

TRABAJO FIN DE GRADO  
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**SIMULANDO ECOSISTEMAS MICROBIANOS**  
**EFECTOS DE LAS INTERACCIONES COMPETITIVAS Y**  
**COOPERATIVAS EN LA EVOLUCIÓN Y AGRUPACIÓN**  
**POBLACIONAL DE LAS ESPECIES**

PEDRO BUESO-INCHAUSTI GARCÍA  
ETSIAAB UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

## **NOTA PARA EL LECTOR**

Me presento, mi nombre es Pedro Bueso-Inchausti, actualmente curso 4º de Biotecnología en la Universidad Politécnica de Madrid y soy el autor del texto que estás a punto de leer. Quiero creer que éste representa en gran medida lo que significa la biología computacional, mostrando sus bondades pero también sus limitaciones. Sus bondades porque, como podréis comprobar, realizo un seguimiento de parámetros que me permite explorar más posibilidades de las que podría abarcar a nivel experimental; algunas de estas vías pueden descubrir efectos inesperados y ser tomadas como punto de partida para experimentos dirigidos. Sus limitaciones porque trabajo con modelos, que se encuentran en un limbo constante entre la simplificación y la adecuación a la realidad, que echan a andar sin conocer todos los ingredientes necesarios.

Son muchas las cosas que he sacado de esta metodología de trabajo, pero si tuviera que destacar alguna, sería el modo en que deja entrever el método científico a cada paso. Al introducir un nuevo componente en el modelo o barrer los valores de un parámetro, puedes plantear hipótesis sobre la repercusión que tendrá; muchas veces los resultados sorprenden al mostrar algo inesperado y es entonces cuando empiezas a replantearte cosas que tenías por seguras. Creo que estos momentos de reflexión, de no entender, de no saber por qué, son los que han llevado a avanzar en ciencia. Por eso me encanta experimentarlos, aunque sea a mi pequeña escala.

Espero sinceramente que esto quede reflejado en el trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS**

Este trabajo merece tres agradecimientos.

El primero va para Juan Manuel Pastor Ruiz, mi tutor académico. Ha sido un apoyo constante, siempre dispuesto a resolver las no pocas dudas que planteaba e ingenioso a la hora de explorar distintas formas de acometer nuestros propósitos. Se ha volcado con el proyecto, lo que da cuenta de su enorme vocación como docente. De él me gustaría heredar lo que he bautizado como optimismo científico: “Si eres capaz de pensar en cómo resolver un problema, debes ser capaz de ejecutar dicha resolución”.

El segundo va para Javier Galeano Prieto, mi tutor profesional y corresponsal desde tierras anglosajonas. Ha sido quien ha marcado las líneas de interés y su ayuda, tanto en la planificación de metodologías como en la interpretación de resultados, ha resultado vital. De él me gustaría heredar su capacidad para escuchar y hacer que otras personas se sientan cómodas.

El tercero va Rosa del Campo Moreno, nuestra colaboradora desde el servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal. Sus consejos nos han permitido acercar nuestros modelos a la realidad de los sistemas microbianos y asegurar cierto rigor científico en las interpretaciones biológicas que hacíamos de los resultados. Siento que nos hemos quedado a medias con muchos aspectos que no le terminaban de convencer. Estoy seguro de que, con más tiempo, podríamos haberlos solucionado y que esto habría repercutido en positivo sobre el resultado final del proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
COMUNIDADES MICROBIANAS.....	1
MODELOS BASADOS EN AGENTES.....	3
<b>CAPÍTULO 2: OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>6</b>
MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE RESULTADOS .....	6
MÉTODOS PARA LA INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	11
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>16</b>
1 <sup>ER</sup> EXPERIMENTO.....	16
2 <sup>O</sup> EXPERIMENTO.....	21
3 <sup>ER</sup> EXPERIMENTO.....	24
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....</b>	<b>27</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>28</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>29</b>
A. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	29
B. MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	30

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Modelos, barridos de parámetros y réplicas contempladas para cada experimento.....	7
<b>Tabla 2.</b> Comparación entre DBSCAN y otros métodos de <i>clustering</i> .....	13
<b>Tabla 3.</b> Relevancia y efecto de varios parámetros en los modelos competitivos y cooperativos.....	16

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquemas de los modelos empleados para acometer los distintos experimentos planteados.....	6
<b>Figura 2.</b> Movimiento de los agentes.....	8
<b>Figura 3.</b> Ejemplo de implementación de FDR y DBSCAN.....	15
<b>Figura 4.</b> Evolución poblacional en modelos competitivos y cooperativos.....	19
<b>Figura 5.</b> Agrupación espacial en modelos competitivos y cooperativos .....	20
<b>Figura 6.</b> Evolución poblacional en modelos competitivos y cooperativos con escasez .....	22
<b>Figura 7.</b> Agrupación espacial en modelos competitivos y cooperativos con escasez y secreción guiada ...	23
<b>Figura 8.</b> Agrupación espacial en modelos competitivos y cooperativos complejos.....	26

## LISTA DE ABBREVIATURAS

MBA:	modelos basados en agentes
FDR:	funciones de distribución radial
DBSCAN:	<i>Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise</i>
P.ini:	proporción inicial
T.mov:	tasa de movimiento
T.sec:	tasa de secreción
N.max:	número máximo de agentes
R.det:	radio de detección
R:	radio de vecindad
NMP:	número mínimo de puntos

## ABSTRACT

The first part of this work introduces two fields of importance for the whole project. On the one side, basic aspects of microbial ecology are reviewed, with special emphasis in studying microbial communities and the interactions that govern their dynamics. On the other side, the concept of agent-based models (ABM) is addressed, explaining fundamental issues related to their way of working, implementation and application in diverse fields.

The second part of this work extends on the methodologies used for generating and analysing data. Our computational models must be capable of reproducing, by means of simplification, the way microbial ecosystems work; ABM allow programming behaviours at an individual level, which provides an interesting versatility for stochastic systems simulation. However, in order to respond to a specific problem, it is necessary to consider parameter scans with sufficient number of replicas. Once results are obtained, they are interpreted through graphical analysis. For understanding dynamics and predominance ratios between species, population evolution and proportions are studied. For recognising spatial grouping, radial distribution functions (RDF) are considered. For analysing arrangement in clusters, Density-Based Spatial Clustering of Application with Noise (DBSCAN) method is used. Such analyses go along with multiple comparison statistical methods.

The third part of this work collects the results and conclusions obtained from various experiments. First, we work with systems of 2 species that interact through competition or cooperation; from them, we analyse the effects of modifying parameters (initial percentage of each species, secretion rate or movement rate) and incorporating factors which bring our models closer to reality (food scarcity or stimuli guided secretion). Then, we increase complexity by considering 4 species and bring up coexistence between different interactions for studying predominance ratios at changeable conditions. It is necessary, not only to recognise tendencies from our models, but to relate them with a biological explanation.

## **RESUMEN**

La primera parte de este trabajo introduce los dos campos que vertebran el proyecto. Por un lado, se revisan aspectos básicos sobre ecología microbiana, poniendo especial énfasis en estudiar las comunidades microbianas y las interacciones que gobiernan sus dinámicas. Por otro lado, se aborda el concepto de modelos basados en agentes (MBA), explicando cuestiones fundamentales sobre su funcionamiento, implementación y aplicación en diversos ámbitos.

La segunda parte del trabajo se extiende sobre las metodologías empleadas para generar los datos y posteriormente analizarlos. Nuestros modelos computacionales deben ser capaces de reproducir, mediante una simplificación de la realidad, el funcionamiento del ecosistema microbiano deseado; los MBA permiten programar comportamientos a nivel de individuo y ello aporta una versatilidad interesante en la simulación de sistemas estocásticos. Para responder a una problemática concreta, sin embargo, es necesario considerar también barridos de parámetros con réplicas suficientes. Una vez se obtienen resultados, se emplean análisis gráficos para su interpretación. Para comprender las dinámicas y relaciones de predominancia entre especies, se estudia la evolución y proporciones poblacionales. Para conocer la agrupación espacial del sistema, se utilizan funciones de distribución radial (FDR). Para analizar la disposición del sistema en *clusters*, se usa el método de *clustering* basado en densidad *Density-Based Spatial Clustering of Application with Noise* (DBSCAN). Todo ello se acompaña de análisis estadísticos por métodos de comparación múltiple.

La tercera parte del trabajo recoge los resultados y conclusiones alcanzadas a raíz de experimentos planteados. Primero se trabaja con sistemas de 2 especies que interactúan por competición o cooperación; en ellos, se analizan las consecuencias de modificar parámetros (porcentaje inicial de cada especie, tasa de secreción o tasa de movimiento) y de incorporar factores que acercan nuestros modelos a la realidad (escasez de alimento o secreción guiada por estímulo). Después, se aumenta la complejidad del sistema al considerar 4 especies y se plantea la coexistencia entre interacciones distintas para estudiar las relaciones de predominancia según las condiciones impuestas. Una parte necesaria es la de encontrar sentido biológico a los resultados obtenidos para así mejorar nuestra comprensión sobre los sistemas microbianos.

## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

### **COMUNIDADES MICROBIANAS**

Una comunidad se define como un ensamblaje multiespecie de individuos que comparten un mismo hábitat. Sobre este concepto, se asientan dos ideas: la primera considera que los individuos de una comunidad se organizan e interaccionan entre sí, generando propiedades emergentes que no podían identificarse al analizar cada individuo de forma aislada; la segunda niega la interacción y atribuye la coexistencia entre individuos a que toleran condiciones fisicoquímicas similares (*Konopka, 2009*).

Las comunidades se caracterizan en base a propiedades estructurales, que describen su apariencia, y propiedades funcionales, que describen su comportamiento. De las primeras, se pueden destacar la composición (especies en la comunidad), abundancia (número de individuos en la comunidad), diversidad (proporción de individuos de cada especie) y estructura (distribución en el espacio de cada especie). De las segundas, mencionar la resistencia (capacidad para no perder la funcionalidad frente al estrés) y la resiliencia (capacidad para recuperar la funcionalidad perdida por el estrés), que conjuntamente determinan la estabilidad temporal (capacidad para mantener la funcionalidad en el tiempo). La resistencia viene favorecida por la redundancia genética, lo que explica que la pérdida de especialistas sea más drástica que la pérdida de generalistas; la resiliencia, por su parte, viene favorecida por la diversidad genética (*Little et al, 2008; Konopka, 2009*).

Se dice que un comportamiento es social si tiene efecto sobre la adecuación biológica o *fitness* tanto del individuo que ejerce como del que recibe la acción. Los microorganismos presentan rasgos claramente sociales; no están aislados sino inmersos en comunidades donde la adecuación biológica de cada individuo y la evolución de ciertos rasgos depende de su interacción con otros. Sin atender al mecanismo por el que operan, las interacciones se clasifican según su efecto: cuando es negativo para ambas, se habla de competición; cuando es positivo para ambas, se habla de cooperación o mutualismo (*Faust y Raes, 2012*). Algunas teorías, sin embargo, consideran válido que la suma de las adecuaciones biológicas varíe, no siendo necesario que ambas lo hagan (*Tarnita, 2017*).

De acuerdo a la teoría evolutiva, un organismo trata siempre de maximizar su propia adecuación biológica; por ello, resulta contradictorio que las acciones de un individuo acaben beneficiando a otro. Muchas teorías que buscan explicación a esta paradoja se apoyan en que la cooperación sí

reporta beneficio, aunque sea indirecto, para quién lo ejerce. Algunos ejemplos son el reparto de funciones para una división del trabajo eficaz (las especies pierden funciones que obtienen de otros genotipos al tiempo que se especializan en funciones requeridas por el resto) o la ayuda a individuos con carga genética similar para que perdure el linaje (*Tarnita, 2017*). Con todo, muchas veces la cooperación surge como mera respuesta a una situación de estrés ambiental.

Existen esencialmente dos formas de cooperación (*Cavaliere et al, 2017*). La primera se basa en la producción y secreción, al medio extracelular, de bienes comunes que favorecen la supervivencia en global de la comunidad. Para que este mecanismo tenga éxito, es necesario un equilibrio entre productores y beneficiarios. Este puede peligrar por la presencia de células tramposas o *cheater cells*, las cuales, al no tener un coste asociado a cooperar, poseen una adecuación biológica mayor cuando todos los individuos tienen acceso al bien común (*Ozkaya et al, 2017*). Algunos mecanismos para combatirlas son la privatización del bien común o el control de su producción por *quorum sensing* (*Mukherjee y Bassler, 2017*). También resulta útil organizarse en una estructura espacial que limite el movimiento de individuos y metabolitos, de manera que el bien común es accesible solo a los individuos cercanos al productor -esto explica que las bacterias tiendan a agruparse en colonias o *biofilms*, donde los individuos con parecido genético o propiedades similares están cerca- (*Marchal et al, 2017*). La segunda se basa en la producción y secreción al medio extracelular de metabolitos que pueden ser tomados por otras células, las cuales, a su vez, secretan metabolitos propios. Este mecanismo aparece asociado muchas veces a la sintropía, fenómeno por el cual una especie depende de ciertos compuestos para su crecimiento pero no puede producirlos.

Aunque hay ejemplos de cooperación en el medio natural, los microorganismos que coexisten en un entorno compartido tienden a competir por recursos escasos (*Foster y Bell, 2012*). La estrategia empleada para ello determina su adecuación biológica, de forma que los individuos con estrategias más exitosas son los que tienen una mayor probabilidad de seleccionarse. El modelo de competición por explotación de recursos compartidos plantea que la predominancia de un individuo depende de su habilidad para adquirir nutrientes. El modelo de competición por injerencia sugiere que los individuos emplean estrategias para aumentar su eficacia competitiva y apropiarse de los recursos ajenos. Ello puede lograrse con toxinas, inhibidores, dispersantes o mecanismos de secuestro de los nutrientes; también es vital posicionarse en regiones favorables y defenderlas una vez se han colonizado, así como usar el movimiento de manera efectiva, viajando en grupo para no generar una dispersión perjudicial. En el primer modelo, el resultado poblacional es independiente de las abundancias iniciales, lo que no sucede en el segundo (*Hibbing et al, 2010*).

