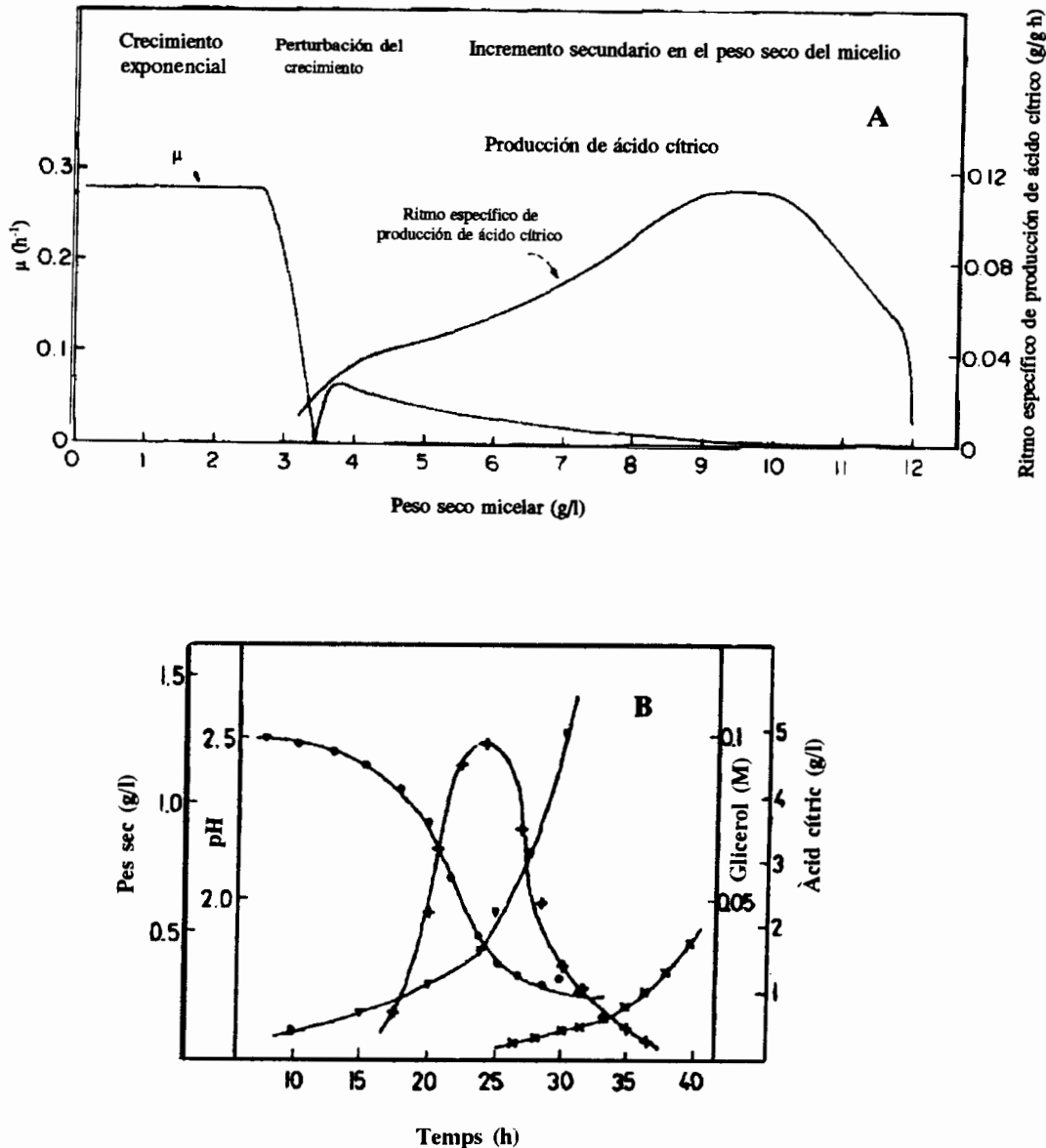
TAULA 4.1. Augment en longitud d'un miceli de *Mucor hiemalis* durant un període d'una hora a 25°C. Les branques de la 16 a la 20 es varen formar durant aquest període d'observació. Font: Trinci, 1973.

4.2.6. PRODUCCIÓ D'ÀCID CÍTRIC

Han aparegut diverses teories aquests darrers anys per intentar explicar el mecanisme de formació de l'àcid cítric, i encara avui, malgrat que s'ha avançat gràcies a les comprovacions experimentals i les anàlisis exhaustives, resten alguns punts foscos.

L'inici de la producció d'àcid cítric és conseqüència d'un canvi metabòlic important en el *Aspergillus niger*. Al final de la fase de creixement exponencial es presenta un període de pertorbació del creixement (causat probablement per l'esgotament de certes substàncies del medi) en el que es desencadena la producció d'àcid. La producció d'àcid cítric s'esdevé, majoritàriament, en compartiments hifals que no estan en estat de proliferació.

Un temps de maduració separa aquestes dues fases d'aquest procés, caracteritzades cadascuna d'elles per un nivell màxim. Una primera fase de creixement exponencial de la colònia amb mínima producció d'àcid, i una segona fase amb un nivell de creixement baix, en el que la producció d'àcid cítric assoleix el seu valor màxim. L'augment de la concentració de l'àcid cítric inhibeix l'assimilació de glucosa, però no el seu metabolisme.



Com es pot observar en la gràfica de la figura 4.11.B., l'assoliment del valor màxim de glicerol coincideix amb l'inici de la detecció d'àcid cítric intracel·lular, amb una pronunciada disminució de l'extrusió (no molt ben coneguda) de protons al medi i amb l'augment del creixement.

Hi ha nombrosos estudis que involucren el glicerol en la producció d'àcid cítric. En els estadis inicials de creixement, la principal via metabòlica és la de les Pentoses Fosfato, donant lloc a l'acumulació de glicerol. Per a una determinada concentració d'aquesta substància s'estimula la via glicolítica, a la vegada que s'inhibeix en el punt d'acumulació d'àcid cítric. A partir d'aquesta acumulació, aquest és capaç de formarse mitjançant la seva pròpia via (via glicolítica) i per la metabolització del glicerol.

Són diversos els factors que influeixen en la producció d'àcid cítric: el tipus i quantitat de fonts de carboni, el pH del medi, la temperatura, la presència o addició de metalls en el medi, així com d'altres components. També la ventilació i l'agitació del cultiu és força important si es submergit.

4.2.7. REPRODUCCIÓ

Els fongs poden presentar dues formes de reproducció: la sexual i l'asexual.

El mètode més comú és la formació d'espores, cadascuna de les quals germina, produint un tub germinal, una hifa jove que creix fins a formar el miceli. L'exhauriment dels nutrients, els canvis ambientals o altres condicions poden ocasionar l'aturada de l'extensió de la hifa sobre el substrat, i donar com a resultat l'esperulació.

Els fongs requereixen un cert període de creixement vegetatiu abans de que es produeixi la formació d'estructures reproductives i l'aparició d'espores. Els materials produïts en el miceli són utilitzats per a la formació d'aquestes estructures, i es detecta una disminució de pes sec del miceli quan té lloc l'esperulació. És obvi que alguns factors que afecten al creixement vegetatiu influiran indirectament en la reproducció. Els requeriments per a l'esperulació són, normalment, precisos i restringits. S'ha observat, per exemple, la inhibició de la reproducció a altes concentracions de nutrients. També s'han constatat requeriments o condicionants físics per a la reproducció més restrictius que per al creixement vegetatiu, en relació a la temperatura, la llum, les ferides o danys i les barreres mecàniques.

4.2.8. ENVELLIMENT I AUTOLISIS

L'envelliment en els fongs és conseqüència del temps i de les condicions

mediambientals. La posició d'un determinat compartiment en la colònia i la quantitat de nutrients en el seu entorn determinen l'edat fisiològica d'aquesta zona. L'envelliment està lligat a l'esgotament d'aquells components que proporcionen energia per als processos de síntesi i a l'acumulació localitzada de metabolits tòxics.

Els àpexs són les parts recent formades de la hifa i les més actives. En estudiar longitudinalment la hifa, trobem després d'aquesta zona apical la subapical, i darrera d'aquesta una zona anomenada de vacuolización, on la grandària de les vacuoles augmenta amb la distància a l'àpex i amb l'edat del compartiment. Es poden destacar notables diferències morfològiques i bioquímiques lligades a aquesta divisió, així com al tipus de processos que es duen a terme en aquestes zones.

Les hifes extremadament velles poden persistir en un estat de baixa activitat metabòlica durant un període de temps considerable. Eventualment un desequilibri en els sistemes metabòlics d'aquestes hifes velles causat per factors interns o externs poden produir una autolisi o auto-digestió. Els diversos materials degradats poden ser reciclats i utilitzats pel manteniment i la supervivència. També, en alterar-se l'estructura química de la paret i degradar-se, materials d'aquestes hifes són alliberats al medi i utilitzats per altres compartiments de hifes properes. La autolisi, que ocasiona una reducció de biomassa, no esdevé de forma sincronitzada en la colònia, sinó que pot donar-se en compartiments aïllats.

