

MODELAMIENTO Y ESTUDIO DE LA DINÁMICA DEL
CRECIMIENTO DE COLONIAS BACTERIANAS POR
MÉTODOS GRÁFICOS

LINA MARÍA GUERRERO SALAZAR

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE FÍSICA
BUCARAMANGA

2013

MODELAMIENTO Y ESTUDIO DE LA DINÁMICA DEL
CRECIMIENTO DE COLONIAS BACTERIANAS POR
MÉTODOS GRÁFICOS

LINA MARÍA GUERRERO SALAZAR

Trabajo de grado para optar al título de físico

Director

ARTURO PLATA GÓMEZ., Dr.

Codirectora

GIOVANNA RINCÓN CRUZ, M.Sc.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE FÍSICA

BUCARAMANGA

2013

AGRADECIMIENTOS

A mis padres quienes son mi ejemplo, mi fuerza y mi soporte.

A mis hermanos quienes son mi constante apoyo.

A Arturo Plata y Giovanna Rincón por su paciencia y colaboración.

A todos los integrantes del Grupo de Óptica y Tratamiento de Señales por su amistad y consejos.

A Henry Gutiérrez, Eduardo Orozco y Andrés González por su ayuda con la programación, su acompañamiento durante el proceso y su valiosa amistad.

A mis amigos Aura Vera, Lucelly Castro, Alejandra Gamboa, Alexandra Plata, Gabriel Silva, Eduardo González, Javier Mejía, Vladimir Peña, Fredy Parada, Carlos Jaimes, Ely Niño, Elber Rodríguez por estar siempre ahí para mí.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	13
1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA	15
1.1 SISTEMA ÓPTICO.....	15
1.2 SISTEMA MECÁNICO	16
2. CRECIMIENTO DE COLONIAS	17
2.1 METODOLOGÍA DE ADQUISICIÓN DE IMÁGENES	17
2.1.1. PROFUNDIDAD DE CAMPO EXTENDIDA.....	18
2.1.1.1 <i>Bacillus polymyxa</i>	19
2.1.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.1.1.3 <i>Micrococcus sp.</i>	22
2.1.2. AMPLIACIÓN DEL CAMPO DE VISIÓN	26
2.2. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES	29
2.2.1. KURTOSIS	29
2.2.2. DIMENSIÓN FRACTAL.....	31
3. SIMULACIÓN	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopio Axio ImagerZ1.m de Carl Zeiss. <i>Fuente: autor.</i>	15
Figura 2. (a) Siembra por estría en placa Petri. (b) Placas Petri inoculadas y en cava para su transporte. <i>Fuente: autor.</i>	17
Figura 3. (a) Placa Petri sobre la platina del AxioImager para hacer la adquisición de las imágenes. (b) Colonas de <i>Bacillus polymyxa</i> un día después de haber sido inoculada. <i>Fuente: autor.</i>	18
Figura 4. Secuencia de imágenes autofocalizadas de <i>Bacillus polymyxa</i> tomadas a intervalos de media hora durante 7 horas, con magnificación de 5x. <i>Fuente: autor.</i>	19
Figura 5. Secuencia de imágenes autofocalizadas de <i>Bacillus polymyxa</i> tomadas a intervalos de media hora durante 10 horas con magnificación de 20x. <i>Fuente: autor.</i>	20
Figura 6. Secuencia de imágenes autofocalizadas de <i>Bacillus polymyxa</i> tomadas a intervalos de media hora durante 4,5 horas con una magnificación de 20x. <i>Fuente: autor.</i>	21
Figura 7. Secuencia de imágenes autofocalizadas de <i>Staphylococcus aureus</i> tomadas a intervalos de media hora durante 6 horas con una magnificación de 20x. <i>Fuente: autor.</i>	22
Figura 8. Secuencia de imágenes autofocalizadas de <i>Micrococcus sp.</i> tomadas a intervalos de media hora durante 6 horas con una magnificación de 20x. <i>Fuente: autor.</i>	23
Figura 9. Colonia de <i>Bacillus polymyxa</i> con un tamaño aproximado de 400 micras. (a) Imagen de textura obtenida por profundidad de campo extendida. (b) Imagen de la topografía de la colonia. <i>Fuente: autor.</i>	24

Figura 10. Colonia de <i>Bacillus polymyxa</i> con un tamaño aproximado de 549 micras. (a) Imagen de textura obtenida por profundidad de campo extendida. (b) Imagen de la topografía de la colonia. (c) y (d) Representación en 3D de la colonia hecha en ImageJ 1.43c. <i>Fuente: autor.</i>	24
Figura 11. Colonia de <i>Bacillus polymyxa</i> con un tamaño aproximado de 190 micras. (a) Imagen de textura. (b) Imagen de topografía y (c) Representación en 3D de la colonia hecha en ImageJ 1.43c. <i>Fuente: autor.</i>	25
Figura 12. Colonia de <i>Bacillus polymyxa</i> con un tamaño aproximado de 286 micras. (a) Imagen de textura obtenida por profundidad de campo extendida. (b) Imagen de la topografía de la colonia. (c) y (d) Representación en 3D de la colonia hecha en ImageJ 1.43c. <i>Fuente: autor.</i>	25
Figura 13. Polímero formado por una colonia de <i>Bacillus polymyxa</i> con una altura aproximada de 48 micras. (a) Imagen de textura obtenida por profundidad de campo extendida. (b) Imagen de la topografía de la colonia. (c) Representación en 3D de la colonia hecha en ImageJ 1.43c. <i>Fuente: autor.</i>	26
Figura 14. Imagen del estado del la superficie de una colonia de <i>Bacillus polymyxa</i> , dimensiones 94 micras x 112 micras. <i>Fuente: autor.</i>	27
Figura 15. Imagen del estado del la superficie de una colonia de <i>Bacillus polymyxa</i> , dimensiones 58 micras x 100 micras. <i>Fuente: autor.</i>	27
Figura 16. Imagen del estado del la superficie de una colonia de <i>Bacillus polymyxa</i> , dimensiones 72 micras x 120 micras. <i>Fuente: autor.</i>	28
Figura 17. Imagen del estado del la superficie de una colonia de <i>Bacillus polymyxa</i> , dimensiones 3 mm x 5 mm. <i>Fuente: autor.</i>	28
Figura 18. Variación del parámetro estadístico de kurtosis durante el crecimiento de colonias de <i>Bacillus polymyxa</i> mostrado en la Figura 4. <i>Fuente: autor.</i>	29
Figura 19. Variación del parámetro estadístico de kurtosis durante el crecimiento de colonias de <i>Bacillus polymyxa</i> mostrado en la Figura 5. <i>Fuente: autor.</i>	30
Figura 20. Variación del parámetro estadístico de kurtosis durante el crecimiento de colonias de <i>Bacillus polymyxa</i> mostrado en la Figura 6. <i>Fuente: autor.</i>	30