En este trabajo se plantea un enfoque computacional de la ecología microbiana sintética, término válido para todo modelo creado desde un enfoque *bottom-up* donde varias poblaciones microbianas se ensamblan conjuntamente en un ambiente controlado que hace de representación simplificada de su ecosistema natural (*Zomorrodi y Segrè, 2016; De Roy, 2014*). Esta herramienta es útil para investigar los principios fundamentales de sistemas naturales pues permite limitar la influencia de varios factores para hacer un seguimiento de determinados parámetros. En este proceso de modelar comunidades microbianas, hay estudios partidarios de considerar que las especies interaccionan por pares mientras que otros abogan por asumir interacciones de mayor orden. Aunque esto puede mejorar la fiabilidad, requiere una parametrización detallada (*Friedman et al, 2017; Gore, 2018*).

## MODELOS BASADOS EN AGENTES

Los MBA son modelos dirigidos a la simulación computacional que reproducen comportamientos colectivos a partir de la definición y caracterización de agentes individuales. Son uno de los métodos más generalizados para modelar y simular sistemas complejos; de hecho, se implementan cuando se estudia el comportamiento conjunto de un número de agentes elevado (*Sayama, 2015*).

Los principales componentes de un MBA son los agentes, entidades discretas e identificables de forma única que son capaces de actuar de forma autónoma (dirigen su comportamiento hacia un propósito sin necesidad de estímulo externo) y social (interaccionan con otros agentes y con el medio que les rodea). Presentan atributos que definen sus propiedades y métodos o funciones que definen su comportamiento (pueden ser estáticos -invariables en el tiempo- o dinámicos -variables en el tiempo-) y suelen estar asociados a los distintos estados que caracterizan a un agente. Los agentes no interaccionan simultáneamente con todos los restantes sino con un subconjunto de los mismos que se define como vecindad; esta puede describirse en términos de topología (quién transfiere información a quién) o de proximidad (quién está cerca de quién) (*Macal y North, 2010*). El medioambiente no solo proporciona información espacial; puede condicionar la conducta de los agentes al interaccionar con ellos o favorecer la estigmergia, un mecanismo de coordinación entre agentes a través del medio físico que usan organismos sociales (*Theraulaz y Bonabeau, 1999*).

Para implementar un MBA en un algoritmo de programación son necesarios los siguientes pasos:

1. Especificar el problema a resolver.
2. Diseñar una estructura de datos donde almacenar los estados del medioambiente.

3. Describir las reglas que rigen el comportamiento del medioambiente.
4. Diseñar una estructura de datos donde almacenar los estados y propiedades de los agentes.
5. Describir las reglas que rigen el comportamiento de los agentes.
6. Describir las reglas que rigen la percepción e interacción con el medioambiente.
7. Describir las reglas que rigen la percepción e interacción con otros agentes.
8. Determinar un mecanismo de validación.

Una característica distintiva con los modelos basados en ecuaciones diferenciales es que los MBA son modelos descentralizados, sin una autoridad central que controle la conducta de los individuos en un esfuerzo por condicionar el comportamiento del conjunto. Los agentes interactúan con su entorno de forma autónoma y el movimiento hace que este entorno varíe a medida que avanza la simulación. Todo ello favorece la aparición de una incertidumbre y estocasticidad que no está programada de forma explícita. Aunque esto permite acercarse al comportamiento de los sistemas biológicos, también introduce una complejidad que dificulta el análisis por métodos matemáticos. Como solución, se plantea un análisis desde el punto de vista estadístico: las simulaciones permiten obtener una distribución de resultados, sobre la cual se emplean test de hipótesis para determinar si existen diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales (*Sayama, 2015*). En este sentido, los MBA pueden servir como sustituto virtual de varios campos experimentales, algo que ya han puesto de manifiesto autores que modelan sistemas celulares, sistemas ecológicos, sistemas microbianos (*Emonet et al, 2005; de Dios Caballero et al, 2017*), sistemas inmunes (*Preziosi, 2003*) o epidemias (*Epstein et al, 2007*). Otros campos que sacan provecho de este tipo de herramientas son las ciencias sociológicas, antropológicas o económicas.

Los MBA no imponen limitaciones relativas a lo que uno puede o no puede incluir. Esto obliga a cuidar todos los detalles de la simulación, lo que aumenta la cantidad de código necesario y la posibilidad de que se cometan errores. Por otro lado, la flexibilidad que ofrecen los MBA puede llevar a uno a pasarse en el nivel de detalle bajo la premisa de hacer del modelo algo más realista. El peligro de esto es que, a medida que aumenta la complejidad, se hace más difícil analizar y justificar los resultados obtenidos. Para evitar estos problemas, es necesario mantener un código ordenado y encontrar un balance entre simplicidad, validez y robustez: necesitamos un modelo que, sin introducir excesiva complejidad, genere predicciones cercanas al comportamiento real e insensibles a variaciones pequeñas en los parámetros (*Sayama, 2015*).

Un MBA tiene significado biológico si usa suposiciones probadas empíricamente para reproducir comportamientos colectivos desconocidos o bien si usa suposiciones desconocidas para reproducir comportamientos colectivos probados empíricamente. La primera aproximación permite realizar predicciones en base a teorías validadas sobre el comportamiento de los agentes mientras que la segunda permite desarrollar explicaciones sobre fenómenos ya validados. En cualquier caso, debe fundamentarse en conocimiento empírico fiable; de lo contrario, sus resultados no tendrán validez alguna sobre el sistema real que está siendo modelado (*Sayama, 2015*).

## **CAPÍTULO 2: OBJETIVOS**

Los objetivos generales planteados para este trabajo son:

- Comprender los conceptos básicos sobre comunidades e interacciones microbianas.
- Comprender el concepto, funcionamiento e implementación de los modelos basados en agentes.
- Programar modelos que reflejen comportamientos característicos de ecosistemas microbianos.
- Definir barridos de parámetros eficaces a la hora de responder a problemáticas concretas.
- Programar algoritmos que permitan analizar, desde el punto de vista gráfico y estadístico, los componentes poblacionales y espaciales de un sistema.
- Desarrollar un sentido crítico para interpretar los resultados y darles sentido biológico.

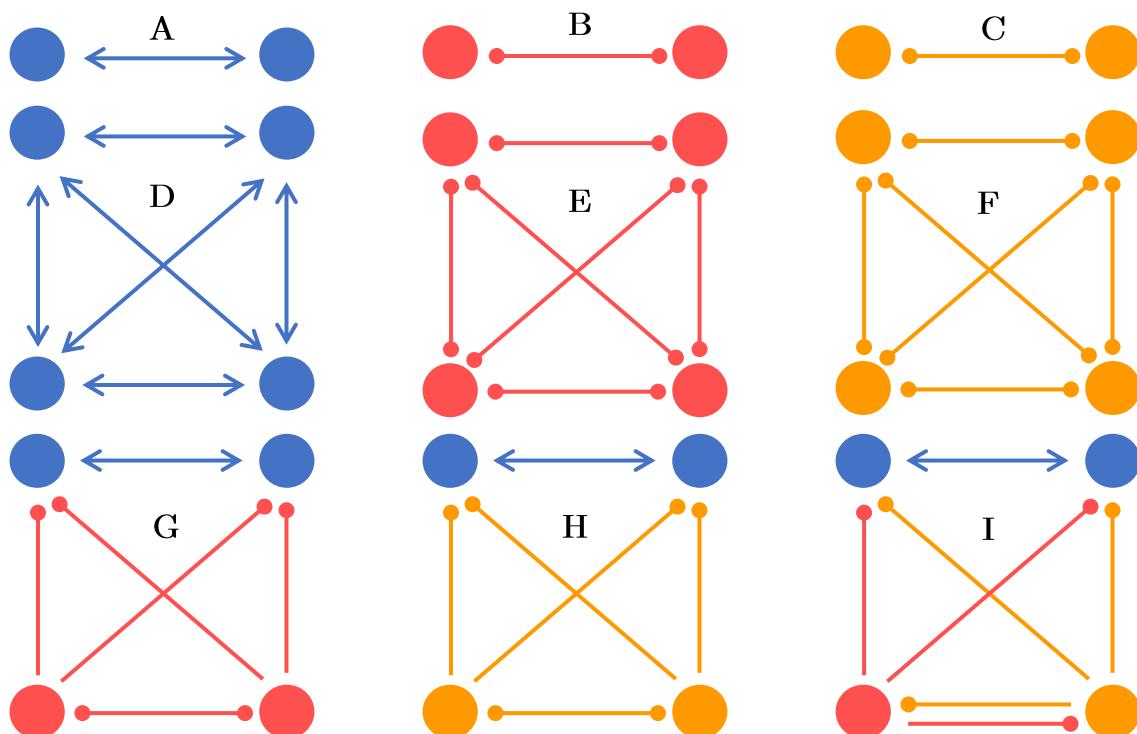
Los objetivos específicos planteados para este trabajo son:

- Estudiar el comportamiento de 2 especies que interactúan por competición o cooperación al variar parámetros como el porcentaje inicial, la tasa de secreción o la tasa de movimiento.
- Estudiar los efectos derivados de incluir la secreción guiada por estímulo o escasez de alimento.
- Estudiar los efectos derivados de aumentar la complejidad al considerar 4 especies.
- Estudiar los efectos derivados de considerar la coexistencia entre interacciones distintas.

## CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

### MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE RESULTADOS

Nuestros resultados se obtienen a partir de MBA implementados en *Python* que simulan distintos ecosistemas microbianos. En la *Figura 1* se muestran representaciones esquemáticas de los mismos. Estos modelos usan los ingredientes básicos que se quiere estudiar para asignar comportamientos a agentes individuales. No pretenden simular el comportamiento preciso de cada microorganismo sino reproducir dinámicas colectivas de los ecosistemas microbianos para desengranar la influencia de determinados factores o estrategias en la interacción microbiana.



**Figura 1.** Esquemas de los modelos empleados para acometer los distintos experimentos planteados. Los círculos azules representan a especies que secretan bienes comunes (cooperativas), los rojos a especies que secretan sustancias inhibidoras (competitivas) y los naranjas a especies que secretan sustancias tóxicas (competitivas). Las flechas van desde la especie que secreta el metabolito hasta la especie que lo consume.

Hemos decidido trabajar en *Python*, un lenguaje de código abierto, para una mejor colaboración con la comunidad científica. Además, el código empleado para implementar los modelos está disponible en un repositorio *online* ([https://github.com/pedrobuat1997/ABM\\_microbial\\_ecosystems](https://github.com/pedrobuat1997/ABM_microbial_ecosystems)).

Las secciones que incluyen los modelos son las siguientes:

### Definición de parámetros

Definimos los parámetros generales del sistema y los propios de cada especie. Los valores concretos considerados para cada experimento se incluyen en la *Tabla 1*.

### Barrido de parámetros e introducción de réplicas

Los barridos de parámetros se plantean para responder a una problemática concreta. Las réplicas son necesarias porque la naturaleza estocástica de los MBA genera una variabilidad analizable solo desde el punto de vista estadístico (para definir el número de réplicas se tiene en consideración tanto el tiempo de cómputo necesario como la variabilidad intrínseca a cada modelo). En la *Tabla 1* se muestran los barridos de parámetros y réplicas contemplados para cada experimento.

**Tabla 1.** Modelos, barridos de parámetros y réplicas contempladas para cada experimento. La repercusión de los parámetros en los fenómenos implementados se explicará más adelante.

Experimento 3	Experimento 2	Experimento 1	Experimentos		
			Nº de modelos	Parámetros (no variables y variables)	
9 (A,B,C,D,E,F,G,H,I)	6 (A,B,C con escasez o secreción guiada)	3 (A,B,C)		Dimensiones de la malla (100x100) Agentes incluidos inicialmente (200) Tasa de reproducción (0,05) Tasa de muerte (0,04)	Nº de combinaciones
				Capacidad de carga global (800) Tiempo de simulación (1000 pasos temporales) P.ini (0,1-0,9/0,2-0,8/0,3-0,7/0,4-0,6/0,5-0,5) T.sec (0,1-0,1/0,1-0,2/0,2-0,1) T.mov (1-1/1-2/2-1)	45 (5 x 3 x 3)
				Capacidad de carga global (800) Tiempo de simulación (1000 pasos temporales) P.ini (0,1-0,9/0,2-0,8/0,3-0,7/0,4-0,6/0,5-0,5) T.sec (0,1-0,1/0,1-0,2/0,2-0,1) T.mov (1-1/1-2/2-1) Radio de competición (5) N.max (40/80/160) R.det (5/7.5/10)	20
				Capacidad de carga global (600) Tiempo de simulación (2000 pasos temporales) P.ini (1/número especies) T.sec (0,1) T.mov (1) Radio de competición (5) N.max (30/60/120) R.det (5/10)	900 (45 x 20)
6 (3 x 2)		135 (5 x 3 x 3 x 3)			Nº de réplicas por modelo
50		10 en competición 5 en cooperación			Nº de réplicas totales
300 (6 x 50)		1350 (135 x 10) 675 (135 x 5)			
2700 (9 x 300)		5400 (4 x 1350) 1350 (2 x 675)			
		2700 (3 x 900)			

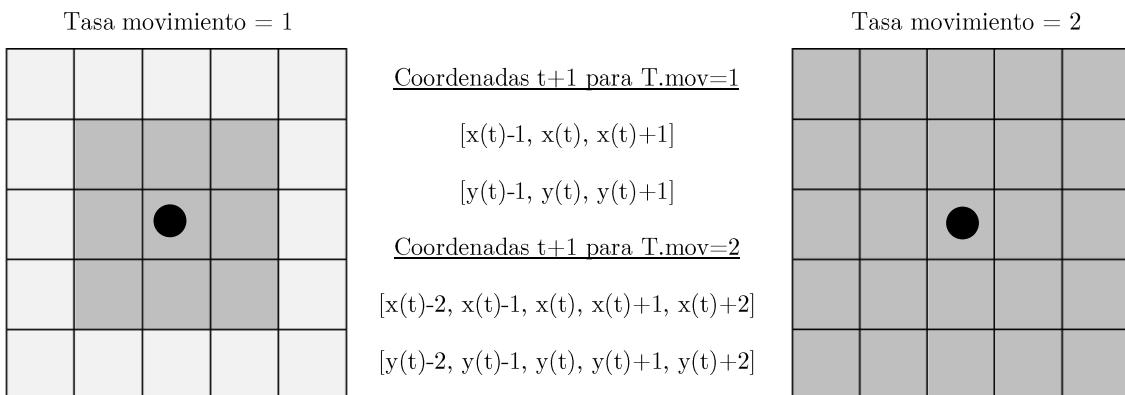
## Función de inicialización

Definimos una clase *agent* como estructura de datos para almacenar los agentes, sus atributos y sus métodos. Con ello, generamos una lista *agents* con tantos agentes como hayamos indicado; a cada uno se le asigna la especie a la que pertenece (definida como un número), la posición espacial (definida aleatoriamente dentro de la malla) y las tasas de movimiento, secreción, reproducción y muerte. Para almacenar los metabolitos del medio (que son bienes comunes, inhibidores y toxinas), se definen *arrays* espaciales que permiten asignar valores a cada celda.