4.3. MODELITZACIÓ I SIMULACIÓ

Una referència útil per l'elaboració d'una part del nostre model de simulació discreta ha estat un model discret del creixement i de la ramificació hifal (Prosser i Trinca, 1979), amb el que és possible tenir els canvis en la longitud hifal, en el nombre i la posició dels septes, i les ramificacions, a partir del control d'un tipus d'element: les vesícules.

L'objectiu és elaborar un model que permeti conjugar el creixement i el comportament del fong filamentos en medi sòlid amb la producció d'àcid cítric, així com reproduir l'evolució espacio-temporal de la colònia creixent en una superfície. El que ens proposem modelar i simular és un sistema que es desenvoluparà sobre una superfície finita (a la realitat succeeix això). Considerarem per tant per a la nostra simulació un domini bidimensional fitat (sense considerar en aquest cas condicions periòdiques de contorn) sobre el que evolucionarà la colònia simulada. Per a l'elaboració del model s'utilitzarà alguns dels coneixements i premisses recollides en la recerca bibliogràfica, alhora que serà necessari també la formulació d'algunes hipòtesis en aquells aspectes en que no s'observa unicitat o constatació experimental. Com a primera i principal referència considerarem el comportament del fong filamentos

Aspergillus niger, encara que també ha estat necessari recórrer a altres espècies per a determinades qüestions.

4.3.1. DESCRIPCIÓ DEL SISTEMA

El sistema que simularem es desenvolupa en un domini bidimensional reticulat de 300x300 cel·les o caselles. El concepte d'individus o elements discrets que en les simulacions anteriors hem utilitzat i identificat com organismes unicel·lulars, no és equivalent a la utilització que farem de la unitat discreta que controlarem i modelarem en aquest sistema. No tindrem un conjunt d'individus, sinó únicament un sol individu, un fong filamentos. Aquest estarà format per un conjunt de cel·les ocupades per biomassa i disposades en una superfície. Un conjunt d'aquestes cel·les plenes, des d'un septe fins l'altre septe, serà un compartiment, i aquests compartiments configuraran la hifa, formant part del miceli. Aquestes cel·les ocupades pel microorganisme són les unitats que caracteritzarem. L'evolució de totes aquestes parts avaluades de forma global donaran el comportament del fong filamentos.

El sistema inicial serà una spora ja germinada. Amb l'aparició de la hifa jove s'inicia la simulació. El model que dissenyem fa referència al desenvolupament en superfície de l'organisme a partir d'aquest estat, i no contemplarem en aquest el procés de reproducció.

Suposarem un domini fitat, sense condicions periòdiques de contorn, de forma que l'evolució del fong simulat finalitzarà en prendre contacte alguna hifa amb les parets del quadrat. En el medi es disposaran les partícules de diferents substàncies sotmeses a les lleis de la difusió, de forma que els canvis de concentració o densitat de partícules de les cel·les respondran a aquest mecanisme.

El control de cadascuna de les unitats discretes s'efectuarà en un pas de temps. Les variables que caracteritzen aquests elements del sistema (cada una de les cel·les ocupades) són:

- Edat biològica.
- Localització física en el domini bidimensional.
- Tipus de cel·la, apical o no apical, en funció de si ocupa o no una posició extrema respecte a la hifa.
- Nombre total de vesícules que ha produït des del seu inici fins aquest instant.
- Nombre de vesícules que conté en cada pas de temps.

- Existència o no de septes en les parets contigües i comunes de les seves cel·les adjacents.
- En el cas d'haver-hi septes, l'estat de cadascun d'aquests i si romanen oberts o s'han tancat.
- Partícules de nutrient consumides.
- Tipus de metabolisme que realitza: primari o secundari.
- Quantitat de partícules de glicerol acumulades.
- Quantitat de partícules d'àcid cítric presents.
- Compartiment al qual pertany.

4.3.2. MODEL DE COMPORAMENT INDIVIDUAL

4.3.2.1. Captació de nutrient

El consum de nutrients és fonamental per al creixement i el desenvolupament del miceli.

Es consideren en el model dos possibles tipus de partícules que la cel·la ocupada pot assimilar:

- 1) Partícules del nutrient principal que es troba en el medi.
- 2) Partícules d'una segona font d'energia corresponents a reserves internes acumulades en la pròpia cel·la.

La captació o consum d'aquests dos tipus de partícules té lloc en dues etapes diferenciades de l'evolució.

En el model hem considerat que una partícula de nutrient és equivalent a una de glucosa, i que les partícules del segon tipus de nutrient, presents en l'interior de la cel·la, són d'un subproducte residual o final del metabolisme primari i corresponen a partícules de glicerol.

Per a les cel·les del sistema s'ha fixat un valor màxim de partícules de nutrient a

consumir $N_{MÀX}$. Aquesta quantitat màxima pot ser assolida en funció de la concentració de nutrient present en la cel·la pròpia i en les del seu entorn (per al primer tipus), o de la quantitat de partícules de glicerol acumulades en el interior de la cel·la (per al segon tipus).

En cada pas de temps es fa una assignació del consum individual màxim, del nombre de partícules que es pot arribar a aconseguir, mitjançant una variable aleatòria normal d'esperança $N_{MÀX}$ i desviació estàndard σ_1 . El consum màxim assignat pel primer nutrient correspon al fet que aquest organisme presenta un consum condicionat per la capacitat d'absorció dels mecanismes de captació de nutrients situats a la membrana cel·lular, d'acord amb la cinètica de Blackman. Pel que fa al segon tipus de partícula hem optat per fer una assignació aleatòria de tipus normal.

La consideració de la partícula de nutrient principal com una glucosa s'escau amb que, tot i que experimentalment s'ha demostrat que és la sacarosa la que ofereix majors rendiments en la producció de subproductes (per exemple de l'àcid cítric), és en forma de glucosa que el fong l'assimila.

4.3.2.2. Utilització del nutrient

Quan els nutrients han estat captats s'han de transformar en l'energia utilitzada en els diversos processos metabòlics que esdevenen en l'organisme. La utilització del nutrient per part de la cel·la variarà en funció del tipus de metabolisme en que aquesta es trobi:

a) Una cel·la amb metabolisme primari té:

1. Energia de manteniment.
2. Producció de vesícules. Es requereixen dues partícules de nutrient per produir una vesícula.
3. Producció de partícules de glicerol. Cal una partícula de nutrient per obtenir-ne dues de glicerol.
4. Energia dissipada.

b) Una cel·la amb metabolisme secundari té:

1. Energia de manteniment.

2. Producció d'àcid cítric. Una partícula de nutrient en produeix una d'àcid cítric, i dues partícules de glicerol en produeixen una d'àcid cítric.

3. Energia dissipada.

En aquest model el metabolisme dels fongs filamentosos ha estat simplificat, considerant que l'energia utilitzada per al creixement només reverteix en la producció de vesícules. Per a aquesta primera aproximació ens hem basat en les constatacions experimentals que demostren que les vesícules són un factor clau per al creixement de les hifes (fet recollit per algun altre model anterior al nostre, Ibáñez i Vaquero, 1995).

En la primera etapa d'aquest estudi també hem simplificat el mecanisme de producció dels subproductes metabòlics (secundaris) suposant que aquests, i en el cas que ens ocupa l'àcid cítric, només es produeixen en cel·les que es troben en el metabolisme secundari. Això es fonamenta en el fet experimental observat de que són les zones més antigues i velles de la colònia on es detecta la presència d'aquest àcid.

4.3.2.3. Flux de vesícules

Un paràmetre fonamental per modelar el creixement és el transport de les vesícules, considerant que aquest es produeix de les cel·les més antigues o velles cap a les cel·les noves.

En no existir unanimitat entre les teories que expliquen el fenomen del transport d'aquestes vesícules a través del citoplasma cap a l'àpex, hem considerat en el model que aquest transport es produeix per intervenció conjunta de dos fenòmens: la difusió i el camp elèctric. També s'ha considerat l'alteració d'aquest flux deguda a la presència de septes i en funció del seu estat. Essent V_i el nombre de vesícules d'una cel·la considerem un transport degut a la difusió i per tant proporcional als gradients de V_i , i un transport degut a l'hipotètica existència d'un camp elèctric i per tant proporcional a V_i .

