

SIMULACIÓ DISCRETA DE SISTEMES BIOLÒGICS: UNA POTENT EINA EN LA RECERCA EN CIÈNCIA I TECNOLOGIA

Daniel López

Departament d'Indústries Agroalimentàries. ESAB.

Marta Ginovart

Departament d'Enginyeria Agrària. ESAB.

Joaquim Valls, Ricard V. Solé

Departament de Física i Enginyeria Nuclear. UPC.

Data de recepció: desembre de 1991

RESUM

La simulació discreta és una eina útil per estudiar i entendre sistemes complexos. S'ha elaborat un programa de simulació discreta per l'estudi de sistemes ecològics. S'ha desenvolupat amb profunditat una versió del programa per l'estudi de cultius bacterians. S'explica, esquemàticament, quines són les diferents parts del programa i el seu funcionament. Es fa un resum de quins han estat els resultats més importants assolits amb la utilització del simulador en l'estudi i investigació de cul-

tius bacterians. També es presenten alguns resultats d'interès en ecologia. Es comenten les possibilitats actuals de la simulació, en les quals ja s'ha començat a treballar. Es discuteixen finalment algunes de les noves perspectives d'utilització del simulador.

Mots clau:

Models matemàtics de sistemes biològics, simulació discreta, microbiologia, ecologia, biotecnologia.

ABSTRACT

Discreet simulation of biological systems: a powerful tool in science and technology research.

The discreet simulation is a useful tool to study and understand complex systems. A program of discreet simulation for the study of ecological systems has been elaborated. A version of the program for the

study of bacterial culture has been developed in depth. The different parts of the program and its functioning are schematically explained. There is a summary of the most important results achieved with the use of the simulator in the study and the research of bacterial culture. Some interesting results in ecology are shown too. The first

works on the present possibilities of the simulation are expounded. Finally some of the new future developments on the use of the simulator are discussed.

Key words:

Mathematical Models of Biological Systems, Discreet Simulation, Microbiology, Ecology, Biotechnology.

INTRODUCCIÓ

Aquest treball presenta una de les línies de recerca que s'està desenvolupant a l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona, en aquest cas en col·laboració amb la Facultat d'Informàtica de la Universitat Politècnica de Catalunya.

És reconeguda la importància de l'ús de models en indústries agroalimentàries, així com en explotacions agràries o ramaderes. Els models ajuden a conèixer i poder mantenir les condicions òptimes per a la producció, ofereixen eines per controlar la qualitat del producte, permeten interpretar els efectes inhibidors en la producció, obren camí al control per ordinador de les diverses fases de producció...

La utilització de models, quan s'està treballant amb sistemes biològics, ràpidament topa amb una important dificultat: la complexitat d'aquests sistemes. Des del més senzill cultiu bacterià fins a la més sofisticada explotació, la complexitat dels sistemes és molt superior a la complexitat de la major part dels sistemes purament físics o químics. Això fa que molt sovint els models utilitzats en l'estudi de sistemes biològics siguin vagues aproximacions a les situacions reals, i per tant de poca utilitat pràctica.

L'estudi dels sistemes complexos és actualment una de les línies prioritàries en investigació. De les matemàtiques i de la

física provenen la major part d'eines i teories pel seu estudi. Existeixen teories de caire general (per ex. termodinàmica de processos allunyats de l'equilibri, teoria de sistemes dinàmics caòtics...) que han assolit importants resultats conceptuals i algunes aplicacions pràctiques. Presenten però l'inconvenient de la seva "generalitat", en necessitar estudiar un sistema concret es fa necessari conèixer i modelar el sistema, just una dificultat massa gran. Clàssicament, per modelitzar sistemes concrets s'ha fet ús de la formulació d'equacions diferencials. Aquest mètode té, però, dues dificultats: la formulació correcta de les equacions diferencials que descriuen el sistema i la resolució dels sistemes d'equacions. La darrera dificultat ha estat salvada recentment per la possibilitat de resoldre sistemes d'equacions amb l'ajuda d'ordinadors. De totes maneres el plantejament d'un sistema d'equacions diferencials que descriu correctament el sistema continua essent una dificultat molt important, i més gran quan més complex és el sistema. Existeix actualment un mètode que permet l'estudi de sistemes complexos concrets sense els inconvenients citats: la simulació discreta. La major part de sistemes complexos són formats per molts elements no tan complexos. La simulació discreta es fonamenta en les següents pautes:

- 1) Modelitzar el comportament dels elements d'un sistema.
- 2) Modelitzar les relacions entre els elements del sistema.
- 3) Mitjançant ordinador, estudiar el comportament dels elements actuant conjuntament.

Un exemple clàssic en la simulació discreta la constitueixen la simulació de xarxes neuronals. Existeixen models prou correctes sobre el funcionament individual d'una neurona. Es coneix també com interactuen dues neurones entre si. La simulació discreta serveix per estudiar el comportament de sistemes de moltes neurones interconnectades.

El nostre grup de recerca ha desenvolupat

un programa de simulació discreta, escrit en FORTRAN, per a l'estudi de sistemes ecològics (GIRÓ et al. 1985, VALLS 1986, GIRÓ et al. 1986). Les darreres versions del programa són executades en ordinadors Microvax 3400 o similars. El temps de càlcul de CPU pot oscil·lar entre uns minuts i unes hores, en funció de les característiques de la simulació realitzada. La metodologia utilitzada en aquest treball es fonamenta en tècniques de simulació de reconegut prestigi dins de la física com són el mètode de Dinàmica Molecular i el de Monte Carlo (GIRÓ et al. 1980). Hem treballat especialment en la simulació discreta de cultius bacterians. En aquest camp s'han aconseguit resultats força interessants (BERMÚDEZ et al. 1989).