## Función de actualización

Se selecciona un agente aleatorio y se ejecutan una serie de acciones en este orden estricto:

1. Movimiento: el movimiento que se plantea es del tipo *random walk* pues la posición del agente se determina de forma aleatoria dentro del rango definido por la tasa de movimiento. En la *Figura 2* se explica el movimiento de los agentes en mayor detalle. Introducir esta movilidad hace que las colonias no sean completamente estáticas y que el grado de mezcla entre especies sea mayor que el que podríamos observar en un experimento con placas Petri.



**Figura 2.** Movimiento de los agentes. Si su tasa de movimiento es 1, los agentes pueden desplazarse a una casilla aleatoria de las 9 más próximas (incluyendo la suya propia); si su tasa de movimiento es 2, los agentes pueden desplazarse a una casilla aleatoria de las 25 más próximas (incluyendo la suya propia).

2. Secreción: los agentes secretan metabolitos, en la posición espacial donde se encuentran, a una tasa determinada. Hemos considerado que los metabolitos son estáticos -permanecen donde son secretados y no se contempla su degradación- por simplificación.
3. Consumición: los agentes consumen los metabolitos que están en su misma posición si han sido secretados por la especie con que interaccionan. Aunque somos conscientes de que existen metabolitos que estimulan desde el exterior, al activar los receptores de membrana, hemos considerado que los metabolitos se consumen por simplificación.

4. Reproducción y muerte: la reproducción se plantea como la adición de un nuevo objeto a la lista *agents* con las mismas características que el agente del que proviene; la muerte se plantea como su retirada de la lista *agents*. Aunque las tasas de reproducción y muerte son iguales para todos los agentes, la interacción con otros agentes a través de los metabolitos lleva a cambios en las mismas (estos son simplificaciones evidentes de la acción de cada metabolito).
  - Si un agente ha consumido un bien común, su tasa de reproducción se multiplica por 2.
  - Si un agente ha consumido un inhibidor, su tasa de reproducción se divide entre 2.
  - Si un agente ha consumido una toxina, su tasa de muerte se multiplica por 2.

Si la bacteria sobrevive, estos cambios no se acumulan. Se debe tener en cuenta que cada paso temporal equivale a un ciclo de vida -periodo en que una bacteria tiene la posibilidad de morir o reproducirse- luego resulta prudente considerar que, tras este periodo, la bacteria expulsa el metabolito o desarrolla resistencia frente al mismo. La opción contraria, considerar cambios acumulativos, plantea la problemática de definir una dinámica de variación (pues debe existir una concentración saturante a partir de la cual consumir más metabolito ya no tiene efecto).

El crecimiento de los agentes está limitado por una capacidad de carga global que favorece la pugna entre especies: una crece a costa de la otra. Para implementar esto, multiplicamos la tasa de reproducción por un factor que es 1 cuando la población es menor a la capacidad de carga y 0 cuando es igual. Con ello, la población global satura en la capacidad de carga.

Introducir escasez de alimento o secreción guiada por estímulo requiere implementar un código que permita a cada agente encontrar otros agentes en su vecindad. Aunque existen varios algoritmos para ello, usamos la búsqueda exhaustiva. Este es un método sencillo de implementar, aunque no muy eficiente computacionalmente, que calcula la distancia euclídea a cada agente para comprobar si alguno está lo suficientemente cerca como para ser considerado vecino (*Ecuación 1*). Cuando ambos fenómenos se implementan simultáneamente, una forma de optimizar los recursos computacionales es realizar una primera búsqueda con el radio de mayor tamaño y sobre ella una segunda búsqueda con el radio de menor tamaño.

$$[1] \text{ Si Distancia} = ((x_A - x_B)^2 + (y_A - y_B)^2)^{(1/2)} < \text{Radio} \rightarrow A \text{ y } B \text{ son vecinos}$$

Para implementar la escasez, calculamos el número de agentes en el entorno definido por el radio de competición y lo dividimos por el número máximo de agentes (*N.max*), un factor que representa el número de vecinos necesarios para que la tasa de reproducción sea 0. El resultado de la operación se resta a 1 y se multiplica a la tasa de reproducción (*Ecuación 2*). El ritmo al que decrece esta

tasa de reproducción varía de forma directa con el número de vecinos y de forma indirecta con N.max (cuando es pequeño, la tasa decrece rápidamente y esto simula un escenario de mucha escasez; cuando es grande, la tasa decrece lentamente y esto simula un escenario de poca escasez).

$$[2] \text{ Tasa reproducción} = \text{Tasa reproducción} \times (1 - (\text{número de vecinos} / \text{N.max}))$$

Para implementar la secreción guiada por estímulo, determinamos si hay vecinos de la especie con que se interacciona en el entorno definido por el radio de detección ( $R.\det$ ), en cuyo caso se activa la posibilidad de secretar. En sistemas de 4 especies, es importante definir con qué especies se interacciona para determinar cuándo se puede activar la probabilidad de secretar. Bajo la premisa de que un individuo no hace algo si no implica un beneficio, nuestros modelos consideran que las especies cooperativas interaccionan solo con otras especies cooperativas y las especies competitivas interaccionan con cualquier otra especie.

### Función de control del tiempo

En sistemas biológicos, el comportamiento concurre en paralelo para todos los agentes. Los MBA reproducen esto actualizando un agente al azar y repitiendo este proceso el número total de agentes para cada paso temporal. Como nuestros modelos contemplan la posibilidad de que los agentes nazcan o mueran, el número de agentes varía durante la simulación y cada actualización requiere un tiempo distinto (*Sayama, 2015*). Para garantizar que todos los agentes se actualizan de media una vez por cada unidad de tiempo simulada, asumimos que en cada actualización transcurre  $1/n$  de una unidad temporal, siendo  $n$  el número de agentes en el momento de actualizar.

### Función de visualización

Usamos la función `matplotlib.pyplot.plot` para dibujar los agentes y `matplotlib.pyplot.imshow` para colorear la malla espacial según la cantidad de metabolito en cada casilla (antes definimos escalas de color con `matplotlib.colors.LinearSegmentedColormap`).

### Salida de archivos

De cada réplica se obtiene un archivo .txt con la evolución poblacional de las especies, un archivo .txt con las coordenadas espaciales de cada agente al final de la simulación y 3 archivos .png con la distribución espacial de los agentes al principio, mitad y final de la simulación. Para distinguir a qué réplica pertenece cada archivo usamos una notación que incluye el modelo, la combinación de parámetros y el número de la réplica.

## MÉTODOS PARA LA INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los modelos planteados devuelven unos datos en bruto cuya transcendencia depende de nuestra capacidad para extraer información relevante. Es por ello vital diseñar un análisis de los resultados coherente con las cuestiones que queremos resolver. Hemos dividido este análisis en dos bloques: el análisis poblacional y el análisis espacial. Aunque estudian aspectos diferentes de las dinámicas comunitarias, ambas comparan los resultados de las distintas condiciones impuestas a través del barrido de parámetros (lo que permite deducir la relevancia de cada parámetro a varios niveles) y operan con los valores medios de las réplicas (lo que aporta significancia estadística).

### **Análisis poblacional**

*¿Por qué es necesario?* Los sistemas microbianos presentan dinámicas poblacionales variables en función de cómo interactúan entre sí las especies que los componen; en algunos casos existe una lucha por la predominancia mientras que en otros hay coexistencia.

*¿Cómo se implementa?* Para el análisis poblacional de los resultados usamos los archivos .txt con la evolución poblacional de las especies. Su análisis incluye:

- A. Gráficas que comparan la evolución poblacional de las especies durante la simulación así como muestran la evolución poblacional del sistema en su conjunto. Estas gráficas permiten conocer las dinámicas que llevan al sistema a una situación de estacionariedad y determinar cuánto tarda el sistema en alcanzar la capacidad de carga.
- B. Tablas que comparan las proporciones poblacionales de las especies al finalizar la simulación. Las hay de 2 tipos: las que comparan cada especie (especie1 vs especie2 vs especie3 vs especie4) permiten ver cómo varían las relaciones de predominancia entre las mismas; las que comparan las especies ordenadas por su relevancia poblacional (1º especie vs 2º especie vs 3º especie vs 4º especie) permiten identificar las dinámicas características de cada modelo.

## Análisis espacial

¿Por qué es necesario? Los microorganismos no son individuos aislados sino que están inmersos en comunidades. Su capacidad para sobrevivir en entornos cambiantes depende en gran medida de su habilidad para interaccionar con vecinos y este componente social favorece su disposición en estructuras espaciales, donde los individuos parecidos se agrupan juntos.

¿Cómo se implementa? Para el análisis espacial de los resultados usamos los archivos .txt con las coordenadas espaciales de los agentes al finalizar la simulación. Su análisis incluye:

- A. Imágenes que muestran la distribución espacial de los agentes. Permiten ver, cualitativamente, cómo se agrupan los agentes en función de su especie.
- B. Gráficas que muestran la distribución de distancias entre agentes de la misma especie y entre todos los agentes. Usamos funciones de distribución radial, las cuales indican la probabilidad de encontrar un agente a una distancia concreta desde otro agente.

El procedimiento es el siguiente:

1. Se generan vectores para el total y para cada especie con las posibles distancias de nuestro sistema. La malla espacial tiene 100x100 casillas, luego la distancia mínima es 0 -estar en la misma casilla- y la máxima es  $(100^2+100^2)^{1/2} = 141.42$  -estar en esquinas opuestas-. No incluimos todas las distancias posibles porque son demasiadas y cada una de ellas tendría una representación muy pequeña; en su lugar, construimos un vector que va desde 0 hasta 141 y que permitirá agrupar las distancias en bloques de una unidad espacial.
2. Para cada agente, se calcula la distancia al resto de agentes del sistema y de su especie, sumando 1 a cada elemento del vector que coincide con esta distancia.
3. Se itera sobre todos los agentes de una réplica y se obtienen, de cada réplica, las frecuencias absolutas asociadas a cada distancia.
4. Se suman los vectores de las distintas réplicas y se obtienen, de cada combinación de parámetros, las frecuencias absolutas asociadas a cada distancia.
5. Se divide cada vector por el número de medidas y se obtienen, de cada combinación de parámetros, las frecuencias relativas asociadas a cada distancia.
6. Se representan los vectores en una gráfica conjunta.

Estas gráficas permiten comparar los grados de agrupación de cada especie con el grado de agrupación total; esto puede ser indicativo de si las especies se mezclan (esperaríamos que las curvas de cada especie y del total coincidieran) o segregan entre sí (esperaríamos que las curvas de cada especie estuvieran desplazadas a la izquierda respecto de las curvas del total).

- C. Tablas que incluyen los parámetros obtenidos por DBSCAN. Este es un método de *clustering* basado en densidad que considera que dentro de cada *cluster* hay una densidad de agentes mayor que fuera de los mismos, de modo que los *clusters* son áreas de densidad alta separadas por áreas de densidad baja (*Ester et al, 1996*). Requiere introducir dos parámetros: radio de vecindad (R) y número mínimo de puntos (NMP).

Su forma de operar es la siguiente:

1. Se localizan los agentes núcleo (aquellos cuya vecindad tiene un n° de agentes  $\geq$  NMP).
2. Se unen en el mismo *cluster* agentes núcleo que se incluyan mutuamente en su vecindad.
3. Se localizan los agentes borde (aquellos cuya vecindad tiene un n° de agentes  $<$ NMP pero incluye al menos un agente núcleo). Si los agentes núcleo son de un *cluster*, se asigna el agente borde a este *cluster*; si son de distintos clusters, se asigna al descubierto primero.
4. Los agentes que no pertenecen a ningún *cluster* se definen como ruido.

Las ventajas de utilizar este método frente a otros como, por ejemplo, los métodos de partición o los métodos jerárquicos vienen reflejadas en la *Tabla 2*.

**Tabla 2.** Comparación entre DBSCAN y otros métodos de *clustering* en lo relativo a los parámetros de entrada, la forma de los *clusters* y el ruido.

	Método basado en densidad (DBSCAN)	Otros métodos
Parámetros de entrada	R y NMP	Número de <i>clusters</i>
Ventaja: no podemos conocer <i>a priori</i> el número de <i>clusters</i> que conforman un sistema y los métodos que determinan su óptimo son difíciles de automatizar; en cambio, si podemos tener cierto criterio para definir R y NMP en base al aspecto que adoptan las colonias.		
Forma de los <i>clusters</i>	Arbitraria	Convexa
Ventaja: las comunidades microbianas no tienen por qué adoptar formas convexas.		
Ruido	Si	No
Ventaja: la incorporación de ruido permite considerar la posibilidad de que algunos agentes no pertenecen a un <i>cluster</i> ; esto nos interesa pues queremos que solo las agrupaciones con una densidad superior a lo normal sean reconocidas como colonias.		

Para implementar este método de *clustering* hemos usado *Scikit-learn* (*Pedregosa et al, 2011*), una biblioteca de paquetes para *Python* que permite la minería y análisis de datos por técnicas de aprendizaje automático. El algoritmo DBSCAN se aplica sobre un archivo de coordenadas con el comando:  $DBSCAN(eps=R, min\_samples=NMP).fit(coordenadas)$ . En nuestro análisis consideramos  $R=10$ ,  $NMP=25$  en sistemas de 2 especies y  $R=10$ ,  $NMP=20$  en sistemas de 4 especies. En ambos casos, el espacio definido por  $R$  supone  $\sim 3\%$  del espacio total y el número de agentes definido por  $NMP$  supone  $\sim 3\%$  del número de agentes total (debemos recordar que en sistemas de 2 especies la capacidad de carga son 800 agentes mientras que en sistemas de 4 especies la capacidad de carga son 600 agentes).