En aquest transport, d'una cel·la a una altre cel·la i sempre des d'una més vella a una altre no tan vella, es suposen tres possibilitats diferents:

a) Cel·la sense septe

El nombre de vesícules que passa de la cel·la i a la cel·la j , en un pas de temps t (o pas de programa), T_{ij} , es determina per l'expressió

$$T_{ij} = k_1 D(t) + k_2 V_i(t)$$

on k_1 i k_2 són constants, $D(t)$ és la diferència de vesícules existents entre la cel·la i i la contigua, $D(t) = V_i(t) - V_j(t)$, i $V_i(t)$ és el nombre de vesícules de la cel·la i . Així s'obté

$$V_i(t+1) = V_i(t) - T_{ij} \quad \text{i} \quad V_j(t+1) = V_j(t) + T_{ij}.$$

b) Cel·la amb septe obert

El nombre de vesícules que passarà de la cel·la i a la cel·la j serà un percentatge reduït q del valor calculat en el cas anterior, així

$$V_i(t+1) = V_i(t) - q T_{ij} \quad \text{i} \quad V_j(t+1) = V_j(t) + q T_{ij}.$$

c) Cel·la amb septe tancat

El nombre de vesícules que passaran serà nul, $T_{ij} = 0$.

4.3.2.4. Extensió de la hifa

L'extensió o elongació de la hifa es produeix gràcies a l'acumulació de les vesícules en la seva punta. En el model considerem que aquest creixement o elongació de la hifa té lloc només en les cel·les apicals. Considerem aquesta extensió com l'ocupació de noves cel·les del domini per part de l'individu.

El creixement es produeix en el moment que el nombre de vesícules emmagatzemades en una cel·la apical assoleix un valor llindar h , obtingut d'una variable aleatòria normal H , $N(N_v, \sigma_2)$ (N_v és el nombre esperat de vesícules per a l'extensió). El nombre de cel·les que passarà a ocupar en un pas de temps és funció de la quantitat de vesícules que la cel·la apical té. Hem establert una relació lineal entre el nombre de cel·les que ocuparà i el nombre de vesícules disponibles per aquesta elongació, un major nombre de vesícules acumulades implicarà un creixement longitudinal més llarg per a la hifa. Totes les vesícules d'aquesta cel·la són utilitzades en aquest procés i desapareixen.

La direcció de l'elongació l'hem suposat aleatòria. En cada pas de temps es determinarà la direcció escollida pel creixement d'acord amb unes probabilitats assignades a les diferents possibilitats. El valor p_1 que dona la probabilitat de créixer en la direcció que ja porta, mantenint-la, és considerablement major que l'assignat a la probabilitat per a un canvi de direcció. En aquest primer model només hem considerat com direccions alternatives a la seva direcció la perpendicular a la que porta la hifa, en un sentit o altre. Aquestes probabilitats són iguals i de valor $p_2 = (1-p_1) / 2$.

La part de model corresponent al paper que tenen les vesícules en el creixement que hem dissenyat s'ajusta a les referències bibliogràfiques exposades i a les constatacions experimentals, interpretant-se aquests esdeveniments com realment un "consum" de vesícules. En relació a les direccions de creixement, la primera aproximació ha estat una tria aleatòria fortament esbiaixada cap a la direcció que ja porta.

4.3.2.5. Septació de la hifa

La septació de la hifa és un factor molt important, ja que la presència de septes entre cel·les contigües limita el flux de vesícules afectant el seu desenvolupament.

En el model considerem que quan un compartiment apical, un conjunt de cel·les amb una cel·la apical, té una determinada longitud (ocupa un nombre determinat de cel·les del domini) es produeix un cicle de septació. El valor corresponent a la longitud d'un compartiment apical, i que provoca un cicle de septació en aquest compartiment apical, és una variable aleatòria amb distribució normal d'esperança N_C i desviació estàndard σ_3 .

Durant el cicle de septació aquest compartiment apical queda dividit per tres septes que caracteritzen quatre compartiments segons la següent regla:

- a) El primer dels septes divideix el compartiment aproximadament per la meitat, de forma que la meitat més propera a la punta passa a ser un nou compartiment apical.
- b) La resta dels septes (dos) es distribueixen uniformement en la segona meitat més llunyana de l'àpex.

Tots els septes que apareixen en aquest cicle són septes oberts. Un septe té moltes possibilitats de tancar-se quan alguna de les dues cel·les que estan en contacte amb ell ha assolit una producció determinada de vesícules, comptabilitzades durant tota la seva existència. Aquest valor llindar per al tancament es considera una variable aleatòria de distribució normal amb esperança T_V i desviació estàndard σ_4 .

Per poder considerar factors no controlats o bé desconeguts en aquest procés hem assignat, a més a més, una probabilitat de tancament del septe p_3 . A partir del moment que una cel·la amb septe obert hagi assolit una determinada producció de vesícules té una probabilitat p_3 de tancar el seu septe.

En aquest model de septació de la hifa s'han recollit els conceptes aportats per la bibliografia sobre el que s'ha observat experimentalment. Pel que fa al procés de tancament

d'un septe, tot i que s'ha identificat una relació amb l'envelliment i altres factors que alterin la morfologia de la hifa, no és un fenomen molt conegut. En el nostre model l'hem relacionat amb l'envelliment de la cel·la i amb una determinada activitat metabòlica (també considerada en el model de canvi de metabolisme).

4.3.2.6. Ramificació de la hifa

La formació de noves rames o puntes hifals possibilita l'extensió de l'individu cap a noves zones i condiona al mateix temps el creixement global.

En el model hem considerat que una ramificació es produeix quan el nombre de vesícules acumulades en una de les parets d'una cel·la no apical es troba per sobre del llindar que assigna la variable aleatòria H amb una distribució normal $N(N_v, \sigma_2)$. Utilitzem la mateixa distribució de probabilitats per aquest esdeveniment que per al que produeix l'extensió o prolongació de la hifa, ja que la ramificació i l'elongació d'hifes estan relacionades amb el creixement de l'individu. De fet, considerem la hipòtesi en el nostre model de que són el reflex d'un mateix fenomen.

Com una primera aproximació del model hem considerat la ramificació en la direcció perpendicular a la que porta la hifa. De forma aleatòria es tria un dels dos sentits si cap d'aquests està cobert, mentre que en cas contrari s'utilitzarà el que es trobi lliure.

En la base de la ramificació és considera la formació d'un septe obert.

El model presentat es basa en les constatacions experimentals que suggereixen que el mecanisme que regula la ramificació és molt similar al que es produeix en la prolongació dels compartiments apicals.

4.3.2.7. Producció de glicerol

Per simular la producció de productes o metabolits secundaris, per exemple l'àcid cítric, és necessari disposar d'algun control que iniciï el seu procés. Una possibilitat per a aquest control és l'existència d'un "rellotge biològic" que ens indiqui el pas del metabolisme primari al secundari. Amb aquesta finalitat s'ha utilitzat en el model la quantitat de glicerol que una cel·la produeix. Per a cada una de les cel·les al llarg del temps es controla i s'emmagatzema en el seu interior aquesta producció. Es considera que una cel·la passa del metabolisme primari al secundari quan aquesta quantitat assoleix un cert valor llindar, valor donat per una variable aleatòria de distribució normal. En aquesta primera aproximació del model s'ha considerat per aquesta variable la mateixa distribució que la que produeix el

tancament d'un septe $N (T_V, \sigma_4)$.

Degut a l'existència dels dos tipus de metabolisme (primari i secundari) i a la complexitat dels fenòmens involucrats en aquests processos, en aquest primer model s'ha optat per simplificar la seva descripció. En el primer metabolisme només s'ha suposat la producció de partícules de glicerol i de vesícules, i en el segon metabolisme s'ha contemplat només l'aparició d'àcid cítric. Experimentalment s'ha comprovat que s'inicia la producció d'aquest àcid en assolir-se una certa concentració de glicerol.

4.3.2.8. Producció d'àcid cítric

L'àcid cítric és el principal i el més important dels metabolits secundaris que produeix el fong filamentos *Aspergillus niger*.

El model només considera l'aparició d'aquest àcid, com ja hem indicat, durant el metabolisme secundari. En canviar o passar la cel·la del metabolisme primari al secundari s'iniciarà en aquesta cel·la la producció d'àcid cítric, el qual serà excretat al medi. Aquest procés es porta a terme mitjançant la metabolització de partícules de nutrient captades del medi (cada una d'aquestes en proporciona una d'àcid cítric) i de partícules de glicerol que es troben en la pròpia cel·la (dues d'aquestes en proporcionen una d'àcid). Les relacions utilitzades per aquest procés es basen en les regles estequimètriques.

4.4. UN NOU SIMULADOR

En el següent esquema (figura 4.12.: Diagrama de flux del programa de simulació discreta del comportament del fong filamentos) es presenten les diferents parts del simulador on s'ha implementat el model elaborat:

- A) Entrada de dades per caracteritzar el sistema.
- B) Descripció del sistema.
- C) Matriu d'interaccions.
- D) Configuració inicial del sistema.
- E) Pas de programa.