SIMULACIÓ DE CULTIUS BACTERIANS

Hem adaptat el programa per l'estudi de cultius bacterians amb una o diverses espècies, que es troben en diferents medis i sota diferents condicions ambientals.

Per realitzar la simulació considerarem un espai físic de dues o tres dimensions. La simulació de dues dimensions és útil per la simulació de creixements microbians sobre superfícies, i per extensió la metodologia utilitzada és apta per estudiar ecosistemes que es desenvolupen bàsicament sobre una superfície. La simulació en tres dimensions és adequada per simular creixements bacterians en un volum, i per extensió per estudiar ecosistemes que es desenvolupen en tres dimensions (per exemple sistemes aquàtics).

Per fer possible la simulació considerem l'espai dividit en m cel·les de costat l (fig.

1). Actualment estem utilitzant de l'ordre de 10^4 cel·les. Per controlar les característiques de cada una d'aquestes cel·les definim una sèrie de vectors amb els valors dels diferents paràmetres utilitzats en cada cas. Per exemple els vectors $NUT_i (n_1, n_2, n_3, \dots, n_m)$ ens indiquen les quantitats presents en el sistema de tipus de nutrient i (o qualsevol altre tipus de substància) en cada una de les cel·les ($1, 2, \dots, m$). O per exemple el vector $TEMP (t_1, t_2, t_3, \dots, t_m)$ controla la temperatura a tot l'espai. Per estudiar l'espai podem definir més o menys vectors en funció del problema a estudiar (concentracions de diverses substàncies, temperatura, viscositat, densitat...).

La simulació així realitzada ens permet tan sols estudiar un espai físic limitat. Per minimitzar els efectes de les fronteres del

nostre espai utilitzarem condicions periòdiques de contorn (fig. 2): considerem que el nostre sistema es troba envoltat d'altres sistemes que són exactament iguals al considerat. Les rèpliques del sistema interactuen amb les cel·les que controlem mitjançant les condicions periòdiques de contorn. Una altra possibilitat és considerar que unes determinades parets del nostre sistema tenen unes propietats característiques fixades (temperatura, concentració d'una substància...). Aquest és un dels mètodes que ens permeten simular sistemes sota condicions espacialment no uniformes o sota l'acció de diversos gradients.

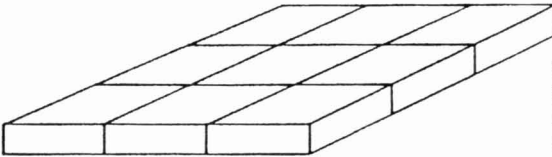


Figura 1
Exemple d'espai bidimensional dividit en cel·les ($m=9$)
Example of a bidimensional space divided into cells ($m=9$)

Els microorganismes en el nostre sistema queden definits pel conjunt de vectors $IND_j (i_1, i_2, \dots, i_m)$. D'aquesta manera l'individu j queda definit per les components del vector, que ens indiquen la cel·la on es troba, la seva massa, la seva concentració interior de diferents metabòlits, valors dels diferents paràmetres que defineixen el seu estat dins del cicle cel·lular, etc. En les condicions actuals del programa estem simulant de l'ordre de 2×10^4 individus, un nombre prou gran si tenim en consideració que els cultius bacterians reals, en condicions favorables, arriben a assolir, normalment, valors de 10^9 bact ml^{-1} .

La simulació considera el conjunt del sistema a intervals discrets de temps, els

anomenem «pas de temps» o «pas de programa». En cada pas de temps es poden realitzar les següents accions:

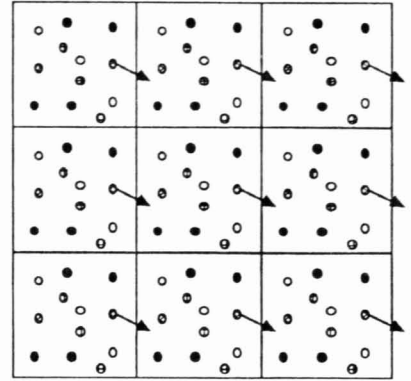


Figura 2
Representació del sistema i les seves rèpliques en una simulació amb condicions periòdiques de contorn per una simulació bidimensional ($m=36$).
Representation of the system and its copies in a bidimensional simulation with periodic boundary conditions ($m=36$).

1. Difusió de substàncies o de calor:

Es té en consideració cadascuna de les cel·les de l'espai i les del seu entorn. Canvien els vectors NUT_i , $TEMP$, etc. que defineixen les característiques de l'espai. Aquests canvis obeeixen lleis físiques senzilles (Llei de Fick de la difusió, llei de Fourier de la conducció de calor...).

2. Accions sobre els individus:

Es té en consideració cadascun dels individus del cultiu, canvia el vector IND_j que el defineix, i les components dels vectors que defineixen l'estat de la cel·la de l'espai on es troba aquest individu. Aquests canvis es produeixen en funció d'una sèrie de regles individuals de funcionament pròpies de l'espècie i de les condicions on es

produeix el creixement bacterià; per exemple, primer l'individu es mou (pot canviar la cel·la on es troba localitzat), segon si hi ha nutrient al seu abast aquest individu assimila una quantitat d'aquestes partícules, i per tant disminueix la quantitat de substrat a la cel·les. Com a conseqüència del metabolisme augmenta la seva massa, dissipa una quantitat de calor, augmenta la quantitat d'una altra substància a la cel·la producte del metabolisme. Finalment, si s'acompleixen les condicions (massa, cicle cel·lular), per la duplicació apareix un nou individu.