Una vez definidos los *clusters*, estudiamos los siguientes parámetros:

- Coeficiente de ocupación: tamaño medio de los *clusters* en términos relativos.
- Coeficiente de ruido: proporción de los agentes que son ruido.
- Coeficiente de homogeneidad: proporción de la especie mayoritaria en cada *cluster*.

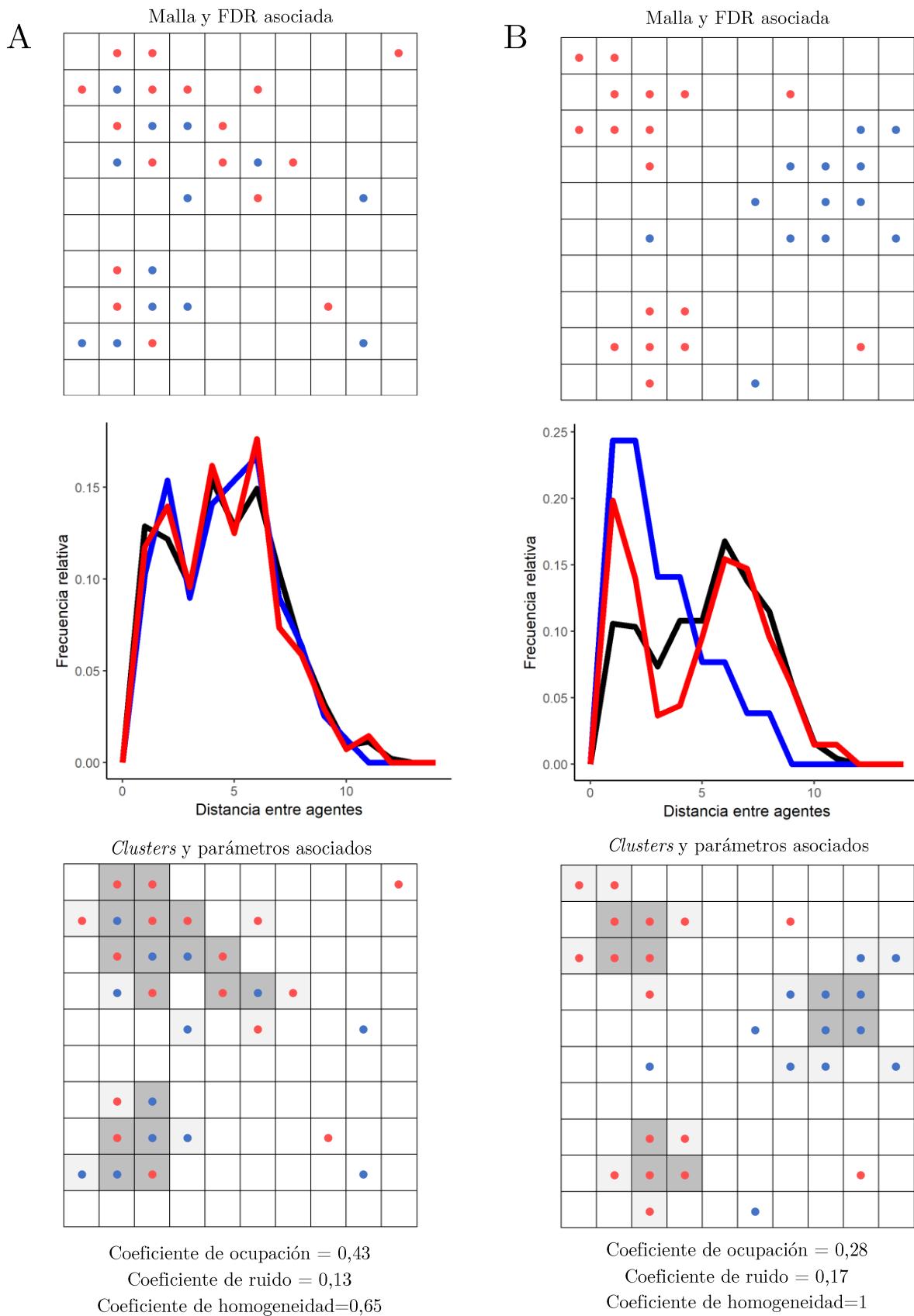
Estos parámetros permiten estudiar la disposición de los agentes en colonias; concretamente, permiten conocer la variación, en tamaño y composición, de dichas colonias en función de las interacciones y de las condiciones impuestas en el modelo.

En la *Figura 3* se muestra cómo se implementan las funciones de distribución radial y el algoritmo DBSCAN sobre una disposición sencilla de agentes en coordenadas.

### **Comprobación de estacionariedad**

Muchos de nuestros análisis se realizan sobre el instante final de cada simulación. Planteamos esto así porque consideramos que este instante refleja cómo ha evolucionado el sistema hasta llegar a un estado estacionario, que es el que estudiamos. Para confirmar esto, y poder validar los análisis realizados, es necesario plantear una comprobación de estacionariedad. El procedimiento es:

1. Calculamos la media poblacional del 10% final de la simulación (últimos 100 pasos en sistemas de 2 especies, 200 pasos en sistemas de 4 especies) y asumimos que es el estado estacionario.
2. Generamos gráficas con la diferencia poblacional entre cada paso temporal y este valor medio.
3. Si el sistema alcanza la estabilidad, se espera que las curvas converjan hacia el 0.



**Figura 3.** Ejemplo de implementación de FDR y DBSCAN. Se consideran 30 agentes dispuestos sobre una malla bidimensional de 10x10. Para implementar las FDR, se calculan las distancias entre todos los agentes. Para determinar los clusters, se consideran valores de  $R=1,5$  (incluye las 8 casillas alrededor de cada agente) y  $NMP=4$  (todo agente con la mitad de estas casillas ocupadas es agente núcleo); los agentes núcleo aparecen sombreados en oscuro, los agentes borde sombreados en claro y los agentes que forman parte del ruido no se sombrean. En la Figura 3.A los agentes de distintas especies se mezclan entre sí; esto genera curvas de cada especie y del total que coinciden y coeficientes de homogeneidad cercanos a 0,5. En la Figura 3.B los agentes de distintas especies segregan entre sí; esto genera curvas de cada especie y del total que no coincidan (las primeras se desplazan a la izquierda) y coeficientes de homogeneidad cercanos a 1.

## **CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1<sup>ER</sup> EXPERIMENTO**

En este experimento trabajamos con modelos simples en que ambas especies se relacionan por un mismo tipo de interacción, ya sea esta competitiva o cooperativa. En este contexto, nos centramos en analizar las consecuencias de modificar parámetros como el porcentaje inicial de cada especie, la tasa de secreción o la tasa de movimiento.

#### Análisis poblacional

Las tablas que comparan las proporciones poblaciones de las especies ordenadas por su relevancia nos permiten ser conscientes de una diferencia clara en lo relativo a las dinámicas propias de cada modelo. En los modelos competitivos, tanto si la relación es de inhibición como de toxicidad, se puede observar que en todas las simulaciones existe una especie claramente predominante sobre otra (80-100% frente a 0-20%); en modelos cooperativos esto no sucede (50-60% frente a 40-50%).

La lectura que sacamos es que las especies competitivas no necesitan del resto para prosperar (pues la presencia de otra especie lleva a un ambiente hostil) mientras que las especies cooperativas sí presentan esta dependencia (pues la presencia de otra especie conduce a un ambiente favorable).

Por ello, una especie que tenga cierta ventaja poblacional va a intentar mantenerla en dinámicas competitivas, pero va a buscar un equilibrio con el resto de especies en dinámicas cooperativas.

Las tablas que comparan las proporciones poblacionales de cada especie nos permiten ver cómo varían las relaciones de predominancia en función de las condiciones impuestas en el modelo. En la *Tabla 3* se indica, de forma esquemática, la relevancia y el efecto asociado a cada parámetro.

**Tabla 3.** Relevancia y efecto de varios parámetros (proporción inicial, tasa de secreción, tasa de movimiento) en los modelos competitivos, tanto si la relación es de inhibición como de toxicidad, y cooperativos.

Parámetro	Modelos competición		Modelo cooperación	
	Relevancia	Efecto	Relevancia	Efecto
Proporción inicial	Alta	Positivo	Nula	-
Tasa de secreción	Media	Positivo	Media	Negativo
Tasa de movimiento	Baja	Negativo	Nula	-

En modelos competitivos, observamos los siguientes efectos. Cuanto mayor es la proporción inicial de una especie, mayor es su probabilidad de predominancia (*An.est.1*). Esto es así porque empezar con un número mayor de agentes permite saturar el medio de sustancias perjudiciales para la otra especie, dificultando su crecimiento. Varios estudios ya habían asociado este fenómeno a modelos de competición por injerencia (*Hibbing et al, 2010*). Cuanto mayor es la tasa de secreción de una especie, mayor es su probabilidad de predominancia (*An.est.2*). Esto es así porque una capacidad de secreción mayor permite saturar el medio de sustancias perjudiciales para la otra especie, dificultando su crecimiento. Cuanto mayor es la tasa de movimiento de una especie, menor es su probabilidad de predominancia (*An.est.3*). Esto es así porque, en ambientes cargados de sustancias perjudiciales, la movilización hacia nuevos territorios puede castigarse. De esta forma, la viabilidad de agentes que se mueven poco y optan por agruparse es mayor que la de agentes que se mueven mucho. Hay que tener en cuenta que estos modelos no contemplan limitación de alimento a nivel local, luego un agente que se mueva poco no agota su alimento localmente; con ello, desaparece un factor negativo asociado a moverse poco que podría revertir el efecto explicado anteriormente. En la *Figura 4.A* se ilustra el efecto asociado al primer factor mientras que en la *Figura 4.B* se ilustra el efecto asociado a los otros dos factores.

En modelos cooperativos, observamos los siguientes efectos. Independientemente de la proporción inicial de cada especie, ambas acaban coexistiendo (*An.est.1*). Esto se explica porque si una especie está por encima en términos poblacionales, produce mayor cantidad de bien común, favoreciendo el crecimiento de la otra especie y permitiendo que se igualen. Cuanto mayor es la tasa de secreción de una especie, menor es su relevancia poblacional (*An.est.2*). Esto es así porque una capacidad de secreción mayor permite saturar el medio de sustancias beneficiosas para la otra especie, que se mantiene por encima a nivel poblacional. Independientemente de la tasa de movimiento de cada especie, ambas acaban coexistiendo (*An.est.3*). Se podría pensar que mayores tasas de movimiento alejan a los agentes de las agrupaciones -donde se secreta mayoritariamente el bien común- y que esto tiene una repercusión negativa en su crecimiento; sin embargo, como lo que perjudica a una especie perjudica a la otra, ambas se equilibran. En la *Figura 4.C* se ilustra el efecto asociado al primer factor mientras que en la *Figura 4.D* se ilustra el efecto asociado al segundo factor.

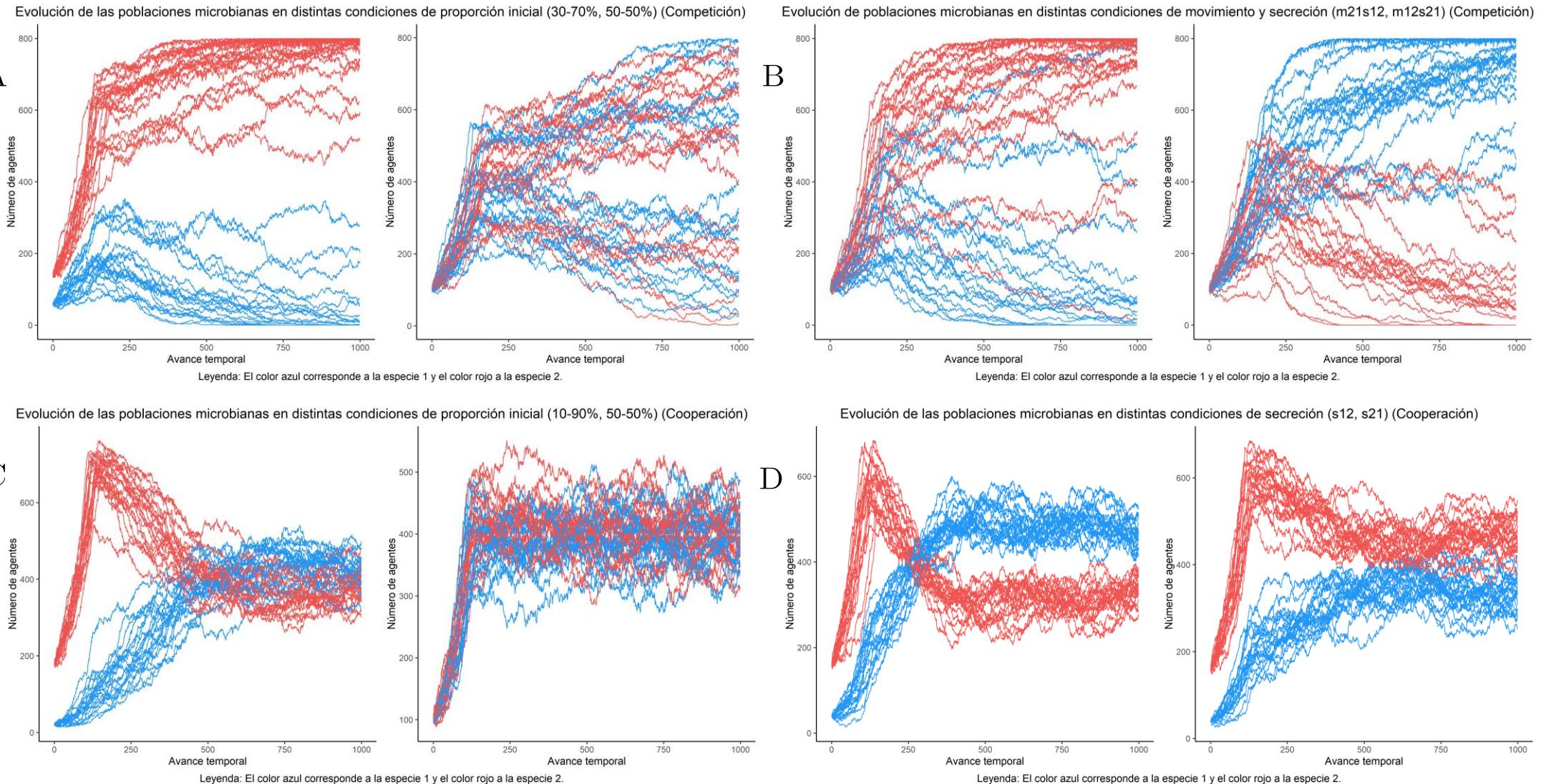
### Análisis espacial

Las imágenes con la distribución espacial de los agentes nos permiten identificar diferencias en su agrupación en función del modelo. En los modelos competitivos, tanto si la relación es de inhibición

como de toxicidad, los agentes forman agrupaciones con otros de su misma especie. En los modelos cooperativos, los agentes forman agrupaciones con los de distinta especie. El efecto de segregación observado en las dinámicas competitivas parece coherente con lo que sucede a nivel experimental. El efecto de mezcla observado en las dinámicas cooperativas aparece a nivel experimental solo cuando la relación entre las especies reporta un beneficio notable o cuando las especies microbianas tienen una movilidad considerable; en la mayoría de los casos, sin embargo, las colonias de especies distintas permanecen unas junto a otras pero sin llegar a mezclarse. En la *Figura 5.A* se muestran ejemplos representativos de las distribuciones espaciales obtenidas.