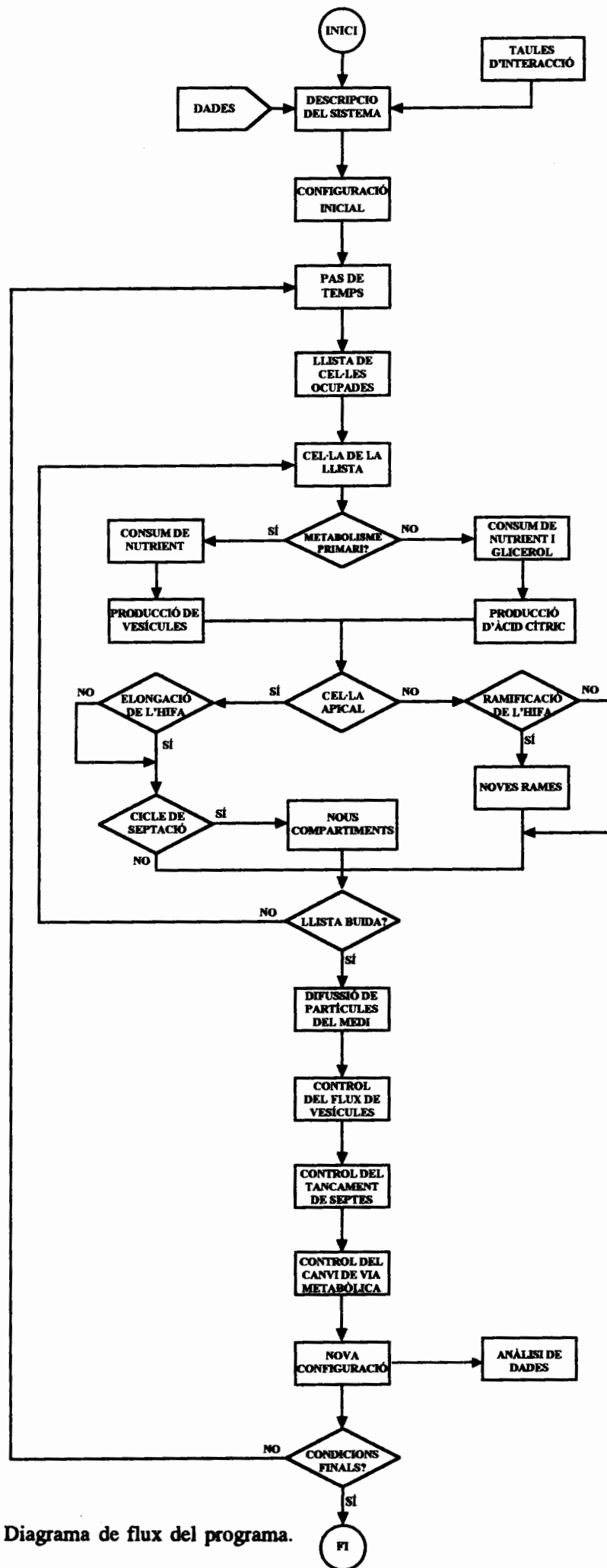


FIGURA 4.12. Diagrama de flux del programa.

E) Pas de programa: Realització de diferents accions–controls sobre el sistema:

E1) Creació d'una llista aleatòria de les cel·les del domini ocupades pel microorganisme.

E2) De forma seqüencial es procedeix a controlar cadascuna de les cel·les de la llista elaborada. En esgotar-se aquesta, el programa prepara un nou pas de temps.

Per a cada element del sistema (cel·la ocupada = part discreta de biomassa):

E2.1) Caracterització de l'element

- tipus de metabolisme en el que es troba (primari o secundari)
- posició del rellotge biològic (nombre de partícules de glicerol acumulades = nombre total de vesícules produïdes)
- número del compartiment al que pertany
- posició (x,y) que ocupa en el domini
- quantitat de vesícules que conté
- tipus de compartiment del que forma part, apical o no

E2.2) En funció del tipus de metabolisme, consum de partícules:

- de nutrient del medi
- de glicerol de la pròpia cel·la

E2.3) Utilització de les partícules captades:

E2.3.1) Metabolització segons la via en la que es troba:

- manteniment
- producció de vesícules
- producció de glicerol
- producció d'àcid cítric

E2.3.2) Control per a una possible ocupació de noves posicions:

- en una cel·la apical: elongació de la rama hifal
- en una cel·la no apical: creació d'una nova rama

E2.3.3) En un compartiment apical control per al procés de septació d'aquest

E3) Actualització de variables del sistema

E3.1) Control de la difusió de partícules presents en el medi.

E3.2) Control sobre la colònia.

Per a cada un dels seus elements avaluació i control:

E3.2.1) del canvi de metabolisme

E3.2.2) de l'existència de septes i del seu estat en les seves cel·les veïnes

E3.2.3) del flux de vesícules implicat entre aquestes cel·les ocupades

E3.2.4) de la probabilitat de tancament de septes oberts (en cas d'existir-ne)

E4) Sortida de dades.

F) Control de finalització.

4.5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els resultats que presentem a continuació són de simulacions realitzades sobre un domini bidimensional quadrat reticulat amb 90000 cel·les. Amb aquestes dimensions del quadrat utilitzades, i per tant, amb la possibilitat d'ocupació per part del fong filamentos simulat d'una part important d'aquestes caselles, l'evolució conjunta que s'observa de tots aquests elements discrets del sistema és qualitativament correcta com es constatarà en comparar-la amb resultats experimentals.

Es considera un sistema tancat amb una quantitat inicial de partícules de nutrient distribuïdes uniformement en un medi sòlid, sense cap entrada exterior de substrat ni agitació d'aquest, i on la disposició espacial de les partícules de nutrient s'alterarà només com a conseqüència de l'efecte de la difusió.

S'han realitzat diverses evolucions per a varies concentracions inicials de nutrient. També hem estudiat les evolucions del fong filamentos en diferents medis nutritius, el comportament del qual es veurà condicionat de forma important per l'entorn. D'entre els paràmetres que es poden controlar amb la simulació i que s'han tingut en compte en el nostre model, se'n han escollit alguns amb la finalitat d'observar l'evolució i comparar-la amb les dades experimentals de que disposem.

Les diferents densitats de substrat utilitzades en les simulacions següents i expressades en unitats arbitràries són c_i de forma que $c_i < c_j$ quan $i < j$.

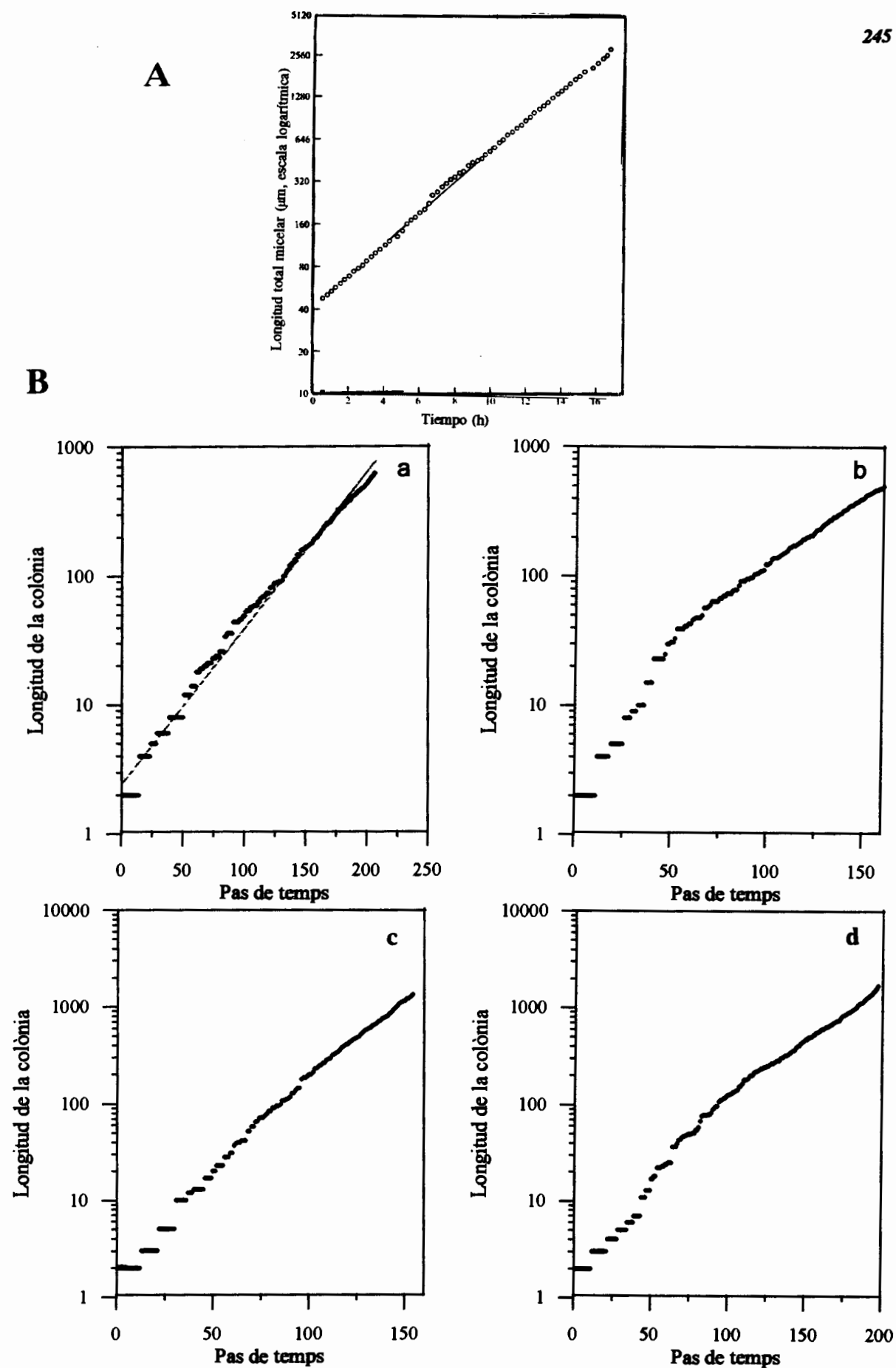
Els resultats que exposarem a continuació permeten il·lustrar les possibilitats de la simulació, comparar-la amb resultats experimentals i validar el model. Els fonaments d'aquest sistema per a un posterior perfeccionament del model s'evidencien amb els resultats que s'han obtingut, els quals s'han d'entendre des d'una anàlisi qualitativa.