Figura 21. Variación del parámetro estadístico de kurtosis durante el crecimiento de colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> mostrado en la Figura 7. <i>Fuente: autor.</i> ...	30
Figura 22. Variación del parámetro estadístico de kurtosis durante el crecimiento de colonias de <i>Micrococcus sp.</i> mostrado en la Figura 8. <i>Fuente: autor.</i>	31
Figura 23. Dimensión fractal para algunas de las imágenes obtenidas durante el crecimiento de colonias de <i>Bacillus polymyxa</i> mostradas en la Figura 4. (a) D=1.4360 para las 8:00 am. (b) D=1.4753 para las 11:00 am y (c) D=1.7961 para las 2:30 pm. <i>Fuente: autor.</i>	32
Figura 24. Dimensión fractal para algunas de las imágenes obtenidas durante el crecimiento de colonias de <i>Bacillus polymyxa</i> mostradas en la Figura 5. (a) D= 1.6958 para las 8:00 am. (b) D=1.7327 para la 1:00 pm y (c) 1. 7230 para las 5:00 pm. <i>Fuente: autor.</i>	32
Figura 25. Dimensión fractal para algunas de las imágenes obtenidas durante el crecimiento de colonias de <i>Bacillus polymyxa</i> mostradas en la Figura 5. (a) D= 1.9092 para las 8:00 am. (b) D=1.5875 para la 10:00 am y (c) 1. 7258 para las 12:00 pm. <i>Fuente: autor.</i>	32
Figura 26. Dimensión fractal para algunas de las imágenes obtenidas durante el crecimiento de colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> mostradas en la Figura 7. (a) D= 1.6591 para las 8:00 am. (b) D=1.8024 para la 10:30 am y (c) 1. 8466 para las 1:30 pm. <i>Fuente: autor.</i>	32
Figura 27. Dimensión fractal para algunas de las imágenes obtenidas durante el crecimiento de colonias de <i>Micrococcus sp.</i> mostradas en la Figura 8. (a) D= 1.6775 para las 8:00 am. (b) D=1.7636 para la 10:30 am y (c) 1. 8414 para las 1:30 pm. <i>Fuente: autor.</i>	32
Figura 28. (a) Densidad de bacterias. (b) concentración de nutrientes. Para $n_0=1$, en iteración=5 y propagación en el eje Z. <i>Fuente: autor.</i>	32
Figura 29. Cambios morfológicos de las colonias debido al incremento de n_0 . <i>Fuente: autor.</i>	32
Figura 30. Evolución temporal de la densidad de bacterias y de la concentración de nutrientes. <i>Fuente: autor.</i>	32

Figura 31. Evolución temporal de la densidad de bacterias y de la concentración de nutrientes vista en 3D. *Fuente: autor.*32

Figura 32. Grafica de los valores kurtosis para las imágenes de la Figura 29, (a) $n_0=1$, (b) $n_0=3$ y (c) $n_0=5$. *Fuente: autor.*32

Figura 33. Dimensión fractal de los patrones espacio temporales con iteración=20 para (a) $n_0=1$, (b) $n_0=2$, (c) $n_0=3$, (d) $n_0=4$ y (e) $n_0=5$. *Fuente: autor.*32

RESÚMEN

TÍTULO: MODELAMIENTO Y ESTUDIO DE LA DINÁMICA DEL CRECIMIENTO DE COLONIAS BACTERIANAS POR MÉTODOS GRÁFICOS.¹

AUTOR: GUERRERO SALAZAR, Lina María.²

PALABRAS CLAVES: Microscopía de campo amplio, procesamiento digital de imágenes, colonias bacterianas, morfología de colonias, formación de patrones espacio temporales.

RESÚMEN:

En los últimos veinte años se ha estudiado el crecimiento de colonias bacterianas y las condiciones necesarias para que dicho crecimiento se lleve a cabo, tanto de forma experimental como teórica; dando como resultado imágenes con diferentes patrones de crecimiento de colonias pero en campos de décimas de micras, sin ninguna información de rango.

El trabajo presentado pretende hacer el estudio morfológico y dinámico del crecimiento de colonias de *Bacillus polymyxa*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus sp.* por medio de las técnicas de profundidad de campo extendido y ampliación del campo de visión, que consisten en hacer un procesamiento digital de las imágenes proporcionando alta resolución, tanto en textura, como en topografía; esto se hace con el fin de superar las limitaciones que tiene el uso de un microscopio de campo brillante.

También se busca modelar este comportamiento por medio del Modelo de Reacción-Difusión, el cual logra reproducir de manera acertada las propiedades y características de los diferentes patrones espacio temporales a través de los cuales crecen las colonias bacterianas.

Hecho esto, se hará un análisis de las imágenes obtenidas tanto por el microscopio como por la simulación para estudiar parámetros como la kurtosis, el skewness y la dimensión fractal; que ayuden a caracterizar la dinámica de dicho crecimiento.

El obtener un comportamiento tridimensional de sistemas biológicos dinámicos, permite crear estructuras y materiales con diferentes propiedades físicas y biológicas para aplicaciones industriales.

¹ Trabajo de Grado.

² Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Director: Dr. Arturo Plata Gómez. Codirectora: M.Sc. Giovanna Rincón Cruz.

ABSTRACT

TITLE: MODELING AND STUDY OF THE DYNAMIC OF BACTERIAL COLONY GROWTH BY GRAPHICS METHODS.³

AUTHOR: GUERRERO SALAZAR, Lina María.⁴

KEY WORDS: Wide-field microscopy, digital image processing, bacterial colonies, Colony Morphology, spatio-temporal pattern formation.