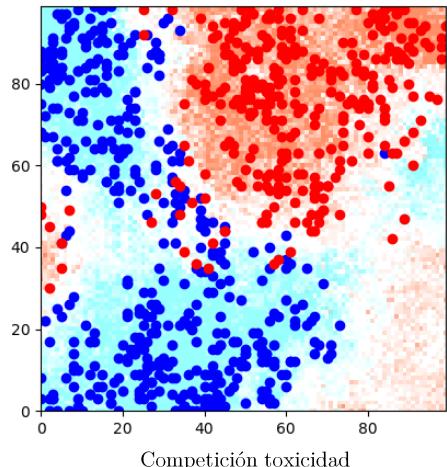
Las gráficas que muestran la distribución de distancias entre agentes nos permiten verificar la diferencia ya comentada. En los modelos competitivos, las especies segregan entre sí, hay un mayor agrupamiento intraespecie y esto lleva a que las curvas de cada especie se desplacen a la izquierda respecto de las curvas del total. En los modelos cooperativos, las especies se mezclan entre sí, los agrupamientos intraespecie e interespecie son iguales y esto lleva a que las curvas de cada especie coincidan con las curvas del total. En la *Figura 5.B* se muestran ejemplos representativos. Un fenómeno interesante que revela este análisis es que el grado de agrupamiento disminuye a medida que aumenta la tasa de movimiento de los agentes, lo que se ilustra con la *Figura 5.C*. Esto, que parece cumplirse cuando el movimiento es aleatorio, podría no darse si fuera guiado, como sucede con muchas especies microbianas que se mueven por quimiotaxis (*Hibbing et al, 2010*).

Las tablas que incluyen parámetros del *clustering* nos permiten evidenciar, de nuevo, la diferencia comentada. En los modelos competitivos, las especies segregan entre sí; esto hace que los *clusters* estén formados por agentes de la misma especie y deriva en coeficientes de homogeneidad cercanos a 1 -siendo algo mayores en la relación de toxicidad pues se trata de una interacción más agresiva (*An.est.4*). En los modelos cooperativos las especies se mezclan entre sí; esto hace que los *clusters* estén formados por agentes de ambas especies y deriva en coeficientes de homogeneidad cercanos a 0,5 -siendo algo menores cuando la tasa de secreción de ambas especies es igual pues solo esta condición favorece una coexistencia equitativa (*An.est.5*). Esta diferencia explica que los modelos cooperativos tengan *clusters* de mayor tamaño (*An.est.6*). El coeficiente de ruido, que se mantiene sobre 0,1, incrementa al aumentar la tasa de movimiento de los agentes (*An.est.7*); resulta lógico que esto se corresponda con una disminución en la agrupación del sistema.

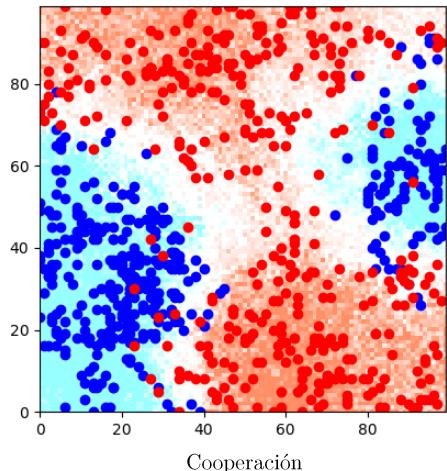


**Figura 4.** Evolución poblacional en modelos competitivos y cooperativos. En la Figura 4.A se compara la evolución poblacional de dos simulaciones de un modelo competitivo para las que varía la proporción inicial de cada especie. En el primer caso, la proporción inicial es de 30%-70%, lo que lleva a que la especie 2 acabe predominando; en el segundo caso, es de 50%-50%, lo que favorece que una u otra especie pueda predominar. En la Figura 4.B se compara la evolución poblacional de dos simulaciones de un modelo competitivo para las que varía la tasa de movimiento y secreción de cada especie. En el primer caso, las tasas de movimiento son 2-1 y las de secreción 1-2, lo que lleva a que la especie 2 acabe predominando; en el segundo caso, se invierten y esto lleva a lo contrario. En la Figura 4.C se compara la evolución poblacional de dos simulaciones del modelo cooperativo para las que varía la proporción inicial de cada especie. En el primer caso, la proporción inicial es de 10%-90% mientras que en el segundo caso es de 50%-50%; puede verse que esto no tiene relevancia alguna pues ambas especies acaban coexistingo. En la Figura 4.D se compara la evolución poblacional de dos simulaciones del modelo cooperativo para las que varía la tasa de secreción. En el primero caso, las tasas de secreción son 1-2, lo que lleva a que la especie 1 tenga mayor relevancia poblacional; en el segundo caso las tasas de secreción son 2-1, lo que lleva a lo contrario. Una diferencia notable es que en las dinámicas competitivas una especie tiende a ocupar toda la capacidad poblacional disponible mientras que en las dinámicas cooperativas ambas especies coexisten y mantienen un cierto equilibrio.

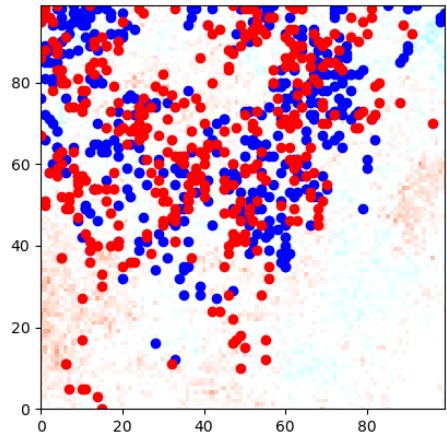
Competición inhibición



Competición toxicidad

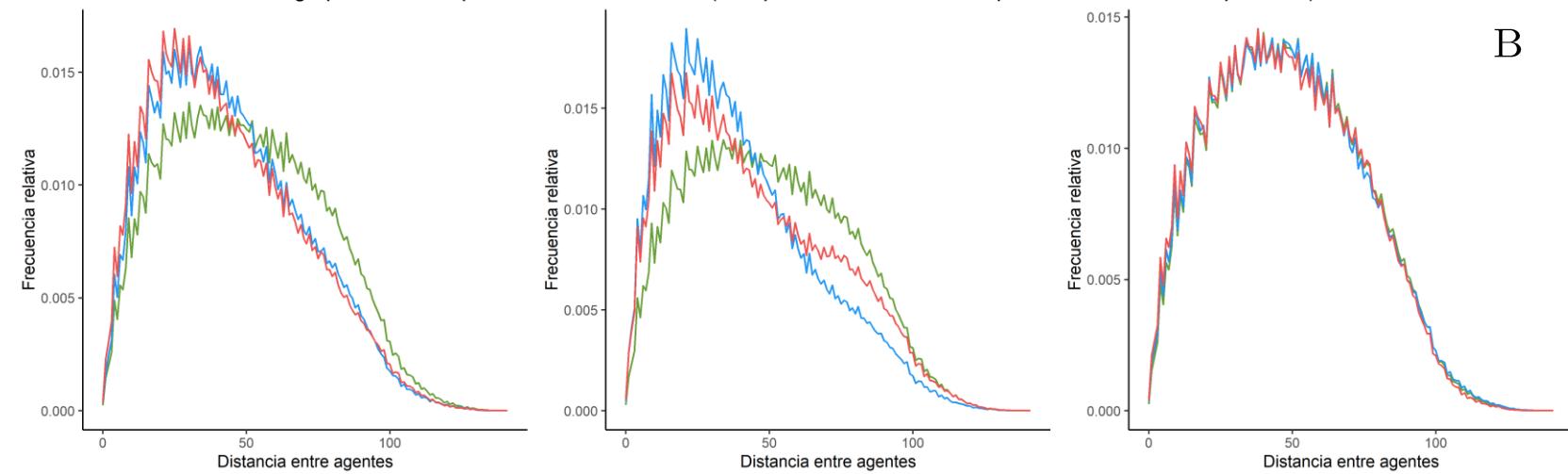


Cooperación



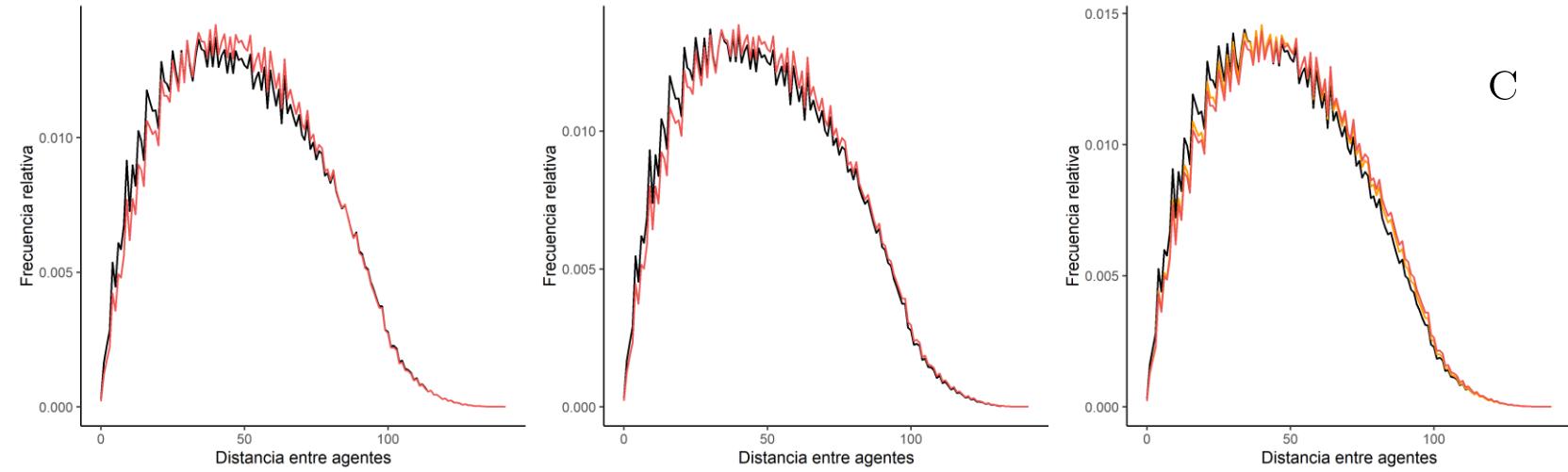
A

Agrupación de las poblaciones microbianas (Competición Inhibición, Competición Toxicidad, Cooperación)



Leyenda: El color verde corresponde a la población total, el color azul a la población de la especie 1 y el color rojo a la población de la especie 2.

Agrupación total de las poblaciones microbianas en función de la tasa de movimiento (Competición Inhibición, Competición Toxicidad, Cooperación)



Leyenda: El color negro corresponde a una tasa de movimiento 1-1, el color naranja a una tasa de movimiento 2-1 y el color rojo a una tasa de movimiento 1-2.

B

C

**Figura 5.** Agrupación espacial en modelos competitivos y cooperativos. En la Figura 5.A se muestran 3 ejemplos de la distribución espacial de los agentes una vez finalizadas las simulaciones; en los modelos competitivos se observa claramente la segregación entre especies mientras que en modelos cooperativos se aprecia como las especies se mezclan entre sí. En la Figura 5.B se muestran 3 ejemplos de gráficas con la distribución de distancias entre agentes; en los modelos competitivos se refleja el mayor nivel de agrupación intraespecie mientras que en los modelos cooperativos la agrupación intraespecie e interespecie coinciden. En la Figura 5.C se muestra como varía la agrupación total de los sistemas en función de la tasa de movimiento de las especies; si bien es cierto que la variación parece pequeña, se trata de un fenómeno a tener en cuenta pues se repite para todos los modelos y condiciones impuestas.

## 2º EXPERIMENTO

En este experimento estudiamos el efecto de añadir, sobre los modelos y barridos de parámetros ya planteados, factores como la escasez de alimento a nivel local y la secreción guiada por estímulo. Lo primero lo planteamos porque, pese a ser atípico en el mundo microbiano, resulta interesante ver el efecto que tiene en la agrupación espacial. Lo segundo lo planteamos bajo la premisa de que el ahorro energético es una máxima en el mundo microbiano; como las bacterias no producen nada que les haga gastar energía innecesariamente, tiene sentido considerar que secretan metabolitos solo cuando sienten la presencia de otra especie.

### Análisis poblacional tras introducir la escasez de alimento a nivel local

Las tablas que comparan las proporciones poblacionales de cada especie nos permiten constatar que, cuanto mayor es la tasa de movimiento de una especie, más fácilmente predomina, lo que viene ilustrado en la *Figura 6.A*. El hecho de que el movimiento pase a ser un factor positivo se explica porque, al incorporar limitación de alimento a nivel local, permanecer agrupado con otros agentes se torna perjudicial. Varios estudios sobre la evolución de la movilidad bacteriana aportan conclusiones en la misma línea (*Be'er y Ariel, 2019*). Este efecto se observa esencialmente en los modelos competitivos; no es tan claro en los modelos cooperativos y parece probable que sea la secreción de bienes comunes la que minimiza el efecto negativo asociado a la agrupación (*An.est.8*). Otra cuestión a resaltar es que, al introducir un factor que disminuye la tasa de crecimiento, se tarda más en alcanzar la capacidad de carga, lo que viene ilustrado en la *Figura 6.B*. Este efecto se observa únicamente en los modelos competitivos pues las células que cooperan son capaces de mantener una velocidad de crecimiento alta por el consumo de bienes comunes.