4.5.1. MAGNITUDS GLOBALES DE LA COLÒNIA

a) Longitud de la colònia

Un paràmetre controlat és la longitud de la colònia, el nombre total de cel·les ocupades pel miceli. En el nostre model aquesta longitud és equivalent al concepte de biomassa, ja que s'estableix un valor constant i fix per a la massa d'una cel·la. Així la biomassa de la colònia coincideix amb la suma de les cel·les que configuren el sistema.

Com es pot observar en la figura 4.13. els resultats de la simulació (B) per a la longitud de la colònia són qualitativament semblants al resultat experimental (A), i en particular cal destacar el que mostra l'evolució corresponent a la concentració c_1 de nutrient. Encara que cadascuna de les hifes que configuren la colònia creix linealment, l'augment global de la longitud segueix una evolució exponencial, com es pot veure en els resultats experimental i simulats. Les discontinuïtats que s'aprecien en les primeres etapes de les evolucions simulades es deuen a la caracterització discreta i entera que tenen les cel·les, evidenciant-se de forma més contundent en l'inici del creixement de la hifa jove després de germinar, d'on passa de longitud 1 a 2, i així successivament. En la gràfica experimental (4.13.A.) la longitud inicial que es contempla correspon a un estat més avançat respecte al moment de la germinació.



b) Nombre de rames

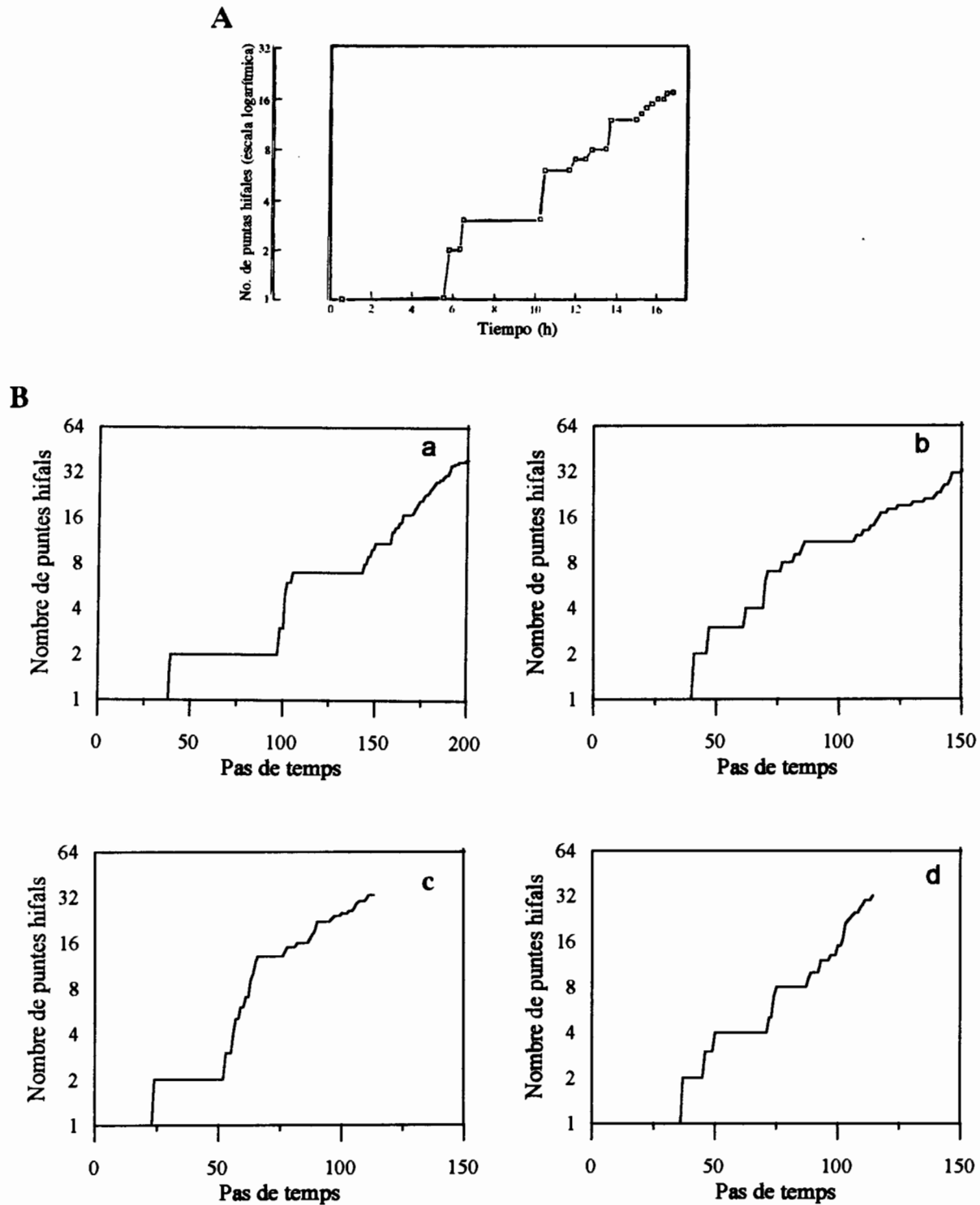


FIGURA 4.14. Evolució temporal del nombre de rames o puntes hifals. **A.** Experimental. Creixement d'un miceli de *Aspergillus nidulans* en medi sòlid DM a 25°C. Font: Trinci (1973) dins de Ibáñez i Vaquero, 1995. **B.** Simulació. S'utilitzen diferents concentracions: **(a)** c_1 , **(b)** c_2 , **(c)** c_6 , **(d)** c_4 .

Les gràfiques de la figura 4.14. mostren el nombre de ramificacions o puntes hifals que la colònia va desenvolupant al llarg del temps. El resultat experimental (A) i els resultats simulats (B) són qualitativament semblants. La simulació s'ajusta al tipus de comportament observat en la realitat, l'aparició de plats o esglaons en l'inici de l'evolució evidencien un creixement prioritari de la colònia en l'elongació de les seves hifes. Amb el pas del temps aquest comportament es transforma en un creixement més continu i lineal (escala logarítmica). El nombre de puntes de la colònia augmenta exponencialment amb el temps com a resultat de la ramificació de cadascuna de les rames.

Respecte a com afecta la concentració de nutrient del medi en el procés de la ramificació, es constata que la freqüència de ramificació està relacionada amb la densitat de partícules de nutrient, els fongs en medis pobres utilitzen l'energia en el creixement de la hifa principal que s'estén longitudinalment a la recerca d'aliment i que ramifica en una proporció considerablement inferior com a conseqüència de la menor producció de vesícules. Això s'evidencia amb les gràfiques de la figura 4.14.B. (a) i (g), que representen concentracions força diferents. També es possible intuir que la interacció entre la velocitat de consum de partícules de nutrient i la seva difusió amb la producció de vesícules i el seu flux pot ser possiblement la causa de comportaments com el de la gràfica B.(c) de la figura 4.2.??.

c) Concentració de nutrient en el medi

L'evolució de la concentració de nutrient en el medi és un paràmetre relacionat inversament amb el consum d'aliment per part de la colònia. A partir de la gràfica experimental de la figura 4.15.A. s'observa que la concentració de glucosa en el medi té tres tendències clarament diferenciades. Una primera on la concentració de glucosa pràcticament no varia i que coincideix amb l'inici del desenvolupament del sistema. Una segona on s'aprecia una disminució pronunciada de la quantitat de nutrient, i una tercera on es suavitza aquesta davallada de concentració.