Aquestes accions es poden veure inhibides per la presència d'alguna substància a la cel·la on hi ha el microorganisme, o per alguna característica de l'estat del microorganisme, o fins i tot per altres condicions.

D'aquesta manera controlem les característiques de cada un dels individus del cultiu i de cada una de les cel·les de l'es-

pai. La capacitat de memòria i la velocitat de càlcul dels ordinadors permeten estudiar situacions ben complexes, malgrat que les regles de funcionament «microscòpiques» són senzilles.

Els ordinadors treballen seqüencialment, però en cada pas de temps considerarem les cel·les i els individus en un ordre diferent, determinat aleatòriament en cada ocasió. D'aquesta manera minimitzem els efectes de treballar seqüencialment, ja que en els sistemes reals els esdeveniments es realitzen simultàniament.

Hem comprovat que la simulació reproduceix correctament el comportament dels sistemes reals quan afegim a les «regles» de funcionament «microscòpic» cert grau d'aleatorietat, o soroll. No podem discernir si aquest fet és una característica dels sistemes reals o és allò que supleix en la simulació els efectes de múltiples petits factors.

ESQUEMA DEL PROGRAMA

El funcionament del programa es troba indicat a la fig. 3. Les diferents unitats d'aquest són:

- A. Entrada de dades: nombre d'individus inicial de cada espècie, característiques de les espècies, quantitat inicial de diverses substàncies, dimensió de l'espai...
- B. Es llegeixen les dades que descriuen el sistema, es numeren les cel·les...
- C. S'elabora per cada cel·la una llista amb les cel·les amb les quals pot interactuar. Aquestes llistes es desordenen i es guarden per ser utilitzades en cada pas de programa. S'inclouen aquí les condicions de contorn.
- D. Es ditribueixen els individus i les substàncies a les cel·les (uniformement, o aleatòriament, o segons alguna funció analítica).

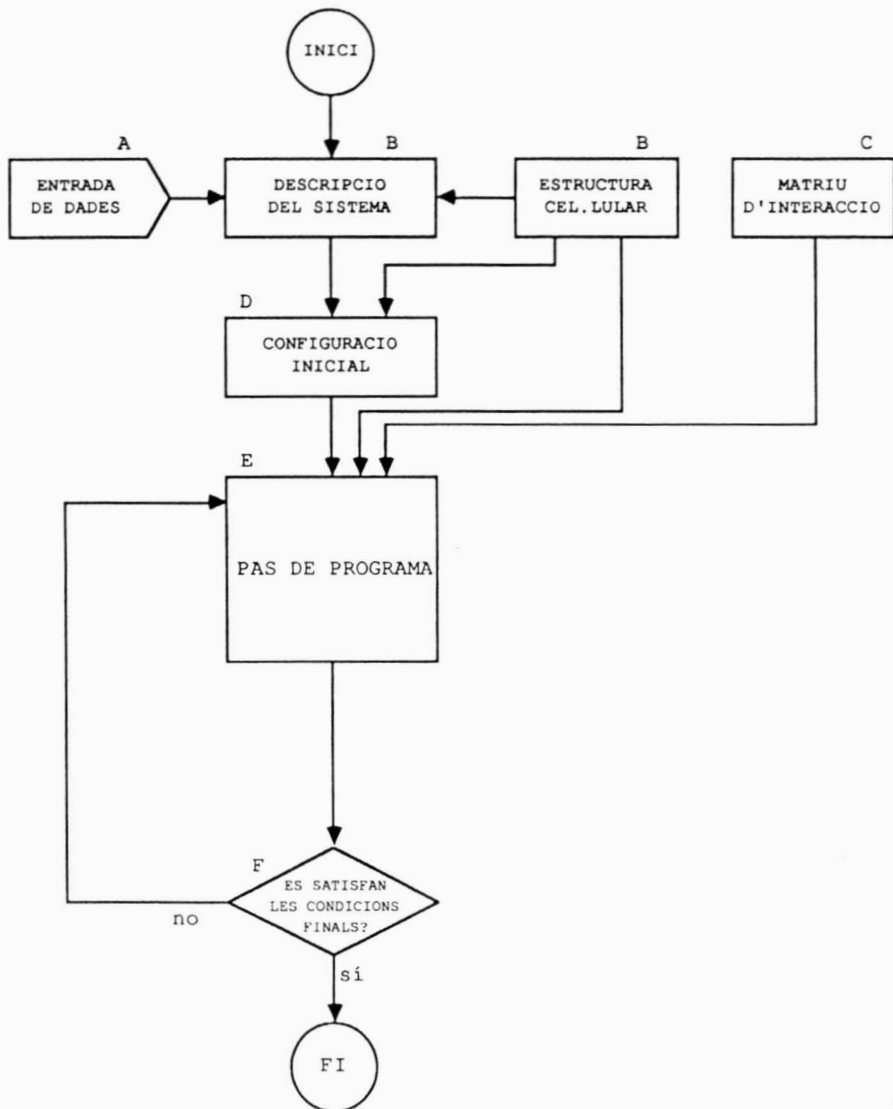


Figura 3 - Diagrama de flux del programa de simulació. / Flow-chart of the simulation program.