### Análisis espacial tras introducir la escasez de alimento a nivel local

Las gráficas que muestran la distribución de distancias entre agentes nos permiten confirmar algo que ya sospechábamos y es que la introducción de escasez lleva a un grado de agrupamiento menor, como se muestra en la *Figura 7.B*. Sin embargo, no parece haber una variación significativa entre distintos valores de escasez, lo que podría explicarse porque existe un umbral a partir del cual aumentar la escasez no repercute en la agrupación pero sí en las dinámicas poblacionales. Las tablas que incluyen parámetros del *clustering* nos permiten verificar la disminución en el grado de agrupación por una disminución en el tamaño de los *clusters* (*An.est.9*).

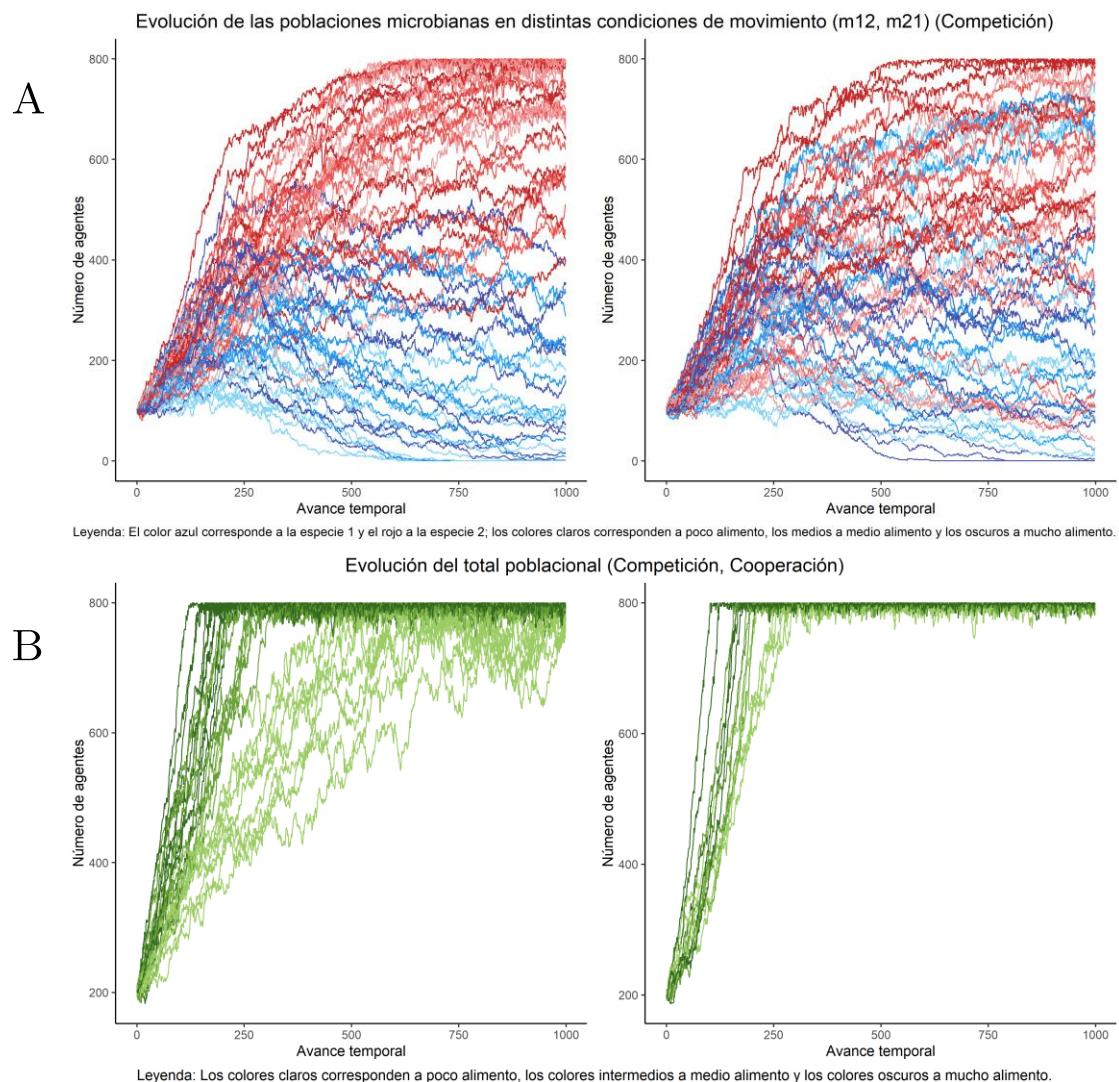
### Análisis poblacional tras introducir la secreción guiada por estímulo

Las tablas que comparan las proporciones poblacionales de cada especie nos permiten rechazar un efecto que esperábamos ver en modelos competitivos. Pensábamos que, al haber menos metabolitos

en el medio, podía salir rentable invadir territorios, de forma que el efecto negativo de la tasa de movimiento dejaría de serlo. No se observa (*An.est.10*) y puede ser porque los agentes ejercen una defensa efectiva, secretando sustancias que perjudican al invasor únicamente cuando se acerca.

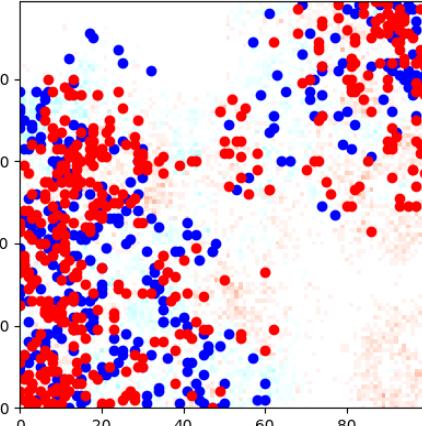
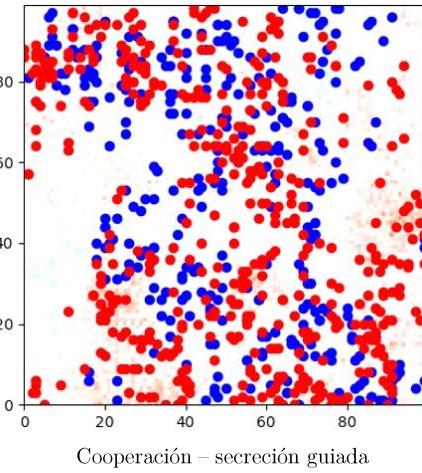
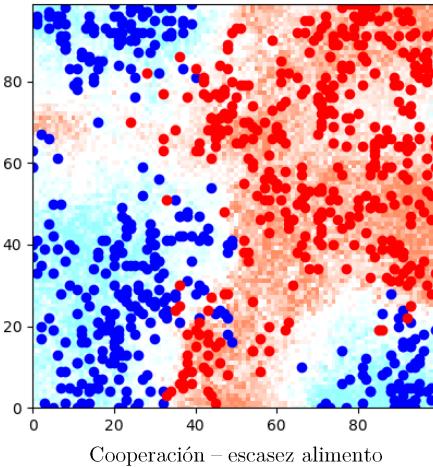
#### Análisis espacial tras introducir la secreción guiada por estímulo

Las gráficas que muestran la distribución de distancias entre agentes nos permiten ver cómo la incorporación de secreción guiada conduce a un mayor agrupamiento en el modelo cooperativo, lo que se ilustra en la *Figura 7.C*. Las tablas con parámetros del *clustering* verifican esto a través de un aumento en el tamaño de los *clusters* (*An.est.11*). Este fenómeno aparece solo en cooperación porque los *clusters* incluyen agentes de ambas especies; tiene un efecto congregador porque si los agentes solo secretan en presencia de otra especie, agruparse mejora el acceso a bienes comunes.



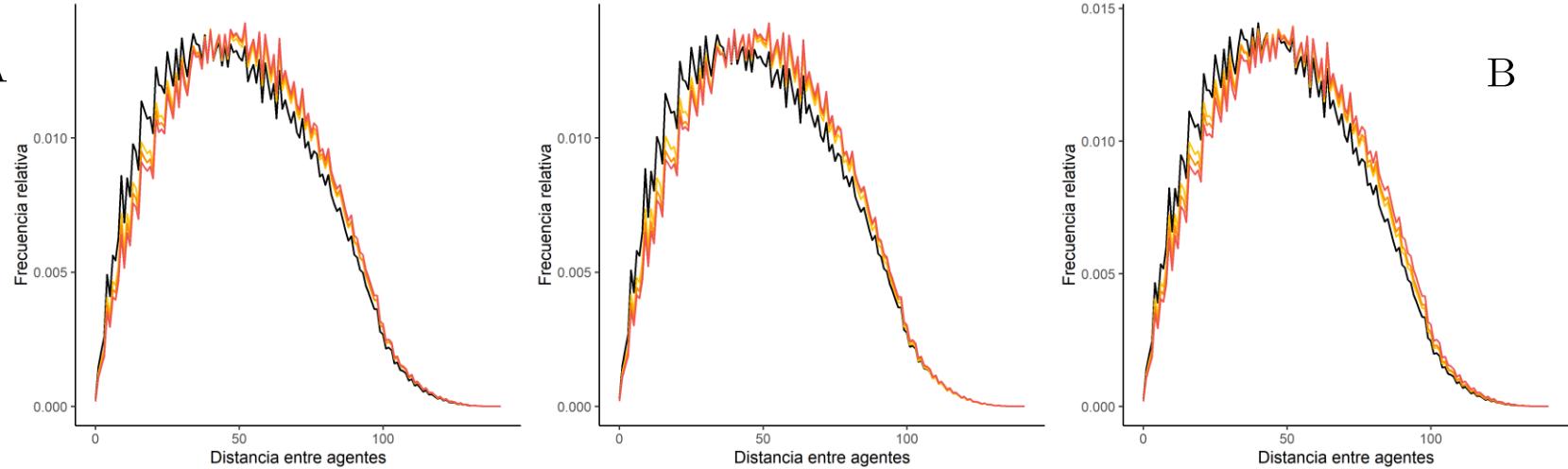
**Figura 6.** Evolución poblacional en modelos competitivos y cooperativos con escasez. En la Figura 6.A se compara la evolución poblacional de dos simulaciones de un modelo competitivo para las que varía la tasa de movimiento. En el primer caso, las tasas de movimiento son 1-2, lo que lleva a que la especie 2 predomine; en el segundo caso, se invierte y aumenta la probabilidad de predominancia de la especie 1. En la Figura 6.B se compara la evolución del total poblacional de dos simulaciones para las que varía el modelo de interacción. En competición, la secreción de inhibidores dificulta el crecimiento de los agentes, luego introducir otro factor perjudicial como la escasez lleva a que se tarde más en alcanzar la capacidad de carga (siendo este retraso proporcional al nivel de escasez). En cooperación, la secreción de bienes comunes favorece el crecimiento de los agentes y esto parece ser capaz de contrarrestar el efecto negativo introducido por la escasez.

Competición inhibición – escasez



Agrupación total de las poblaciones microbianas en función de la cantidad de alimento (Competición Inhibición, Competición Toxicidad, Cooperación)

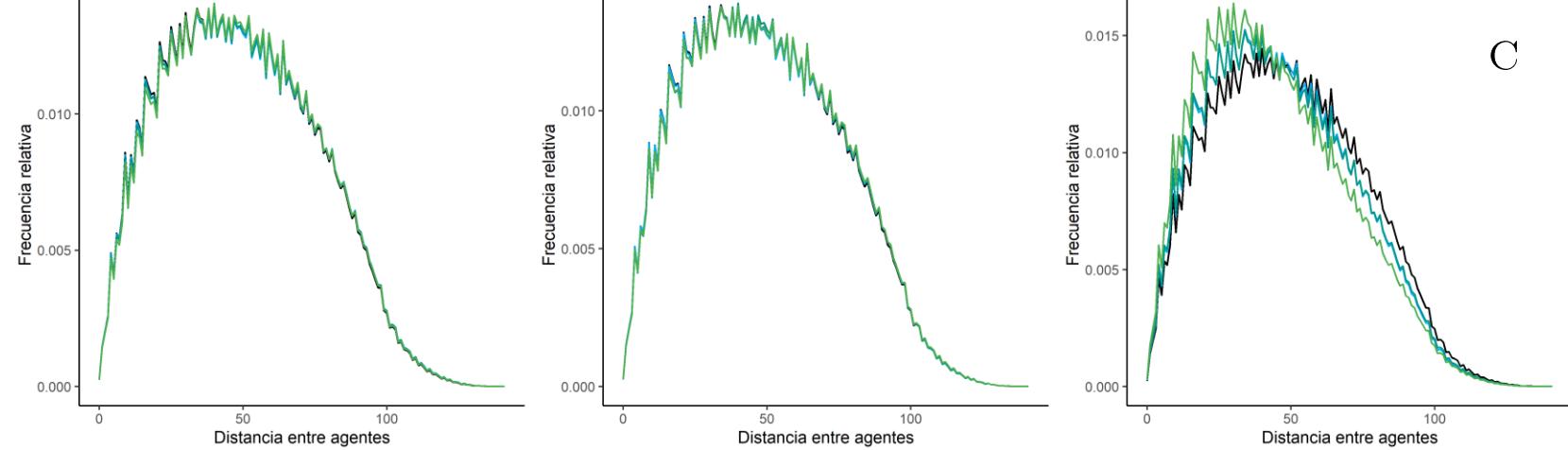
A



Leyenda: El color negro corresponde a no contemplar escasez; el color amarillo corresponde a mucho alimento, el color naranja a medio alimento y el color rojo a poco alimento.

Agrupación total de las poblaciones microbianas en función del radio de detección (Competición Inhibición, Competición Toxicidad, Cooperación)

C



Leyenda: El color negro corresponde a no contemplar secreción guiada por estímulo; el color azul a un radio de detección grande, el azul verdoso a uno medio y el verde a uno pequeño.