En les gràfiques corresponents a la simulació (figura 4.15.B.) es reproduïxen de forma qualitativa el comportament de les dues primeres parts de l'evolució, mentre que no s'arriba a observar el d'aquesta tercera part. En la primera aproximació del model elaborat no s'ha implementat l'efecte inhibidor que té l'àcid cítric en l'assimilació de la glucosa per part del microorganisme i que possiblement sigui el responsable d'aquest fet. Així, la simulació no reflecteix aquest canvi en el ritme d'assimilació de substrat per part de la colònia en una etapa avançada del seu desenvolupament.

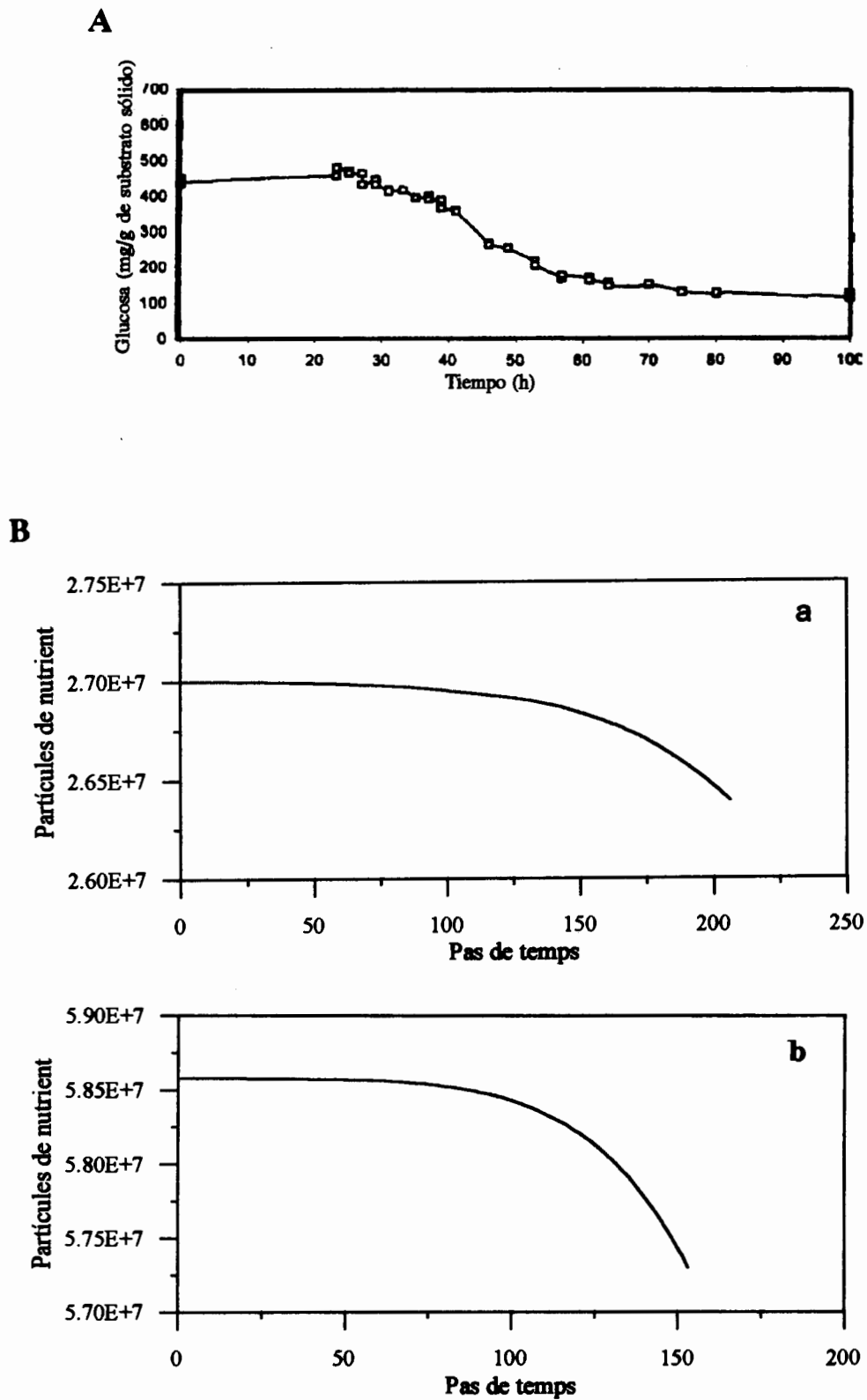


FIGURA 4.15. Evolució temporal de la concentració de nutrient en el medi. **A. Experimental.** *A. niger* en medi sòlid en un suport Amberlite, amb 400 g de glucosa/l. Font: Gutiérrez-Rojas i al. (1995) dins de Ibáñez i Vaquero, 1995. **B. Simulació.** S'utilitzen diferents concentracions: (a) c_1 , (b) c_7 .

d) Producció d'àcid cítric

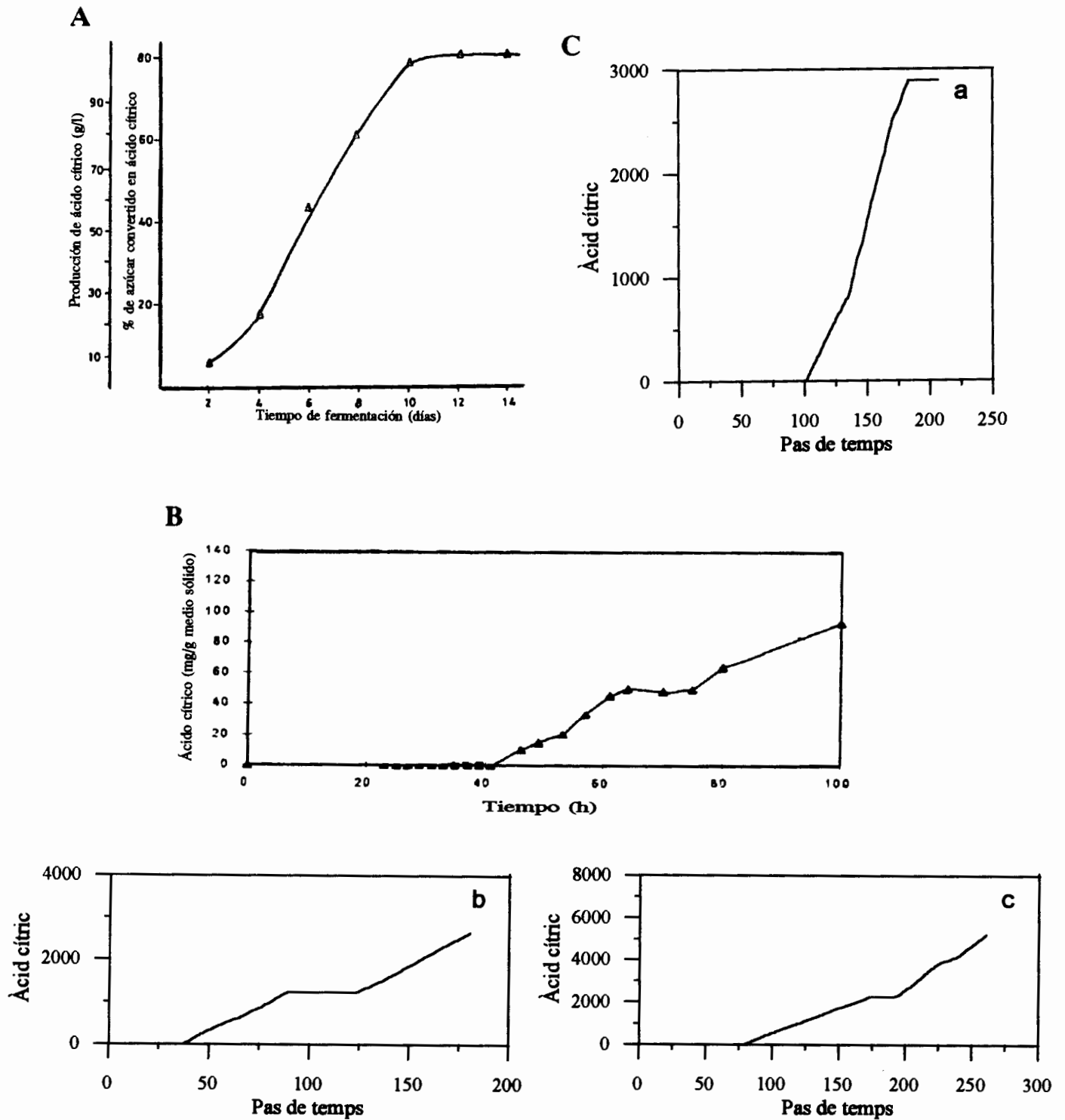


FIGURA 4.16. Evolució temporal d'àcid cítric en el medi. **A.** Experimental. *A. niger* en medi sòlid. Font: Garg i Sharma (1991) dins de Ibàñez i Vaquero, 1995. **B.** Experimental. *A. niger* en medi sòlid en un suport Amberlite, amb 300g glucosa/l. Font: Gutiérrez-Rojas i al. (1995) dins de Ibàñez i Vaquero, 1995. **C.** Simulació. S'utilitzen diferents concentracions: (a) c_1 , (b) c_2 , (c) c_3 .