ABSTRACT

In the last twenty years the growth of bacterial colonies has been studied and the conditions for such growth to take place, both experimentally and theoretically, resulting in images with different colony growth patterns but the resolution of those images is in areas of tenths of microns without range information.

On the other hand, theoretical studies considering the bacteria as systems with collective behavior controlled by a reduced number of parameters have been developed. The present work aims to study morphological and dynamic growth of *Bacillus polymyxa*, *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus sp.* colonies by the technique of extended depth of field and extended field of view, that involve the digital processing of images by providing high resolution, both in texture and in topography, this is done in order to overcome the limitations has the use of a bright field microscope.

It also seeks to model this behaviour by means of Reaction-Diffusion Model, which can reproduce in a proper way the properties and characteristics of different spatiotemporal patterns through which bacterial colonies grow.

After this is done, will analyze the images obtained by the microscope so as simulation to study parameters such as the kurtosis, the skewness and the fractal dimension, that help characterize the dynamics of growth.

Getting a three-dimensional behaviour of dynamic biological systems is useful to create structures and materials with different physical and biological properties for industrial applications.

³ Degree Project.

⁴ Faculty of Sciences. School of Physics. Director: PhD. Arturo Plata Gómez. Codirector: M.Sc. Giovanna Rincón Cruz.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento bacteriano se observa macroscópicamente en medios de cultivo sólido a través de las colonias, estructuras generadas como producto de la división de una única célula o un grupo pequeño de células que no pueden separarse totalmente que se denomina unidad formadora de colonias (UFC). El tiempo que demora una célula para formar una colonia depende del tiempo de generación de la misma y de las condiciones ambientales (nutrientes, temperatura y el pH al que se encuentre) [1].

Las bacterias y sus estructuras pueden ser vistas usando técnicas de microscopía. Para el presente trabajo fue usado un microscopio de campo brillante, pero este dispositivo tiene una profundidad de campo limitada; por lo tanto, si la muestra tiene un volumen apreciable, se pueden enfocar varios planos de la misma a distancias medibles dadas por la precisión del microscopio, que pueden ser procesadas para generar una sola imagen completamente focalizada; obteniendo así datos cualitativos de la muestra, preservando sus características naturales [2, 3], esto se llama profundidad de campo extendida y se implementó a través del algoritmo hecho por [4]. El campo de visión de éste tipo de dispositivos también es limitado; por lo tanto, usando el módulo MosaiX del software del microscopio se pudo hacer un barrido de toda la muestra, generando así una sola imagen de la región de interés, incluso a grandes aumentos [5].

En este trabajo se presentan las imágenes adquiridas y su respectivo análisis digital, para la formación de las colonias de las siguientes bacterias:

- *Bacillus polymyxa* es un bacilo Gram positivo aerobio ambiental, con un tamaño aproximado de 0,6 a 3 micras, formador de esporas que son estructuras que le confieren resistencia, además son productores de sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos como es el caso de la polimixina [6].

- *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva, es anaeróbica facultativa, de aproximadamente 0,5 a 1,5 micras de diámetro, no móviles, no formadora de esporas, por lo general forman racimos, hacen parte de la flora de los humanos y se encuentran generalmente en la nariz y en la piel [7].
- *Micrococcus sp.* es una bacteria Gram positiva, aeróbica, de 1 a 1,8 micras de diámetro, son no móviles y no formadoras de esporas, se agrupan en racimos irregulares, en pares o en tétradas [8].

El estudio de los patrones de crecimiento de las colonias bacterianas ha ganado importancia en años recientes, debido al interés en describir la evolución espacio temporal desde el punto de vista de la física de los sistemas biológicos que interactúan con el ambiente, lo cual ha dado lugar a investigaciones teóricas y experimentales con el fin de describir cualitativa y cuantitativamente este fenómeno [9, 10, 11, 12].

Se hizo el estudio del patrón de formación de las colonias por el modelo matemático de Reacción-Difusión, mediante las ecuaciones propuestas en [10] y solucionadas por el Método Implícito de Dirección Alternante a través del algoritmo mostrado en Matlab por [13] usando las condiciones iniciales de [10, 14 y 15]; obteniendo así los patrones espacio temporales del crecimiento de las colonias y su respectivo análisis.

1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA

Para desarrollar este trabajo se empleó un microscopio de reflexión para materiales Axio Imager.Z1m de la empresa Carl Zeiss mostrado en la Figura 1; con iluminación Kohler, óptica al infinito libre de esfuerzos, corrección cromática, diseñado para aplicaciones en microscopía de contraste de fase C-DIC.

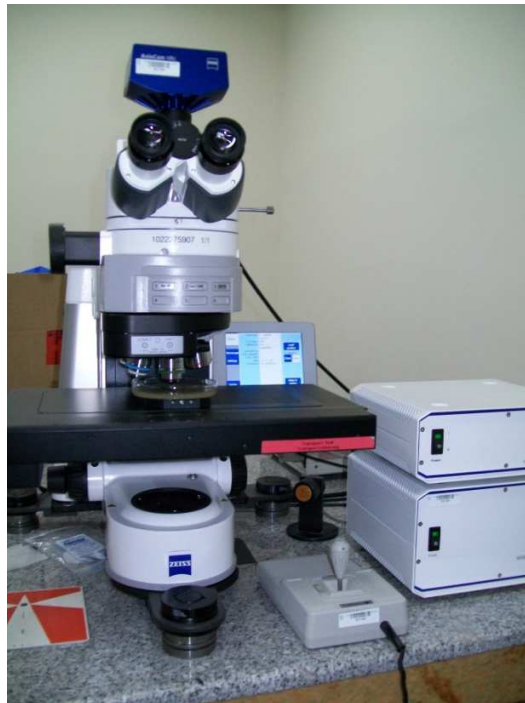


Figura 1. Microscopio Axio ImagerZ1.m de Carl Zeiss. *Fuente: autor.*

1.1 SISTEMA ÓPTICO

El microscopio Axio Imager.Z1m cuenta con objetivos tipo Epiplan-Neofular con aumentos de 5x, 20x, 50x y 100x, módulos de campo claro, C-DIC (circular-diferencial interferometer contrast) y TIC (total interferometer contrast).