**Figura 7.** Agrupación espacial en modelos competitivos y cooperativos con escasez y secreción guiada. En la Figura 7.A se dan 3 ejemplos de la distribución espacial de los agentes una vez finalizadas las simulaciones; una diferencia clara a nivel de dispersión es la que se observa en cooperación entre considerar escasez y secreción guiada por estímulo. En la Figura 7.B se muestra cómo varía la agrupación total en función de la cantidad de alimento disponible; parece que la escasez disminuye el grado de agrupación, aunque no hay grandes diferencias entre distintos niveles de alimento. En la Figura 7.C se muestra cómo varía la agrupación total en función del radio de detección; solo en cooperación se da un aumento del grado de agrupación al disminuir el radio de detección.

## 3<sup>ER</sup> EXPERIMENTO

Hasta el momento, los modelos han generado resultados coherentes con las dinámicas y condiciones impuestas; prueba de ello es que hemos podido dar explicación biológica a los fenómenos descritos. En este experimento estudiamos las consecuencias de plantear sistemas con mayor complejidad al aumentar el número de especies a 4 o contemplar la coexistencia de interacciones. Esto último nos permitirá estudiar la predominancia de una u otra interacción en distintas condiciones de escasez.

### Análisis poblacional de los modelos con un solo tipo de interacción

Las tablas que comparan las proporciones poblaciones de las especies ordenadas por su relevancia nos permiten corroborar las diferencias ya indicadas en las dinámicas propias de cada modelo. En los modelos competitivos, los porcentajes (60%, 30%, 10%, 0%) reflejan un hecho interesante y es que las 2 especies mayoritarias acaparan la práctica totalidad de la capacidad de carga. En los modelos competitivos, los porcentajes (40%, 30%, 20%, 10%) muestran un reparto más equitativo. Estos modelos no manifiestan cambios de dinámica poblacional al variar las condiciones de escasez y secreción guiada; por ello, cualquier variación en los modelos con varios tipos de interacción se podrá explicar exclusivamente por el hecho de que hay especies interactuando de manera distinta.

### Análisis espacial de los modelos con un solo tipo de interacción

Las gráficas que muestran la distribución de distancias entre agentes revelan diferencias entre el agrupamiento intraespecie e interespecie tanto en modelos competitivos como en cooperativos, lo que se muestra en la *Figura 8.B*. Ello evidencia que sigue existiendo segregación entre las especies competitivas y que no todas las especies cooperativas comparten los *clusters*. Este análisis, además, permite descartar un menor agrupamiento al aumentar la complejidad del sistema; en efecto, la comparación entre modelos de 2 y 4 especies de la *Figura 8.C* demuestra que la agrupación no se altera. Al igual que en el experimento anterior, aumenta la agrupación al incrementar la cantidad de alimento y disminuir el radio de detección (en cooperación).

Las tablas que incluyen parámetros del *clustering* confirman que los *clusters* tienen mayor tamaño al aumentar la cantidad de alimento (*An.est.12*) y disminuir el radio de detección (en cooperación) (*An.est.13*). En estos sistemas, conviene estudiar las proporciones de todas las especies dentro de cada *cluster* en vez del coeficiente de homogeneidad. En modelos cooperativos, una especie aporta

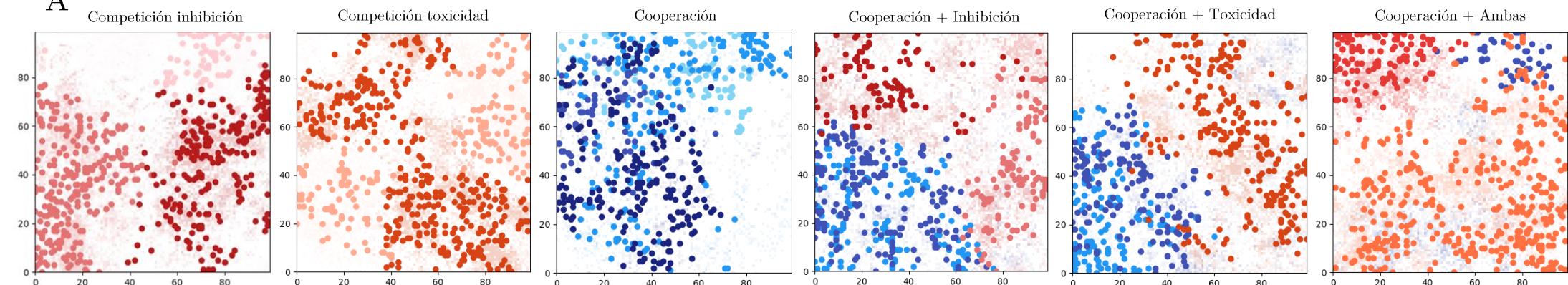
la mitad y el resto se reparte entre varias. En modelos competitivos la especie mayoritaria aporta el 75-85% en inhibición y el 80-90% en toxicidad; esto evidencia que la toxicidad es más agresiva y que las especies competitivas mantienen su capacidad de segregación en sistemas complejos.

#### Análisis poblacional de los modelos con varios tipos de interacciones

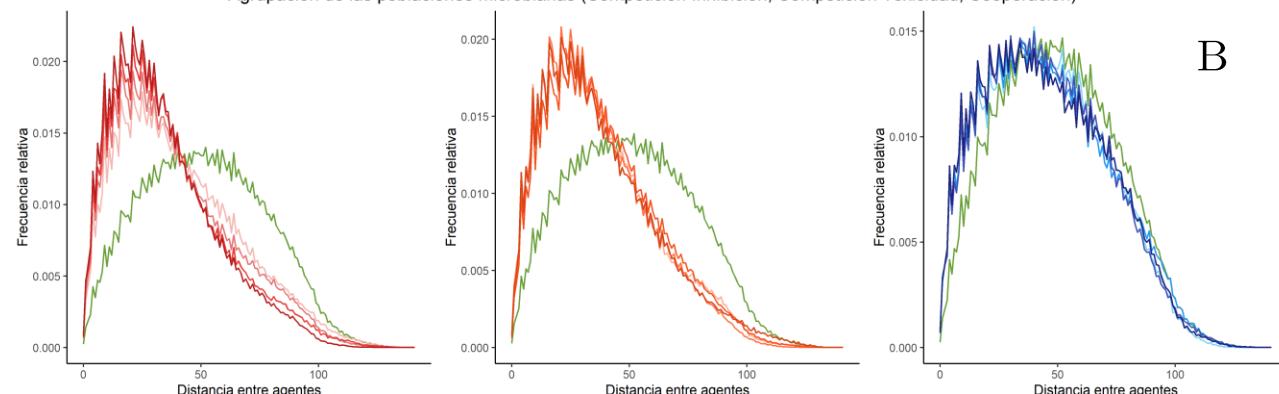
Las tablas que comparan las proporciones poblaciones de las especies ordenadas por su relevancia reiteran algo ya asumido: que los porcentajes poblacionales de especies competitivas son dispares (85% frente a 15%), mientras que los de especies cooperativas son parecidos (60% frente a 40%).

Las tablas que comparan las proporciones poblaciones de cada especie desvelan cómo se relacionan unas interacciones con otras, siempre de acuerdo a nuestros modelos. Por un lado, arrojan nuevas evidencias sobre el hecho de que la toxicidad es una interacción más agresiva que la inhibición; no solo porque es la interacción predominante cuando convive con la inhibición (*An.est.14*), sino porque disminuye la relevancia poblacional de las especies cooperadoras con más efectividad (*An.est.15*). Por otro lado, desvelan que aumentar la cantidad de alimento disponible y el radio de detección favorece a las dinámicas cooperativas (*An.est.16, An.est.17*), lo que aparece ilustrado en la *Figura 8.D*. De haber considerado solo el primer factor, habríamos planteado como hipótesis que las dinámicas cooperativas se benefician de las condiciones que favorecen el agrupamiento, lo que viene dado por un aumento en la cantidad de alimento. Sin embargo, considerar el segundo factor echa por tierra una argumentación de este tipo pues lo que favorece la agrupación de las especies cooperativas es precisamente disminuir el radio de detección, no aumentarlo. Ambos factores comparten el hecho de que aumentan la carga de metabolitos en el medio (uno porque permite un crecimiento más rápido de los agentes, luego el sistema tiene mayor saturación, y otro porque aumenta la probabilidad de secretar); es posible que esto explique las dinámicas obtenidas. En esta línea, hay estudios que demuestran que la tasa de crecimiento baja con la densidad en poblaciones competitivas por la acumulación de metabolitos perjudiciales, mientras que sube en poblaciones cooperativas por la acumulación de metabolitos beneficiosos (*Friedman y Gore, 2016*). Sin embargo, plantear que en sistemas mixtos ocurre algo parecido supone ir un paso más allá y serían necesarios experimentos más dirigidos para contrastar esta hipótesis. En cualquier caso, los resultados obtenidos con nuestros modelos son consistentes con los primeros resultados que arrojan los experimentos planteados por el Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal. Estos confirman que la escasez intensifica la lucha entre especies (dominan las dinámicas competitivas) mientras que la abundancia favorece la convivencia (dominan las dinámicas cooperativas).

A

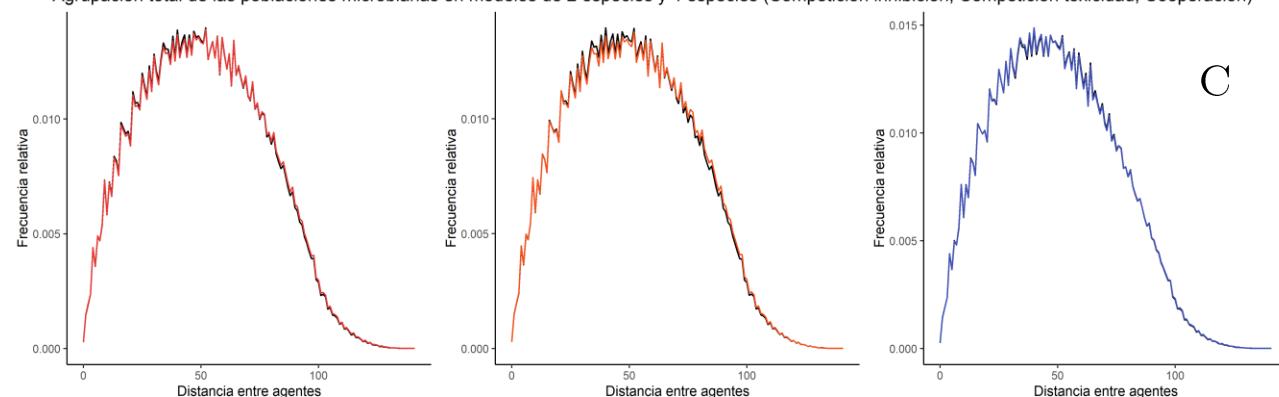


Agrupación de las poblaciones microbianas (Competición Inhibición, Competición Toxicidad, Cooperación)



Leyenda: El color verde corresponde a la población total; el color rojo, naranja y azul corresponde a las especies de cada modelo, diferenciadas por su tonalidad.

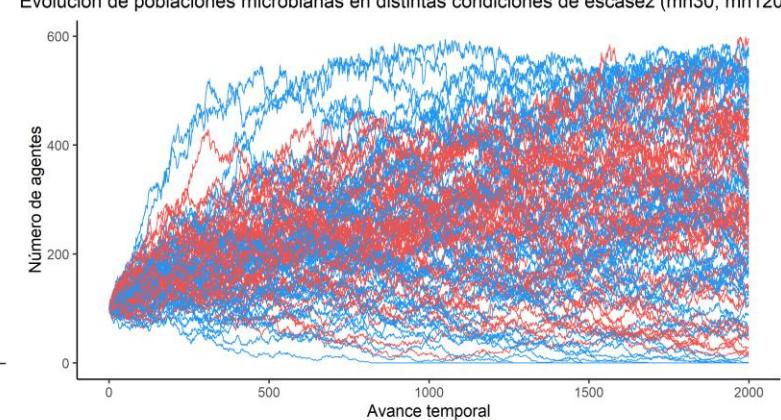
Agrupación total de las poblaciones microbianas en modelos de 2 especies y 4 especies (Competición inhibición, Competición toxicidad, Cooperación)



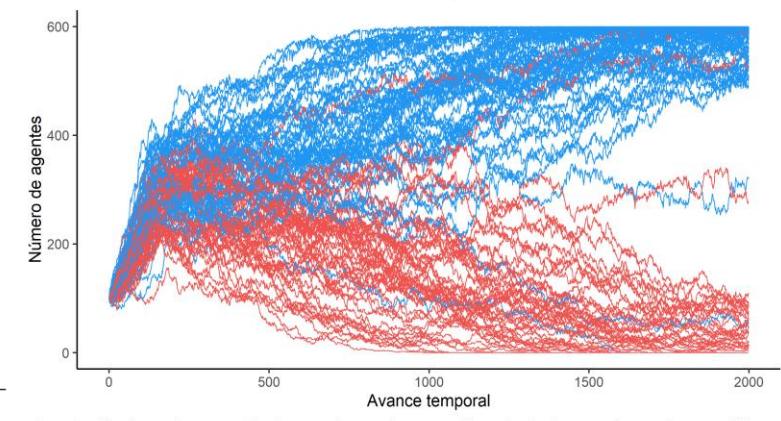
Leyenda: El color negro corresponde a los modelos de 2 especies; el color rojo, naranja y azul corresponde a los modelos de 4 especies.

B

Evolución de poblaciones microbianas en distintas condiciones de escasez (mn30, mn120)



C



Leyenda: El color azul corresponde a la suma de especies cooperativas, el rojo a la suma de especies competitivas.

D

**Figura 8.** Agrupación espacial en modelos competitivos y cooperativos complejos. En la Figura 8.A se muestran ejemplos de la distribución espacial de los agentes una vez finalizadas las simulaciones. En la Figura 8.B se muestran 3 ejemplos de gráficas con la distribución de distancias entre agentes; existen diferencias entre la agrupación intraespecie e interespecie en modelos competitivos y cooperativos. Con la Figura 8.C se confirma que la agrupación total entre modelos de 2 y 4 especies no cambia. En la Figura 8.D se compara la evolución poblacional de dos simulaciones de un modelo mixto para el que varía el nivel de escasez; parece que aumentar la cantidad de alimento repercute positivamente sobre las dinámicas cooperativas.