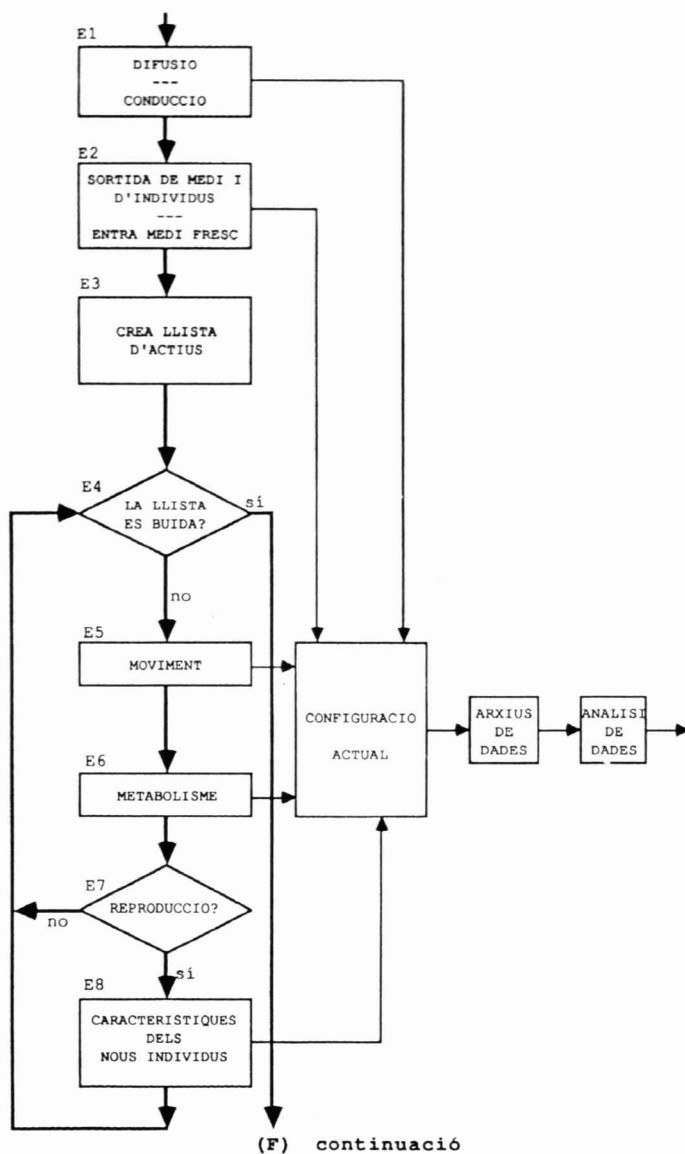


Figura 4 - Diagrama de flux d'un pas de programa o pas de temps.
Flow-chart of the step program or the step time.

E. Pas de programa: seqüència d'accions a realitzar sobre el medi i els individus (fig. 4).

F. Control per finalitzar la simulació.

En cada pas de programa, o pas de temps, es poden realitzar les següents accions sobre cada microorganisme o sobre cada cel·la:

E1 Varia la quantitat de substàncies a cada cel·la segons la llei de Fick. Varia la temperatura de cada cel·la segons la llei de Fourier.

E2 En simular un sistema obert: extraïem medi i individus corresponents a un volum determinat (part proporcional del sistema). S'introdueix el mateix volum de medi fresc, es distribueixen les partícules de diverses substàncies. En simular un sistema tancat: no hi ha flux ni de medi ni d'individus. En simular un sistema agitat es redistribueixen totes les partícules del medi.

E3 Es desordena la llista de vectors IND_j corresponents a tots els individus presents. Aquesta llista indicarà l'ordre en què actuaran els microorganismes.

E4 Es considera l'individu corresponent segons la llista elaborada a E3. Si ja hem considerat tots els individus s'ha finalitzat el pas de programa. Continuem per (F).

E5 Es mou l'individu considerat a una posició propera triada aleatòriament.

E6 L'individu consumeix nutrient de diverses cel·les del seu entorn. La quantitat consumida és funció de la massa del microorganisme. Disminueix el nutrient en aquestes cel·les. Augmenta la massa de l'individu, es dissipa calor, apareix a la cel·la un nombre de partícules producte del metabolisme...

E7 Si s'acompleixen les condicions de reproducció es crea un vector corresponent a un nou individu, es redefineix el vector de l'individu original.

RESULTATS OBTINGUTS

1. Resultats importants en microbiologia

Inicialment, per comprovar la bondat del nostre programa vam simular diversos creixements microbians coneguts experimentalment. Mostrem aquí un resum dels resultats més interessants.

a) Vam estudiar el creixement de *Serratia marcescens* ATCC 274 en un medi mínim de glucosa en presència d'oxigen

(BERMÚDEZ & WAGENSBERG, 1985). El microorganisme utilitza inicialment la glucosa com a substrat oxidable per a la cadena respiratòria. En esgotar-se l'oxigen els bacteris canvien de via metabòlica, comencen a fermentar el nutrient amb un rendiment inferior al de la respiració. A la figura 5 es mostren els resultats obtinguts que reproduïen satisfactòriament l'evolució de la concentració d'oxigen, la potència calorífica dissipada i la biomassa. Es van realitzar

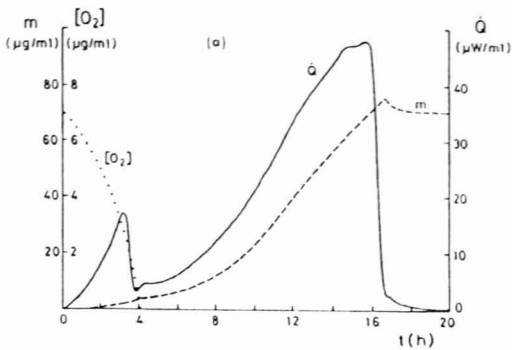


Figura 5a
 Creixement aeròbic-anaeròbic de *Serratia marcescens* a 28°C en medi mínim de glucosa en un cultiu tancat (BERMÚDEZ & WAGENSBERG, 1985).
Aerobic-anaerobic growth of Serratia marcescens at 28°C in a minimal glucose medium in a batch culture (BERMÚDEZ & WAGENSBERG, 1985).