1.2 SISTEMA MECÁNICO

Las características mecánicas más importantes radican en los desplazamientos que el microscopio puede realizar para hacer un barrido sobre la muestra, gracias a que cuenta con una platina con actuadores piezoeléctricos tanto a lo largo del eje óptico (dirección Z), como en los ejes transversales (direcciones X-Y). El máximo desplazamiento X-Y de la platina es de 85mm y 130 mm respectivamente, con paso de 200nm y desplazamiento en Z de 120mm con paso de 10nm.

2. CRECIMIENTO DE COLONIAS

Para el presente trabajo se realizó la inoculación de las bacterias mediante el método de siembra por estría en placa Petri en medio sólido (agar nutritivo de 30 ml), esto se hizo en la Facultad de Salud a las 6:30 am y la toma de las imágenes se empezó a hacer en el Laboratorio de Óptica de Guatiguará a las 8:00 am. Como se observa en la Figura 2.

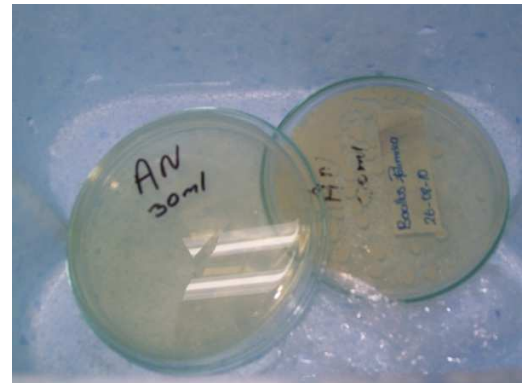
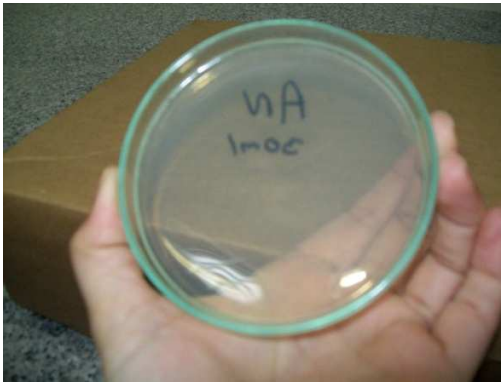


Figura 2. (a) Siembra por estría en placa Petri. **(b)** Placas Petri inoculadas y en cava para su transporte.
Fuente: autor.

2.1 METODOLOGÍA DE ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

Usando un programa desarrollado en Visual Basic a través del software del microscopio, se hizo la adquisición de la secuencia de imágenes que no superaban las 200, las cuales correspondían al barrido de la muestra sobre el eje axial a paso de entre 1 y 10 micras, esto se hacía cada 30 minutos y se extendía hasta donde las condiciones ambientales permitían al agar conservar sus propiedades. La muestra no era movida para garantizar que siempre se estuviera observando la evolución en el tiempo del mismo punto en el espacio, como se muestra en la Figura 3(a). Luego cada secuencia de imágenes fue procesada en

ImageJ 1.47c [16] para extender la profundidad de campo y obtener así una sola imagen completamente focalizada de la muestra.



Figura 3. (a) Placa Petri sobre la platina del AxioImager para hacer la adquisición de las imágenes. **(b)** Colonias de *Bacillus polymyxa* un día después de haber sido inoculada. Fuente: autor.

Cuando las colonias alcanzaban ciertos tamaños que ya no eran útiles para extender la profundidad de campo, como se ve en la Figura 3(b), se procedía a extender el campo de visión, esto se hacía mediante del módulo MosaiX [5] del software del microscopio; haciendo la adquisición de varias imágenes a través de un barrido sobre toda la muestra tanto en X como en Y, luego se hace un solapamiento de éstas para obtener así una sola imagen de la colonia incluso a grandes aumentos.

2.1.1. PROFUNDIDAD DE CAMPO EXTENDIDA

Las imágenes del seguimiento que se hizo al crecimiento de las colonias de las tres especies de bacterias usadas en este trabajo por medio de la técnica de profundidad de campo extendida se presentan a continuación:

2.1.1.1 *Bacillus polymyxa*

En la figura 4, se pueden observar las imágenes adquiridas el día 20 de Agosto del 2010, con un objetivo de 5x. Se hizo un seguimiento de 7 horas en las cuales se tomaron cerca de 150 imágenes a un paso de 3 micras cada media hora.