Les gràfiques de la figura 4.16. representen la concentració d'àcid cítric, un producte excretat pel microorganisme que s'emmagatzema en el medi. En els primers estadis de l'evolució no es detecta la seva presència per ser un producte del segon metabolisme (un metabolit secundari), resultant d'un canvi de metabolisme. A mesura que el fong creix comença a aparèixer com a conseqüència de l'activació progressiva i lenta del segon metabolisme en les zones més velles de la colònia. Algunes de les cel·les canvien la seva via metabòlica mentre que altres encara no.

Els resultats de la simulació s'ajusten qualitativament als observats experimentalment.

En els sistemes reals s'han pogut observar dues evolucions diferents per a la quantitat d'àcid cítric i que corresponen a les gràfiques de la figura 4.16.A. i 4.16.B.. Amb la simulació, per a diferents concentracions de substrat nutritiu, s'han recuperat aquests dos tipus de comportaments. Quan es té un medi amb menys concentració la producció d'àcid cítric augmenta de forma gairebé lineal fins assolir un valor màxim en un determinat interval de temps, mentre que en augmentar la concentració de nutrient, aquesta producció varia, podent-se observar dues parts pel creixement lineal separades per un període de certa estabilitat per a la quantitat d'àcid cítric. Això es pot relacionar amb la velocitat amb la que regions de la colònia passen a ser zones velles, ja que l'envelliment progressiu de les parts d'una colònia sembla ser el responsable de l'aparició d'aquest producte.

4.5.2. EVOLUCIÓ ESPACIAL DE LA COLÒNIA

En les gràfiques de la figura 4.17. es pot observar l'ordre, estructura i disposició espacial de les rames que apareixen en l'evolució simulada d'una colònia a partir de la primera hifa jove, per comparar amb resultats experimentals de les figures 4.9. i 4.10.. S'observa una distribució en forma d'arbre, les primeres rames que apareixen són properes a la zona d'inici o germinació, mentre que les rames més joves es troben a la vora de les diferents zones apicals. També es constaten diferències en la velocitat de desenvolupament de les rames on la prioritat en l'elongació d'algunes d'elles és major que en altres.

També es presenten els resultats obtinguts amb la simulació en la distribució de la colònia en relació a la disponibilitat de nutrients. Per a diferents concentracions de nutrient en el medi s'observa que la ramificació i extensió de la colònia canvia (figura 4.19.). Per a medis més pobres en substrats nutritius el miceli ramifica menys i creix més lentament. També s'observa que el diàmetre de la colònia o l'àrea d'abast d'aquesta és aproximadament el mateix.

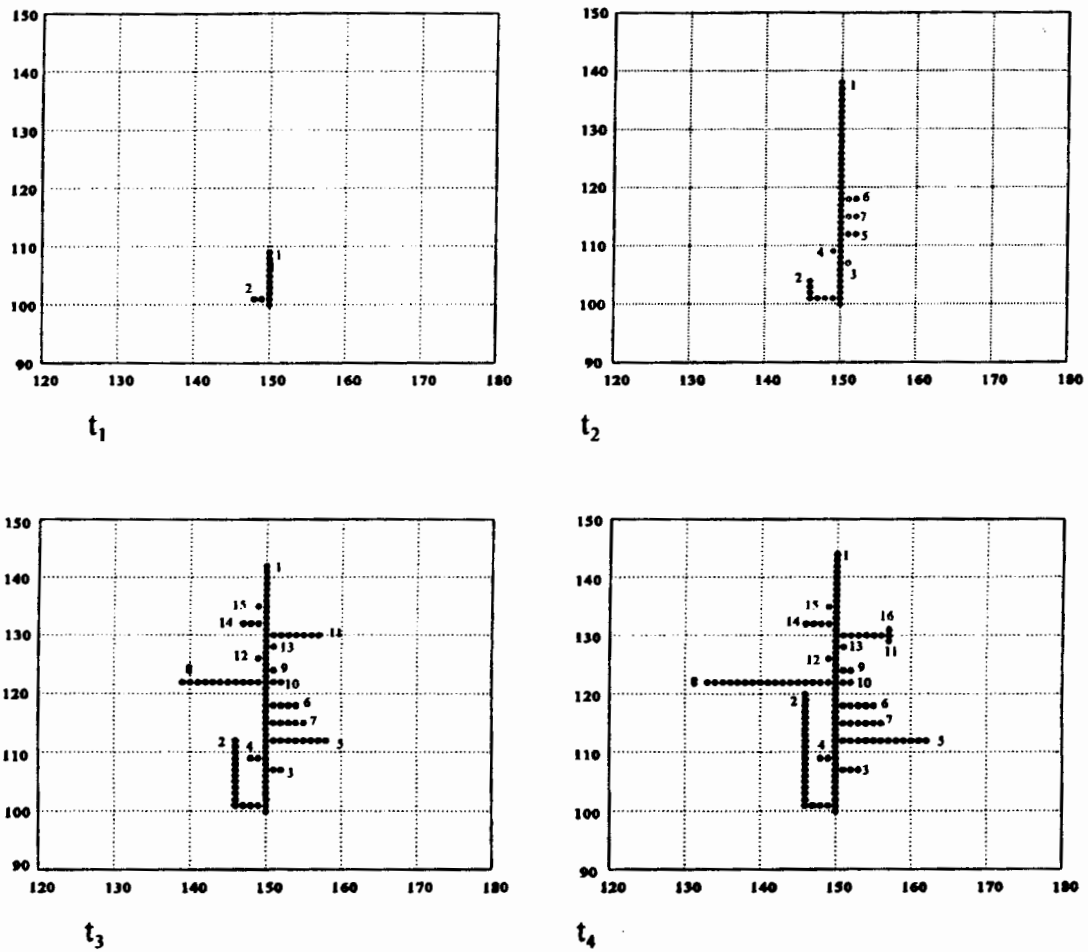


FIGURA 4.17. Evolució simulada de la ramificació de la colònia: disposició i ordre d'aparició de les rames en una hifa per a quatre passos de temps diferents ($t_1 < t_2 < t_3 < t_4$). Els números que apareixen corresponen a l'ordre d'aparició de les rames.

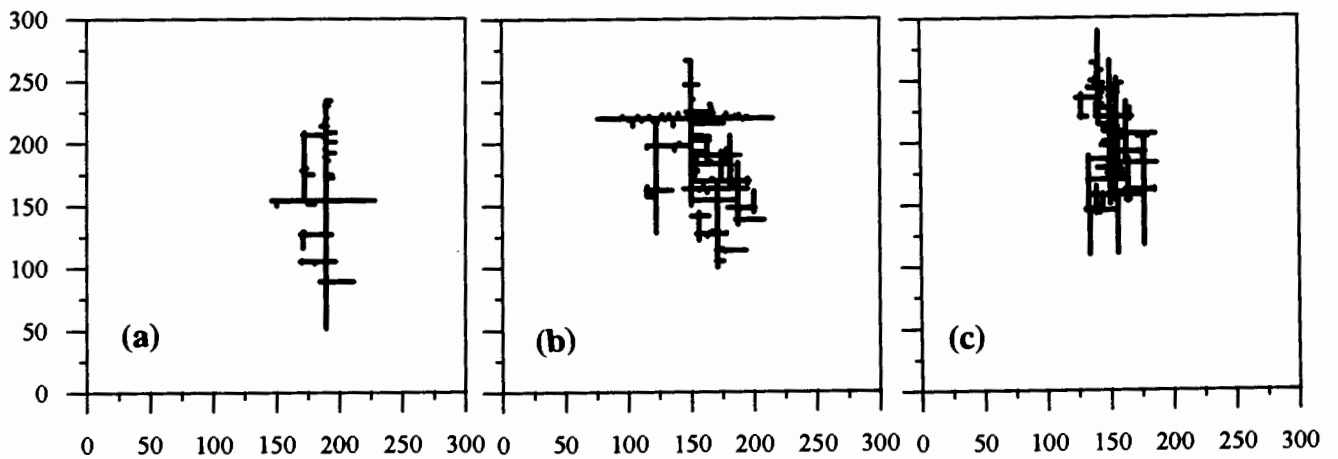


FIGURA 4.18. Aspecte global d'una colònia simulada quan creix durant un cert temps en medis amb diferent concentració de nutrient: (a) c_1 , (b) c_3 , (c) c_5 .