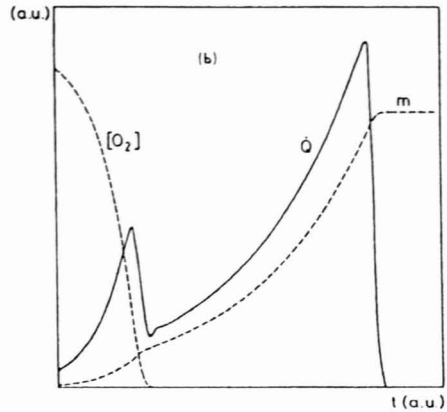


Figura 5b
 La corresponent simulació en unitats arbitràries (U.A.).
 [O₂]: concentració d'oxigen. Q-dot: potència calorífica dissipada. m: biomassa.
Simulation results in arbitrary units (U.A.).
 [O₂]: oxygen concentration. Q-dot: heat dissipation (U.A.).
 m: biomass.

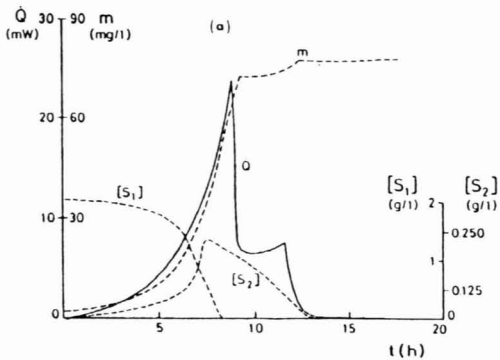


Figura 6a
 Creixement aeròbic d'*Escherichia coli* en medi mínim de glucosa (ISHIKAWA et al., 1981).
Aerobic growth of Escherichia coli in a minimal glucose medium (ISHIKAWA et al., 1981).

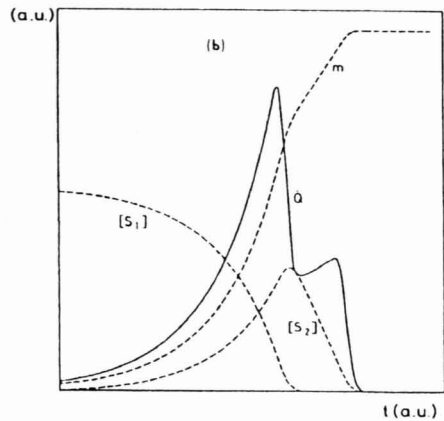


Figura 6b
 La corresponent simulació en unitats arbitràries (U.A.).
 [S₁]: concentració de glucosa. [S₂]: concentració d'acetat. Q-dot: potència calorífica dissipada. m: biomassa.
Simulation results in arbitrary units (U.A.).
 [S₁]: glucose concentration. [S₂]: acetate concentration. Q-dot: heat dissipation. m: biomass.

simulacions d'aquest creixement a diferents temperatures comprovant l'efecte dels diferents paràmetres microscòpics. A la fig. 5 es pot observar un resultat de gran importància per mostrar la potència de la simulació: entre el creixement aeròbic i l'anaeròbic existeix una petita fase de latència, s'observa clarament a la corba de la potència calorífica dissipada. En la simulació no és exactament igual l'estat de tots els individus, ni són totalment uniformes en l'espai les concentracions de les diverses substàncies; això permet estudiar amb facilitat fenòmens transitoris. L'estudi de situacions termodinàmicament no estacionàries és un dels problemes que presenta més interès en microbiologia (BADER, 1982).

- b) *Escherichia coli* creix aeròbicament en glucosa tot produint acetat. Després de l'esgotament de la glucosa l'acetat és utilitzat pels bacteris per continuar el seu creixement. En la simulació és senzill imposar als bacteris que produeixen un determinat element en consumir un nutrient, tot distribuint aquest nou element en la cel·la on es troba el microorganisme (ISHIKAWA et al. 1981). Els resultats obtinguts són també satisfactoris tal com es pot observar a la fig. 6.
- c) La simulació també permet estudiar creixements bacterians en reactors oberts amb un determinat flux volumètric. Els resultats obtinguts en aquest cas són totalment comparables als obtinguts experimentalment i teòrica per altres autors (HERBERT et al. 1956).

Altrament, amb la simulació no tan sols hem reproduït fenòmens coneguts i explicats. Hem utilitzat també aquesta eina en la recerca pròpiament dita. Hem obtingut resultats interessants en estudiar la dependència de la velocitat de creixement μ en funció de la concentració de nutrient C i en funció de la temperatura T.