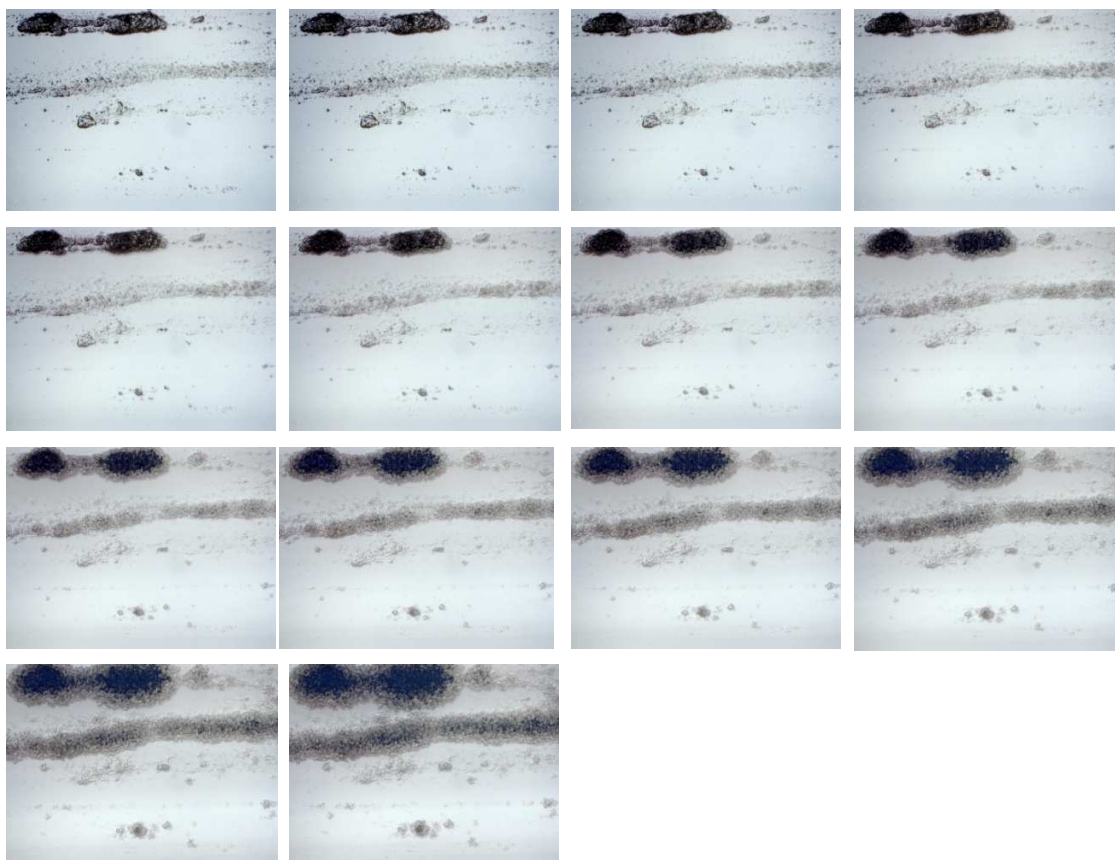


Figura 4. Secuencia de imágenes autofocalizadas de *Bacillus polymyxa* tomadas a intervalos de media hora durante 7 horas, con magnificación de 5x. Fuente: autor.

En la figura 5, se pueden observar las imágenes adquiridas el día 26 de Agosto de 2010, con un objetivo de 20x. Se hizo un seguimiento de 10 horas en las cuales se tomaron cerca de 100 imágenes a un paso de 3 micras cada media hora.

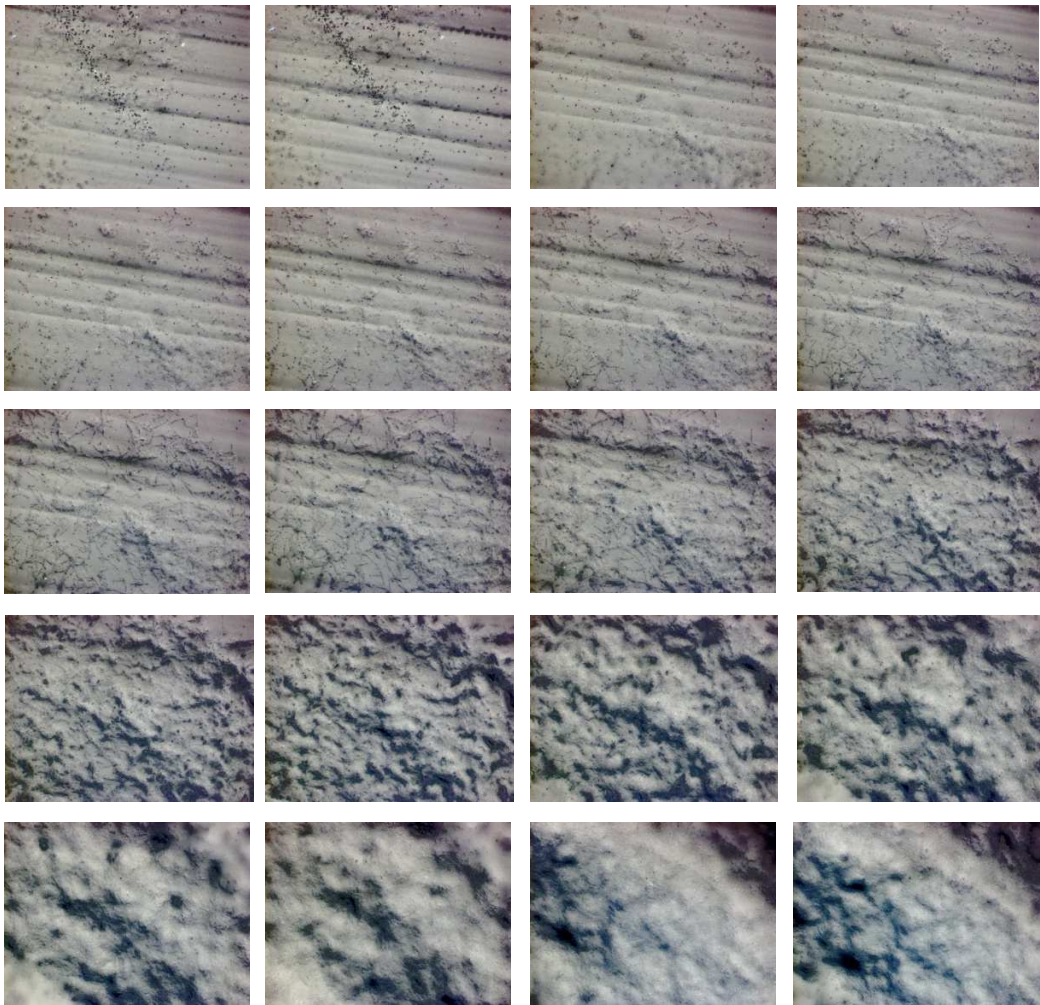


Figura 5. Secuencia de imágenes autofocalizadas de *Bacillus polymyxa* tomadas a intervalos de media hora durante 10 horas con magnificación de 20x. *Fuente: autor.*

En la Figura 6, se pueden observar las imágenes adquiridas el día 23 de Febrero de 2011, con un objetivo de 20x. Se hizo un seguimiento de 4,5 horas en las cuales se tomaron cerca de 80 imágenes a un paso de 3 micras cada media hora. En esta secuencia se presentó un error en el programa de adquisición de las imágenes que hacía que el histograma se corriera hacia la izquierda, por lo tanto la intensidad en las imágenes es muy baja y se ven oscuras.