## **CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES**

Nuestro primer experimento es esencial para establecer diferencias entre los modelos competitivos y cooperativos. Desde el punto de vista poblacional, confirma que la competencia genera dinámicas de predominancia mientras la cooperación favorece la coexistencia entre especies. También resulta interesante ver los efectos tan dispares de parámetros como el porcentaje inicial de cada especie, la tasa de secreción o la tasa de movimiento. Desde el punto de vista espacial, tanto el análisis de agrupación como el de *clustering* evidencian otra diferencia fundamental: mientras que las especies competitivas se mantienen separadas, las cooperativas se mezclan entre sí.

Nuestro segundo experimento explora los efectos resultantes de introducir la escasez de alimento, un factor que limita el crecimiento cuando hay agrupación local. Con ello, el movimiento pasa a ser un factor positivo, el sistema tarda más en alcanzar la capacidad de carga y el agrupamiento es menor. También se estudia la repercusión de incluir la secreción guiada por estímulo, un factor por el cual los agentes solo secretan en presencia de la otra especie. El efecto más destacado se observa a nivel espacial y es que los modelos cooperativos se agrupan en mayor medida.

Nuestro tercer experimento plantea el paso de sistemas de 2 a 4 especies. En ellos, se comprueba que aumentar la complejidad del sistema no altera las dinámicas poblacionales y las políticas de agrupación características de cada modelo. Por su lado, considerar coexistencia entre interacciones evidencia la mayor agresividad de especies tóxicas frente a inhibidoras y muestra que la cantidad de alimento es determinante en la relación competición-cooperación: cuando hay poco, favorece a las dinámicas competitivas; cuando hay mucho, favorece a las dinámicas cooperativas.

Resulta obvio que, por la forma en que está planteado el proyecto, existen muchos planteamientos alternativos en lo que se refiere al barrido de parámetros. Además, se podrían haber introducido varias modificaciones en los modelos. Podríamos haber considerado el alimento como algo explícito y plantear distintos sustentos para cada especie; ello habría ido encaminado a reproducir estudios que reflejan variaciones en la microbiota por cambios en la dieta (*Clayton et al, 2016*). Otra opción habría sido introducir un factor negativo asociado al gasto energético de secretar y moverse, lo que hubiera alterado el efecto de las tasas de secreción y movimiento. También podríamos haber planteado el crecimiento solo en el borde de las colonias, como parece que ocurre por la falta de espacio y nutrientes en la región interna (*Kayser et al, 2019*). Estos cambios facilitan la adecuación de los modelos a la realidad pero encierran una complejidad y variabilidad que pueden no interesar.

Mi valoración del trabajo es la misma que presenté en las primeras líneas de este documento. Creo que su principal aportación radica, no tanto en los resultados obtenidos, sino en las posibilidades que ofrece la metodología de trabajo empleada de cara a experimentos más dirigidos.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Be'er A and Ariel G, A statistical physics review of swarming bacteria, *Movement Ecology*, 7(9), 2019.
- [2] Cavaliere M *et al*, Cooperation in microbial communities and their biotechnological applications, *Environmental Microbiology*, 19(8), p.2949-2963, 2017.
- [3] Clayton JB *et al*, Captivity humanizes the primate microbiome, *PNAS*, 113(37), p.10376-10381, 2016.
- [4] De Dios Caballero J *et al*, “Individual Patterns of Complexity in Cystic Fibrosis Lung Microbiota, Including Predator Bacteria, over a 1-Year Period, *American Society for Microbiology*, 2017.
- [5] De Roy K *et al*, Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities, *Environmental Microbiology*, 16(6), p.1472-1481, 2014.
- [6] Emonet T *et al*, AgentCell: A digital single-cell assay for bacterial chemotaxis, *Bioinformatics*, 21(11), p.2714-2721, 2005.
- [7] Epstein JM *et al*, Controlling pandemic flu: The value of international air travel restrictions, *Public Library of Science ONE*, 2(5), 2007.
- [8] Ester M *et al*, A Density-Based Algorithm for Discovering Clusters in Large Spatial Databases with Noise, *KDD96 Proceedings*, p.226-231, 1996.
- [9] Faust K and Raes J, Microbial interactions: from networks to models, *Nature Reviews Microbiology*, 10, p.538-550, 2012.
- [10] Foster KR and Bell T, Competition, Not Cooperation, Dominates Interactions among Culturable Microbial Species, *Current Biology*, 22, p.1845-1850, 2012.
- [11] Friedman J and Gore J, Ecological systems biology: The Dynamics of interacting populations, *Current Opinion in Systems Biology*, 1, p.114-121, 2017.
- [12] Friedman J *et al*, Community structure follows simple assembly rules in microbial microcosm, *Nature Ecology & Evolution*, 1, 2017.
- [13] Gore J, Simple organizing principles in microbial communities, *Current Opinion in Microbiology*, 45, p.195-202, 2018.
- [14] Hibbing E *et al*, Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle, *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), p.15-25, 2010.
- [15] Kayser J *et al*, Collective motion conceals fitness differences in crowded cellular populations, *Nature Ecology & Evolution*, 3, p.125-134, 2019.
- [16] Konopka A, What is microbial community ecology, *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 3, p.1223-1230, 2009.
- [17] Little AEF *et al*, Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities, *Annual Review of Microbiology*, 62(1), p.375-401, 2008.
- [18] Macal CM and North MJ, Tutorial on agent-based modelling and simulation, *Journal of Simulation*, 4(3), pp. 151–162, 2010.
- [19] Marchal M *et al*, A passive mutualistic interaction promotes the evolution of spatial structure within microbial populations, *BMC Evolutionary Biology*, 17(106), 2017.
- [20] Mukherjee S and Bassler BL, Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments, *Nature Reviews Microbiology*, 17, p.371-382, 2019.
- [21] Ozkaya O *et al*, Maintenance of Microbial Cooperation Mediated by Public Goods in Single- and Multiple-Trait Scenarios, *Journal of Bacteriology*, 2017.
- [22] Pedregosa *et al*, Scikit-learn: Machine Learning in Python, *Journal of Machine Learning Research*, 12, p.2825-2830, 2011.
- [23] Preziosi L, *Cancer Modelling and Simulation*, Chapman and Hall, Boca Raton, 2003.
- [24] Sayama H, Introduction to the modelling and analysis of complex systems, *Open SUNY Textbooks*, Nueva York, p.427-464, 2015.
- [25] Tarnita CE, The ecology and evolution of social behaviours in microbes, *Journal of Experimental Biology*, 220, p.18-24, 2017.
- [26] Tukey J, Comparing Individual Means in the Analysis of Variance, *Biometrics*, 5(2), p.99-114, 1949.
- [27] Theraulaz G and Bonabeau E, A brief history of stigmergy, *Artificial Life*, 5(2), p. 97–116, 1999.
- [28] Wilkoxon F, Individual comparisons by ranking methods, *Biometrics Bulletin*, 1(6), p.80-83, 1945.
- [29] Zomorrodi AR and Segrè D, Synthetic Ecology of Microbes: Mathematical Models and Applications, *Journal of Molecular Biology*, 428(5), p.837-861, 2016.

## **APÉNDICES**

### **A. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los análisis estadísticos se plantean para verificar fenómenos identificados a nivel gráfico. Lo primero que hacemos es comprobar la normalidad de nuestros datos con métodos gráficos basados en los residuos. Si la asunción de normalidad se cumple, empleamos el test de Tukey (*Tukey, 1949*), un método de comparación múltiple basado en la prueba paramétrica T de Student que declara 2 distribuciones como distintas cuando la diferencia entre sus medias muestrales es menor a la cantidad HSD. Si la asunción de normalidad no se cumple, usamos el test Pairwise Wilcoxon Rank Sum (*Wilcoxon, 1945*), un método de comparación múltiple basado en la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney que declara 2 distribuciones X e Y como distintas cuando la probabilidad de que una observación de X exceda la de una observación de Y es distinta a la probabilidad de que una observación de Y exceda la de una observación de X. En los análisis, se considera un nivel de significación de 0.05; esto implica que, siendo  $H_0$  cierta, la probabilidad de rechazarla es del 5%.

#### **Análisis estadístico 1 (*An.est.1*)**

$H_0$ : las proporciones poblacionales de las especies con proporciones iniciales de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 y 0.9 son iguales. Datos: para cada modelo se consideran 9 distribuciones, todas con 180 valores menos la intermedia con 360. Resolución: se rechaza  $H_0$  en competición (todas las medias son significativamente distintas) pero no en cooperación (no hay medias significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 2 (*An.est.2*)**

$H_0$ : las proporciones poblacionales de las especies con tasas de secreción menores, iguales o mayores que la otra especie son iguales. Datos\*: para cada modelo se consideran 3 distribuciones con 120 -competición- o 600 -cooperación- valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  (las medias son significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 3 (*An.est.3*)**

$H_0$ : las proporciones poblacionales de las especies con tasas de movimiento menores, iguales o mayores que la otra especie son iguales. Datos\*: para cada modelo se consideran 3 distribuciones con 120 -competición- o 600 -cooperación- valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  en competición (al menos las medias extremas son significativamente distintas) pero no en cooperación (no hay medias significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 4 (*An.est.4*)**

$H_0$ : los coeficientes de homogeneidad de los modelos de inhibición, toxicidad y cooperación son iguales. Datos: se consideran 3 distribuciones con 900 valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  (las medias son significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 5 (*An.est.5*)**

$H_0$ : en cooperación, los coeficientes de homogeneidad en condiciones de igual y distinta tasa de secreción son iguales. Datos: se consideran 2 distribuciones, con 300 y 600 valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  (las medias son significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 6 (*An.est.6*)**

$H_0$ : los coeficientes de ocupación de los modelos de inhibición, toxicidad y cooperación son iguales. Datos: se consideran 3 distribuciones con 900 valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  (las medias son significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 7 (*An.est.7*)**

$H_0$ : los coeficientes de ruido en condiciones de poco movimiento -ambas especies tienen movimiento 1-, medio movimiento -la especie minoritaria tiene movimiento 2- y mucho movimiento -la especie mayoritaria tiene movimiento 2- son iguales. Datos: para cada modelo se consideran 3 distribuciones con 300 valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  (al menos las medias extremas son significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 8 (*An.est.8*)**

$H_0$ : en distintos niveles de escasez, las proporciones poblacionales de las especies según su tasa de movimiento son iguales. Datos\*: para cada modelo se consideran 2 distribuciones de referencia con 120 -competición- o

600 -cooperación- valores y 6 distribuciones con 60 -competición- o 150 -cooperación- valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  en competición (hay medias significativamente distintas de la referencia) pero no en cooperación (no hay medias significativamente distintas de la de referencia).

#### **Análisis estadístico 9 (*An.est.9*)**

$H_0$ : los coeficientes de ocupación en distintos niveles de escasez son iguales. Datos: para cada modelo se considera 1 distribución de referencia con 900 valores y 3 distribuciones con 450 -competición- o 225 -cooperación- valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  (hay medias significativamente distintas de la de referencia).

#### **Análisis estadístico 10 (*An.est.10*)**

$H_0$ : en distintos niveles de radio de detección, las proporciones poblacionales de las especies según su tasa de movimiento son iguales. Datos\*: para cada modelo se consideran 2 distribuciones de referencia con 120 -competición- o 600 -cooperación- valores y 6 distribuciones con 60 -competición- o 150 -cooperación- valores. Resolución: no se rechaza  $H_0$  (no hay medias significativamente distintas de la de referencia).

#### **Análisis estadístico 11 (*An.est.11*)**

$H_0$ : los coeficientes de ocupación en distintos niveles de radio de detección son iguales. Datos: para cada modelo se considera 1 distribución de referencia con 900 valores y 3 distribuciones con 450 -competición- o 225 -cooperación- valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  en cooperación (hay medias significativamente distintas de la de referencia) pero no en competición (no hay medias significativamente distintas de la de referencia).

#### **Análisis estadístico 12 (*An.est.12*)**

$H_0$ : los coeficientes de ocupación en distintas niveles de escasez son iguales. Datos: para cada modelo se consideran 3 distribuciones con 100 valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  (al menos las medias extremas son significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 13 (*An.est.13*)**

$H_0$ : los coeficientes de ocupación en distintos niveles de radio de detección son iguales. Datos: para cada modelo se consideran 3 distribuciones con 100 valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  en cooperación (las medias son significativamente distintas) pero no en competición (no hay medias significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 14 (*An.est.14*)**

$H_0$ : cuando coexisten en un sistema, las proporciones poblacionales de la especie inhibidora y de la especie tóxica son iguales. Datos: comparamos 2 distribuciones con 300 valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  (las medias son significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 15 (*An.est.15*)**

$H_0$ : cuando coexisten con especies que cooperan, las proporciones poblaciones de las especies inhibidoras y de las especies tóxicas son iguales. Datos: comparamos 2 distribuciones con 300 valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  (las medias son significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 16 (*An.est.16*)**

$H_0$ : cuando coexisten con especies que compiten, las proporciones poblacionales de las especies cooperativas en distintos niveles de escasez son iguales. Datos: para cada modelo, comparamos 3 distribuciones con 100 valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  (al menos las medias extremas son significativamente distintas).

#### **Análisis estadístico 17 (*An.est.17*)**

$H_0$ : cuando coexisten con especies que compiten, las proporciones poblacionales de las especies cooperativas en distintos niveles de radio de detección son iguales. Datos: para cada modelo, comparamos 3 distribuciones con 100 valores. Resolución: se rechaza  $H_0$  (las medias son significativamente distintas).

\*Se considera únicamente la condición de proporción inicial 0.5-0.5 debido a la elevada variabilidad.

## **B. MATERIAL SUPLEMENTARIO**

En la carpeta adjunta se incluyen, ordenadas por nº de experimento: los modelos, gráficas de estacionariedad, gráficas de evolución poblacional, tablas de proporción poblacional, gráficas con la distribución de distancias entre agentes, tablas con los parámetros de *clustering* y marcos de datos para el análisis estadístico. Estas muestran los resultados de cada réplica o reflejan las medias de todas las réplicas para un condición concreta.