- d) Clàssicament en microbiologia s'ha admès que la funció $\mu = \mu(C)$ obeeix la cinètica de Monod. Experimentalment s'ha comprovat que la velocitat de creixement se satura més de pressa que no pas la cinètica de Monod (BADER 1982). Hem reproduït correctament la dependència de μ amb la concentració amb una funció molt senzilla: la cinètica de Blackmann (fig. 7). Tant en els sistemes reals, com en la simulació: la concentració del nutrient no és exactament uniforme a tot l'espai i els microorganismes presenten diverses grandàries, diferents estats... Això fa que la funció $\mu(C)$ obtinguda amb el simulador s'ajusti perfectament als resultats experimentals (fig. 7).
- e) RATKOWSKY et al. (1982, 1983) van demostrar que la μ varia quadràticament amb la temperatura. No van proposar, però, explicació teòrica a aquest fet. Amb la simulació hem comprovat que aquesta dependència està relacionada amb la velocitat mitjana de moviment de les partícules de nutrient en el medi. A la fig. 8 es mostra com els resultats obtinguts són comparables als que s'obtenen experimentalment.

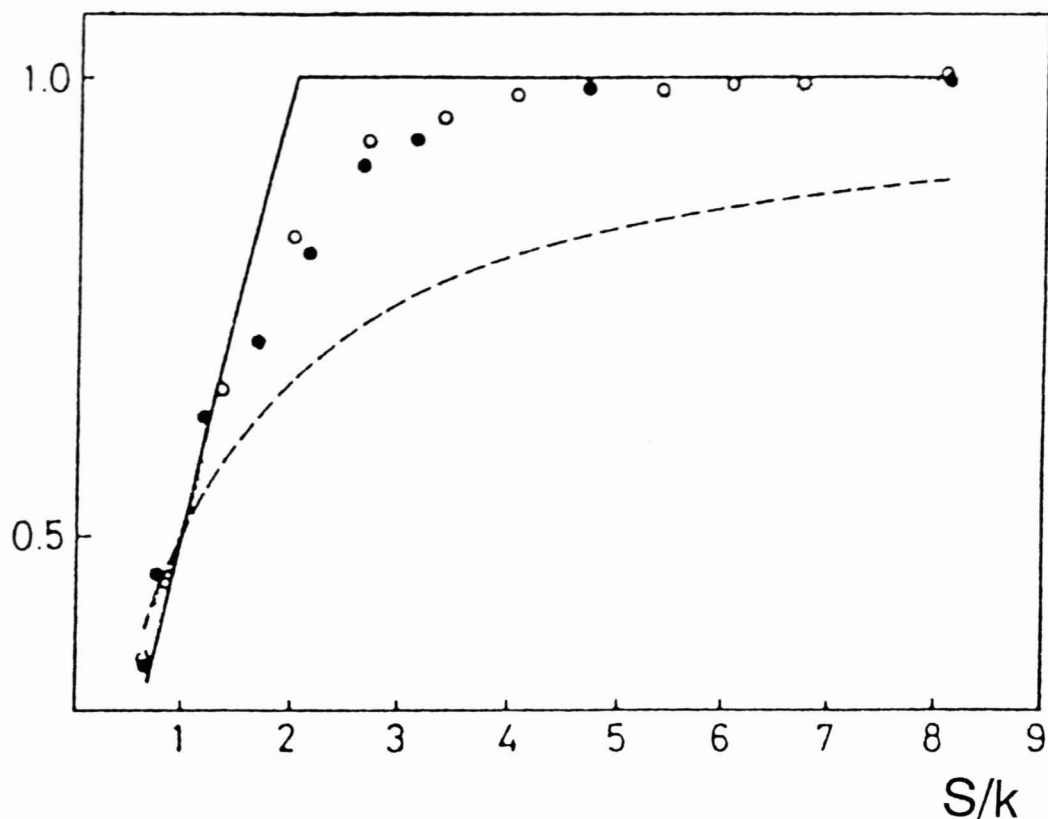
μ/μ_{\max} 

Figura 7 - Velocitat de creixement normalitzada (μ/μ_{\max}) d'un cultiu bacterià en funció de la concentració de normalitzada de nutrient (S/k). La línia contínua correspon al model de Blackmann (cinètica corresponent a un individu). Els punts negres són resultat de la simulació (cinètica corresponent al conjunt del cultiu). Els punts blancs són dades experimentals i la línia discontínua representa la cinètica de Monod corresponent.

Normalized growth rate (μ/μ_{\max}) of a bacterial population versus the normalized substrate concentration (S/k). The continuous line illustrates the Blackmann model (individual kinetics). The black points are the results of the simulation (culture kinetics). The open circles are experimental data and the dashed line represents the Monod kinetics.

f) La simulació ens permet controlar la biomassa de cada individu del cultiu. D'aquesta manera és possible estudiar les distribucions de masses. A la fig. 9 es pot veure com les distribucions que s'obtenen són les mateixes que s'observen al laboratori. Hem estudiat les relacions entre el cicle cel·lular i l'evolució de les distribucions de masses. Hem estudiat també la relació entre les distribucions de masses i el segon principi de la termodinàmica (LURIE & WAGENSBERG 1984, WAGENSBERG et al. 1988).