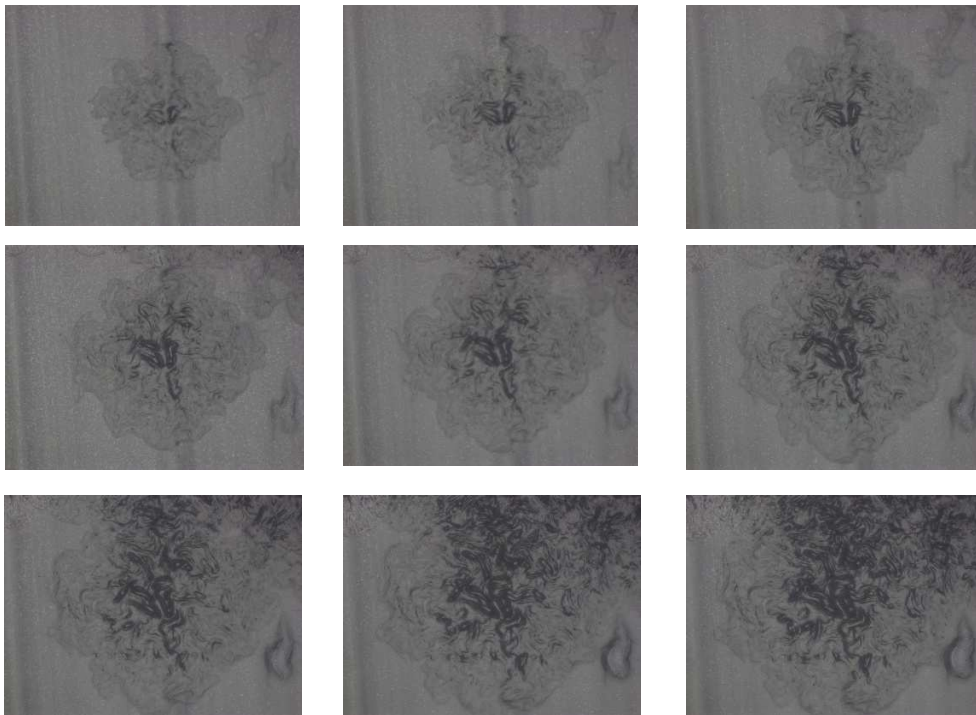


Figura 6. Secuencia de imágenes autofocalizadas de *Bacillus polymyxa* tomadas a intervalos de media hora durante 4,5 horas con una magnificación de 20x. Fuente: autor.

En las Figuras 4, 5 y 6 se puede observar la evolución espacio temporal de las colonias. De acuerdo a las características del microscopio se puede decir que las colonias observadas en estas figuras alcanzaron alturas aproximadas de 450 micras, 300 micras y 240 micras respectivamente, además de esto alcanzaron un diámetro aproximado de entre 100 a 350 micras.

2.1.1.2. *Staphylococcus aureus*

En la Figura 7, se pueden observar las imágenes adquiridas el día 4 de Marzo de 2011, con un objetivo de 20x. Se hizo un seguimiento de 6 horas en las cuales se tomaron cerca de 85 imágenes a un paso de 1 micra cada media hora. Donde se aprecia la evolución espacio temporal de esta bacteria, cuyas colonias durante el tiempo observado lograron alcanzar una altura de aproximadamente 85 micras y un diámetro aproximado de 100 micras.

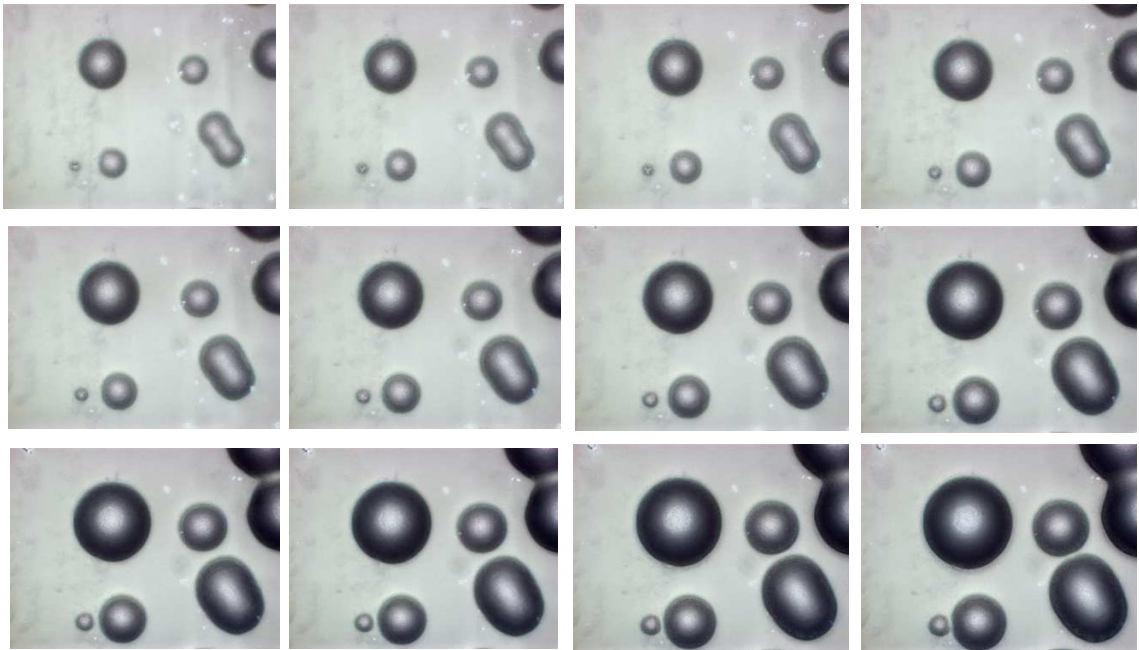


Figura 7. Secuencia de imágenes autofocalizadas de *Staphylococcus aureus* tomadas a intervalos de media hora durante 6 horas con una magnificación de 20x. Fuente: autor.

De esta bacteria no se pudo hacer la adquisición de más imágenes debido a que las condiciones ambientales del laboratorio no permitieron que crecieran normalmente las colonias, por lo cual a medida que avanzaba el tiempo no se veía cambio alguno frente al microscopio.

2.1.1.3. *Micrococcus sp.*

En la Figura 8, se pueden observar las imágenes adquiridas el día 8 de Marzo de 2011, con un objetivo de 20x. Se hizo un seguimiento de 6 horas en las cuales se tomaron cerca de 60 imágenes a un paso de 3 micras cada media hora. Donde se aprecia la evolución espacio temporal de esta bacteria, cuyas colonias en el tiempo observado lograron alcanzar una altura aproximada de 180 micras y un diámetro de 50 a 80 micras aproximadamente.