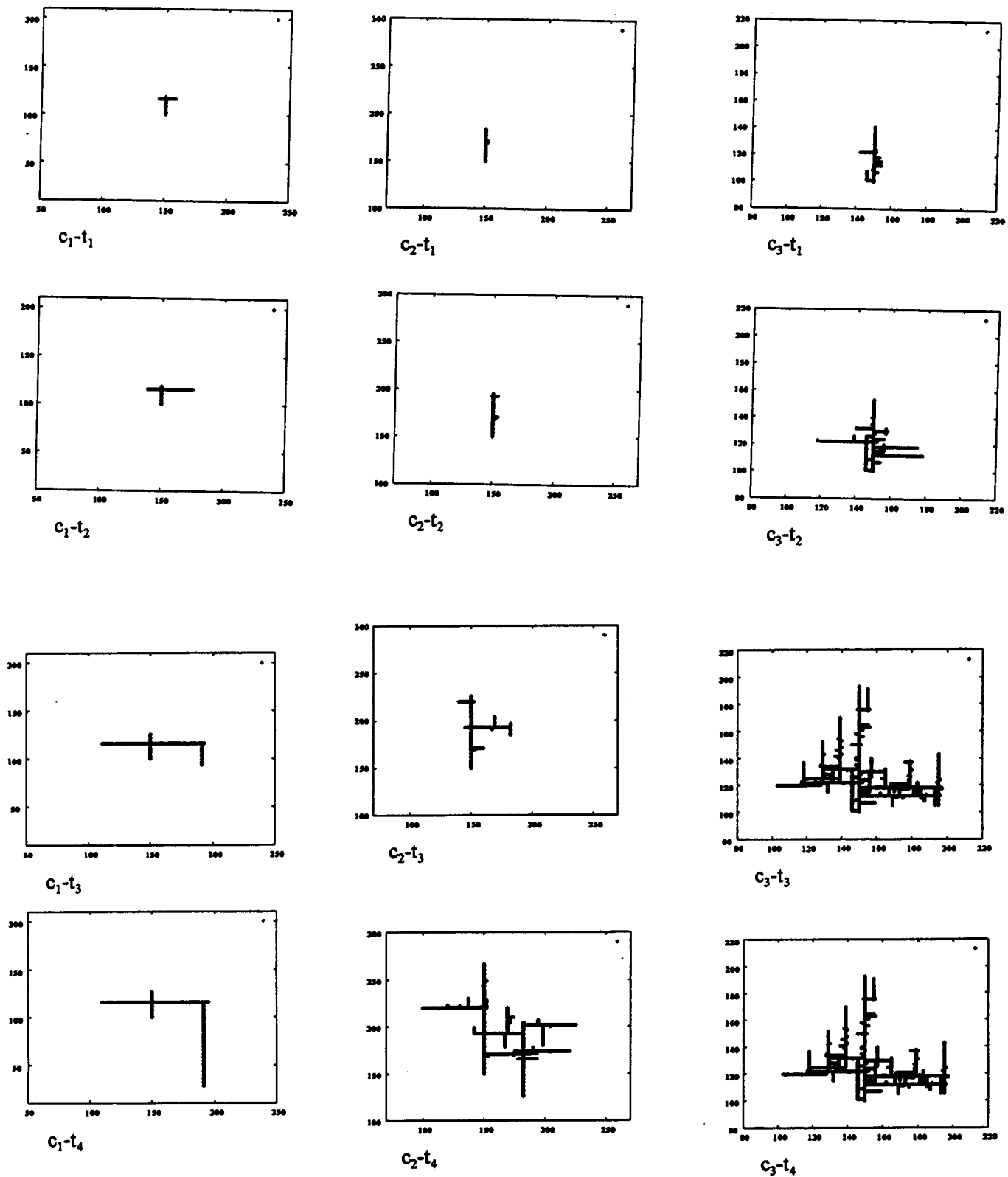


FIGURA 4.19. Comparació espai-temporal de l'evolució i distribució en l'espai bidimensional d'una colònia fúngica simulada quan es troba en medis amb diferents concentracions de substrat. S'han utilitzat tres concentracions de nutrient inicial diferents ($c_1 < c_2 < c_3$) i s'han fixat quatre instants de temps de l'evolució ($t_1 < t_2 < t_3 < t_4$).

4.6. CONCLUSIONS

1. S'ha formulat un model de creixement en medi sòlid pels fongs filamentosos del gènere *Aspergillus* que té en consideració el creixement espai-temporal de la colònia sobre la superfície i la producció d'àcid cítric per determinades parts de la colònia.

2. S'ha modelat pel fong filamentos:

- la captació i l'assimilació de nutrient del medi
- el flux de vesícules a través de les hifes
- l'extensió o elongació de les hifes
- l'aparició de rames en les hifes
- els cicles de septació dels compartiments amb la formació de septes
- un mecanisme regulador-temporal ("rellotge biològic") considerant la producció de glicerol
- el canvi de metabolisme del primari al secundari
- el tancament de septes oberts
- la producció d'àcid cítric

3. S'ha implementat el model de simulació discreta en un nou simulador. S'ha constatat la validesa del mètode i del model per descriure el comportament d'aquest sistema amb l'obtenció de resultats qualitativament comparables amb els experimentals.

4. S'han realitzat simulacions amb diferents concentracions de nutrient en el medi i s'ha controlat, entre altres possibilitats, els següents paràmetres:

- la massa i la longitud de la colònia
- el nombre de rames i el seu ordre d'aparició en la ramificació
- la disposició espacial i temporal de la colònia en el medi
- la concentració de nutrients del medi
- la producció d'àcid cítric

5. S'ha constatat la potència de la metodologia de la simulació discreta al ser capaç d'integrar en un mateix model aspectes propis del desenvolupament i aparença de la colònia amb altres paràmetres propis de l'activitat metabòlica del microorganisme, com per exemple és la producció d'àcid cítric.

6. S'ha demostrat la validesa d'aquesta metodologia en abordar l'estudi del fong filamentos, considerant-lo com un conjunt de parts discretes connectades que configuren els compartiments, i les quals tenen unes característiques de funcionament metabòlic propi.

4.7. PERSPECTIVES EN LA SIMULACIÓ DEL COMPORTAMENT DE FONGS FILAMENTOSOS

S'ha elaborat un model que descriu el comportament del fong filamentos *A. niger* en la primera etapa del seu desenvolupament. Sofisticar el model permetrà abordar i profunditzar aspectes importants del seu comportament. Les millores que es poden implementar d'una forma immediata, a curt termini són:

- 1) Possibilitat de controlar l'efecte de l'àcid cítric sobre el comportament de la colònia. Amb referència a aquesta qüestió i considerant dades de la recopilació bibliogràfica, es proposa un efecte inhibitori de l'àcid cítric en l'assimilació de glucosa per part de l'organisme. L'actual simulador ja contempla aquest fenomen que no ha estat introduït ja que el model elaborat contempla la primera etapa del desenvolupament del microorganisme.
- 2) Possibilitat d'obtenir evolucions d'altres paràmetres relacionats amb el desenvolupament del sistema, i que l'actual simulador ja pot controlar:
 - Longitud de les zones de creixement periferal.
 - Relacions entre la longitud total del miceli i el nombre de rames existents.
 - Distribució de septes en les hifes de la colònia indicant el seu estat (oberts o tancats)
 - Distribució espacial de diferents substàncies en el medi, per exemple disposició del nutrient principal i de l'àcid cítric.
 - Distribució de la quantitat de vesícules en cadascuna de les cel·les ocupades pel miceli.

- 3) Modelització i simulació del comportament de dos inòculs estudiant el tipus d'interacció que es produeix entre ells.
- 4) Possibilitat d'articular un canvi de direcció en el creixement de la hifa en arribar als límits físics del domini quadrat, alhora que utilitzar una nova alternativa per a la direcció en el creixement i la ramificació a les ja utilitzades, la direcció diagonal.
- 5) Introducció de la autolisi.
- 6) Estudi, modelització i simulació de creixements en medi líquid.

El model de creixement i producció d'àcid cítric s'ha realitzat per a un medi sòlid. El motiu per haver escollit aquest medi és que els estudis experimentals demostren que aquest és millor i més apte per iniciar el modelatge del comportament del microorganisme. La seva observació i el seu control són més clars i precisos, poden proporcionar més fàcilment les bases per a un posterior estudi del fong en altres medis de cultiu. Una possible alternativa a llarg termini, després d'haver aprofundit en el desenvolupament d'aquest model de comportament en medi sòlid, seria modelar el creixement submergit en un medi líquid. Es faria aleshores necessari introduir en el simulador les tres dimensions espacials, incrementant de forma important el nombre de variables a considerar.

Per altre part, degut a la importància que tenen encara el medis de cultiu sòlids en la producció de substàncies altament específiques, el model elaborat per aquest fong es pot adaptar de forma relativament fàcil al comportament d'altres fongs filamentosos.