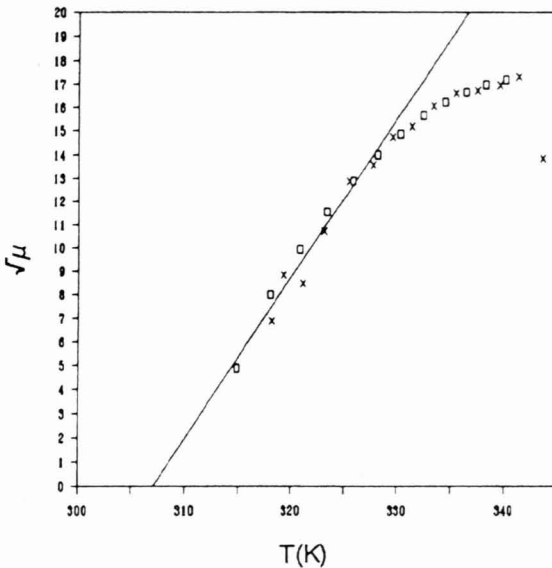


Figura 8
 Arrel quadrada de la velocitat de creixement d'un cultiu de *B. steorothermophilus* a diferents temperatures.
 X: dades experimentals (RATKOWSKY et al., 1983),
 □: resultats de la simulació.
Square root of the growth rate versus temperature for a culture of B. steorothermophilus.
 X: experimental data (RATKOWSKY et al., 1983),
 □: simulation results.

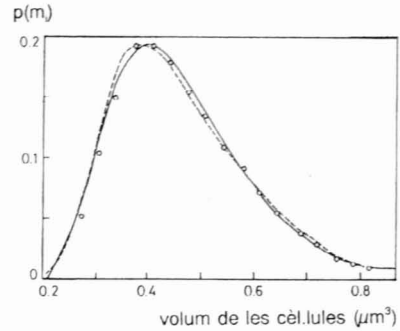


Figura 9
 Distribució de masses d'un cultiu bacterià. Línia discontinua: resultats experimentals. Punts: dades del simulador. Línia contínua: model previst pel principi de màxima entropia (Maxent) (WAGENSBERG et al., 1988).
Biomass distribution of a bacterial culture. Points: simulation data. Continuous line: maximum entropy model (WAGENSBERG et al., 1986).

g) Experimentalment s'han observat oscil·lacions de la calor dissipada i de la pressió en un cultiu d'*Escherichia coli* creixent en un sistema hermèticament tancat, amb medi mínim de glucosa (SANAHUJA et al. 1990). La introducció, en el simulador, de regles individuals tenint en consideració la fermentació àcid-mixta ha permès interpretar l'aparició d'aquestes oscil·lacions (GINOVART et al. 1991).

2. Resultats importants a ecologia

a) Usualment s'han utilitzat en ecologia les equacions diferencials per estudiar les interaccions entre diverses espècies. Aquests mètodes presenten, però, poca flexibilitat per estudiar els sistemes reals. Per exemple en estudiar sistemes depredador-presa es postulen oscil·lacions regulars, mentre que normalment en els ecosistemes reals s'observen oscil·lacions caòtiques. En la simulació

és senzill introduir soroll, o certa aleatorietat, en el moviment o en les interaccions entre diverses espècies. Aquest fet, entre d'altres, permet a la simulació representar més correctament la complexitat dels sistemes reals. A la fig. 10 mostrem el resultat d'un cas concret on s'han introduït oscil·lacions en les característiques de l'entorn on es produeix el creixement dels éssers vius al llarg del temps (SOLÉ & VALLS 1991).

- b) Recentment s'ha constatat que una sèrie de fenòmens ben diversos (terratrèmols, distribució d'arbres...), corres-

ponent a sistemes allunyats de l'equilibri, obeeixen les propietats del que es coneix com Sistema Crític Autoorganitzat (BAK & CHEN 1991). Hem constatat com el comportament d'un cultiu continu a temperatura constant ha de ser també un sistema crític autoorganitzat (SOLÉ et al. 1991). Un dels resultats més sorprenents d'aquest estat és la presència d'una distribució fractal de biomassa, o d'individus, a l'espai. Aquest resultat pot ser molt important en ecologia; probablement descriu el comportament dels sistemes ecològics en estats estacionaris, per exemple en l'estat climàtic o estat terminal d'una successió.

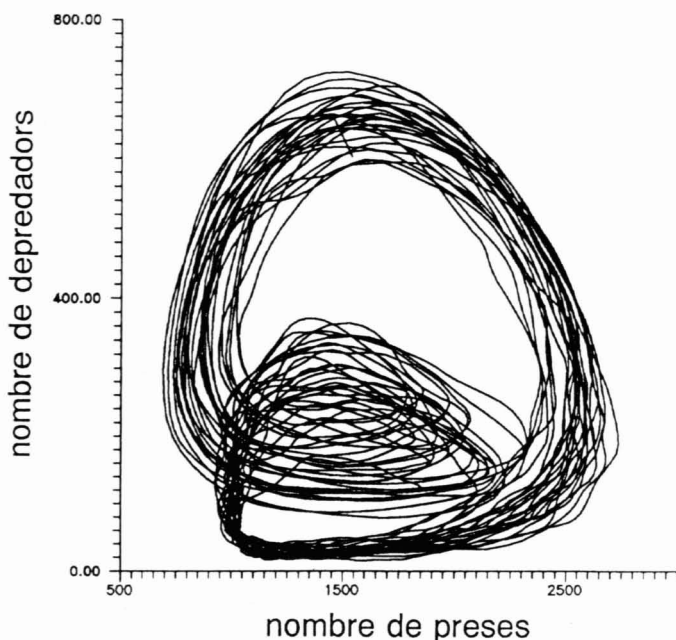


Figura 10 - Sistema depredador-presa on hi ha un flux periòdic de nutrient. Comportament caòtic del sistema (SOLÉ & VALLS, 1991).
Depredator-prey system with a periodic flux of nutrient. Chaotic behaviour of the system (SOLÉ & VALLS, 1991).