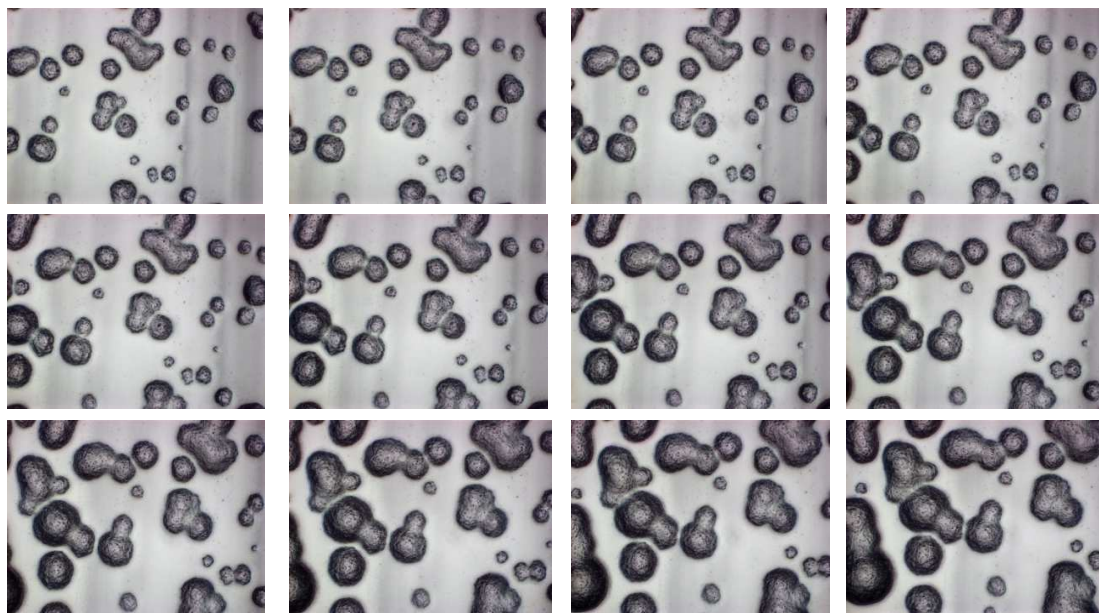


Figura 8. Secuencia de imágenes autofocalizadas de *Micrococcus sp.* tomadas a intervalos de media hora durante 6 horas con una magnificación de 20x. *Fuente: autor.*

Además de las condiciones ambientales del laboratorio que no permitían el crecimiento normal de las colonias, se presentaron daños en la fuente de iluminación y de energía del microscopio; por lo cual no se pudo volver a hacer uso de él hasta que se hiciera efectiva la garantía y la empresa hiciera las reparaciones pertinentes, lo cual tomó cerca de 8 meses.

Debido a que *Bacillus polymyxa* fue la primera bacteria en trabajarse y la que menos fue afectada por el ambiente del laboratorio, con ella se pudieron obtener varias imágenes detalladas de sus colonias como se muestra a continuación:

En la Figura 9, se pueden observar las imágenes adquiridas el día 19 de Agosto de 2010, con un objetivo de 5x. Se tomaron cerca de 200 imágenes a un paso de 2 micras.

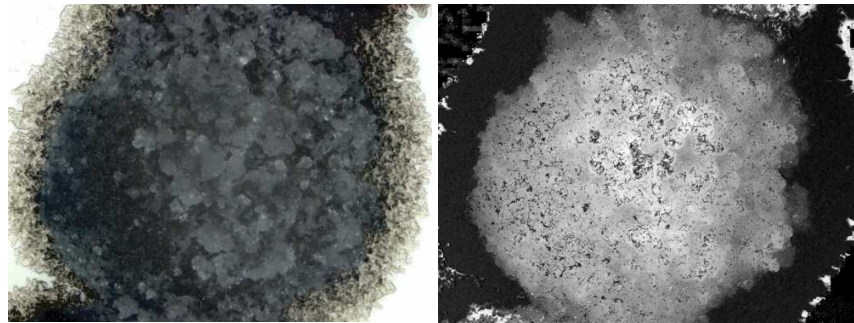


Figura 9. Colonia de *Bacillus polymyxa* con un tamaño aproximado de 400 micras. **(a)** Imagen de textura obtenida por profundidad de campo extendida. **(b)** Imagen de la topografía de la colonia. *Fuente: autor.*

En la Figura 10, se pueden observar las imágenes adquiridas el día 31 de Mayo de 2013, con un objetivo de 5x. Se tomaron cerca de 183 imágenes a un paso de 3 micras.

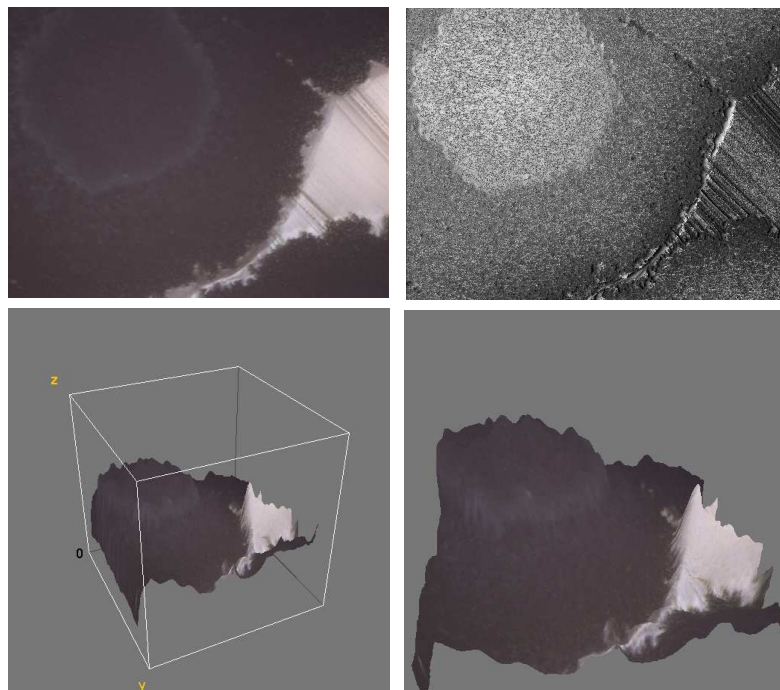


Figura 10. Colonia de *Bacillus polymyxa* con un tamaño aproximado de 549 micras. **(a)** Imagen de textura obtenida por profundidad de campo extendida. **(b)** Imagen de la topografía de la colonia. **(c)** y **(d)** Representación en 3D de la colonia hecha en ImageJ 1.43c. *Fuente: autor.*

En la Figura 11, se pueden observar las imágenes adquiridas el día 31 de Mayo de 2013, con un objetivo de 5x. Se tomaron cerca de 190 imágenes a un paso de 1 micra.