POSSIBILITATS I PERSPECTIVES DE LA SIMULACIÓ

Amb el treball realitzat fins ara estem segurs que, efectivament, la simulació és una potent eina en la recerca en ciència i tecnologia. Les possibilitats d'utilització d'aquesta metodologia semblen, ara per ara, gairebé inesgotables.

Actualment estem treballant per desenvolupar versions del programa per simular sistemes d'interès biotecnològic. Estem treballant en creixements de llevats. Aquests sistemes presenten força més complexitat que la dels cultius bacterians però el seu interès és molt important per a la indústria agroalimentària.

Estem també treballant en creixements microbians en medis no homogenis, o amb gradients de temperatura o de concentració de nutrients. Aquest darrer treball es realitza en col·laboració amb AFRC (Agricultural Food Research Council. Institut of Food

Research. UK). L'estudi de sistemes amb gradients és també molt important des del punt de vista de l'ecologia.

A llarg termini la simulació pot adaptar-se per l'estudi de múltiples sistemes: simulació de conreus (control de les característiques dels sòls i dels vegetals al llarg de diverses temporades tenint en consideració el creixement vegetal, els adobs, els recs), simulació de sistemes aquàtics, etc.

La simulació no constitueix una teoria general, és una eina útil per a l'aprofitament d'especialistes en diversos camps concrets. És una mostra de la importància de la col·laboració entre científics i tècnics de diverses disciplines. Al nostre parer la simulació és l'eina que permetrà connectar els estudis teòrics amb els resultats experimentals en l'estudi dels sistemes complexos.

BIBLIOGRAFIA

- BAK, P. & CHEN, K. 1991. Self-Organized Criticality. *Scientific American*. January 26-33.
- BADER, F.B. 1982. Kinetics of double-substrate limited growth. In: BAZIN, M.J. (ed.) *Microbial Population Dynamics*. CRC Series in Mathematical Models in Microbiology. London.
- BERMÚDEZ, J.; LÓPEZ, D.; VALLS, J. & WAGENSBERG, J. 1989. On the analysis of microbiological processes by Monte Carlo simulation techniques. *CABIOS* 5: 305-312.
- BERMÚDEZ, J. & WAGENSBERG, J. 1985. Microcalorimetric and thermodynamic studies of the effect of temperature on the anaerobic growth of *Serratia marcescens* in a minimal glucose-limited medium. *J. Therm. Anal.* 30: 1391-1402.
- GINOVART, M.; LÓPEZ, D.; SANAHUJA, A.; SERRANO, A. & WAGENSBERG, J. 1991. Simulation and microcalorimetry of Metabolic Oscillations of *Escherichia coli*. In: MOSEKILDE E. (ed.) *Proceedings of the 1991 European Simulation Multiconference*. S.C.S. San Diego. pp. 771-772.

- GIRÓ, A.; GONZÁLEZ, J.M.; PADRÓ, J.A. & TORRAS, V. 1980. The structure of liquid lead at 670 K through molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* **73**: 2970-2972.
- GIRÓ, A.; PADRÓ, J.A.; VALLS, J. & WAGENSBERG, J. 1985. Monte Carlo Simulation of a Ecosystem: a matching between two levels of observation. *Bull. math. Biol.* **47**: 111-122.
- GIRÓ, A.; VALLS, J.; PADRÓ, J.A. & WAGENSBERG, J. 1986. Monte Carlo simulation program for ecosystems. *C.A.B.I.O.S.* **2**: 291-296.
- HERBERT, D.; ELSWORTH, R. & TELLING, R.C. 1956. The Continuous Culture of Bacteria; a Theoretical and Experimental Study. *J. Gen. Microbiol.* **14**: 601-622.
- ISHIKAWA, J.; NONOYAMA, Y. & SHODA, M. 1981. Microcalorimetric study of aerobic growth of *Escherichia coli* in bath culture. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 2825-2836.
- LURIÉ, D. & WAGENSBERG, J. 1984. An Extremal Principle for Biomass Diversity in Ecology. In: LAMPRECHT, I. (ed.) *Thermodynamics and Regulation of Biological Processes*. WALTER DE GRUYTER and Co. Berlin. New York. pp. 257-273.
- RATKOWSKY, D.A.; LOWRY, R.K.; McMEEKIN, T.A. & STOKES, A.N. 1983. Model for Bacterial Culture Growth Rate Throughout the Entire Biokinetic Temperature Range. *J. Bacteriol.* **154**: 1222-1226.
- RATKOWSKY, D.A.; OLLEY, J.; McMEEKIN, T.A. & BALL, A. 1982. Relationship between Temperature and Growth Rate of Bacterial cultures. *J. Bacteriol.* **149**: 1-5.
- SANAHUJA, A.; SERRANO, A. & WAGENSBERG, J. 1990. Metabolic Oscillations of *Escherichia coli* recorded by Microcalorimetry. *Thermochimica Acta* **127**: 223-228.
- SOLÉ, R.V.; LÓPEZ, D.; GINOVART, M. & VALLS, J. 1991. Self-Organized Criticality in Monte Carlo Simulated Ecosystems. (En revisió).
- SOLÉ, R.V. & VALLS, J. 1991. Non-linear phenomena and chaos in a Monte Carlo Simulated Ecosystems. *Bull. Math Biol.* (Acceptat per la seva publicació).
- VALLS, J. 1986. Simulació de sistemes de N-cossos interactius. Aplicació als ecosistemes. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- WAGENSBERG, J.; LÓPEZ, D. & VALLS, J. 1988. Statistical aspects of biological organization. *J. Phys. Chem. Solids* **49**: 695-700.