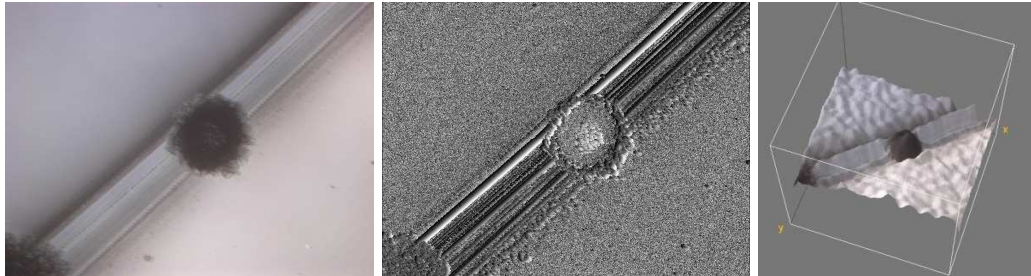


Figura 11. Colonia de *Bacillus polymyxa* con un tamaño aproximado de 190 micras. **(a)** Imagen de textura. **(b)** Imagen de topografía y **(c)** Representación en 3D de la colonia hecha en ImageJ 1.43c. *Fuente: autor.*

En la figura 12, se pueden observar las imágenes adquiridas el 31 de Mayo de 2013, con un objetivo de 20x. Se tomaron cerca de 134 imágenes a un paso de 2 micras.

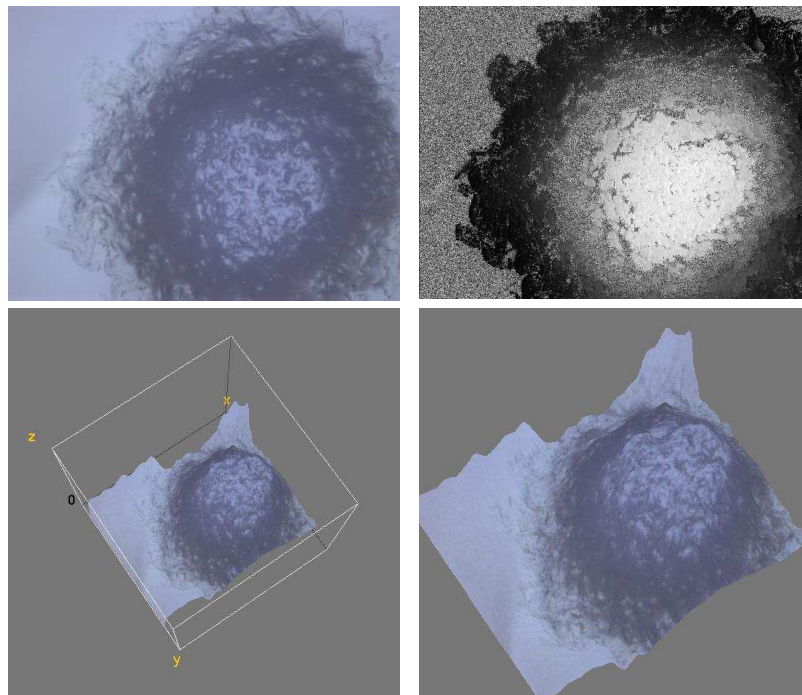


Figura 12. Colonia de *Bacillus polymyxa* con un tamaño aproximado de 286 micras. **(a)** Imagen de textura obtenida por profundidad de campo extendida. **(b)** Imagen de la topografía de la colonia. **(c)** y **(d)** Representación en 3D de la colonia hecha en ImageJ 1.43c. *Fuente: autor.*

En la Figura 13, se puede observar el polímero formado por las bacterias en las imágenes adquiridas el 7 de Junio de 2013, con un objetivo de 20x. Se tomaron cerca de 24 imágenes a un paso de 2 micras.

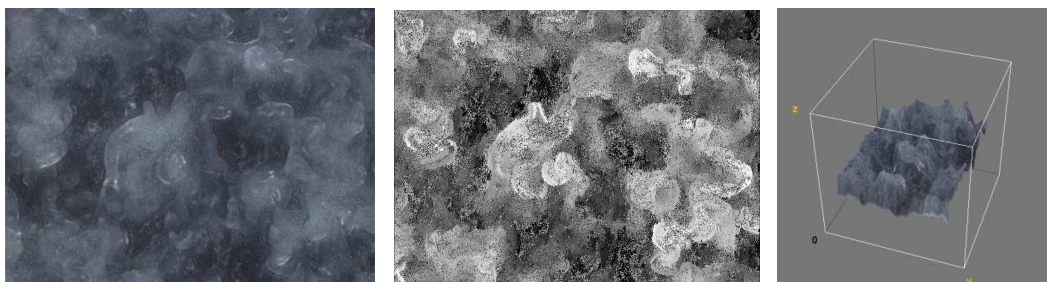


Figura 13. Polímero formado por una colonia de *Bacillus polymyxa* con una altura aproximada de 48 micras. **(a)** Imagen de textura obtenida por profundidad de campo extendida. **(b)** Imagen de la topografía de la colonia. **(c)** Representación en 3D de la colonia hecha en ImageJ 1.43c. Fuente: autor.

2.1.2. AMPLIACIÓN DEL CAMPO DE VISIÓN

Las imágenes de la ampliación del campo de visión se hicieron para *Bacillus polymyxa* debido a que fueron las primeras bacterias con las que se empezó este trabajo y de las cuales se tenían más placas de Petri con las colonias ya formadas, éstas imágenes se presentan a continuación:

En la Figura 14, se pueden observar las imágenes superpuestas de la superficie de una colonia adquiridas el 16 de Agosto de 2013, con un objetivo de 20x. Se tomaron cerca de 165 imágenes.

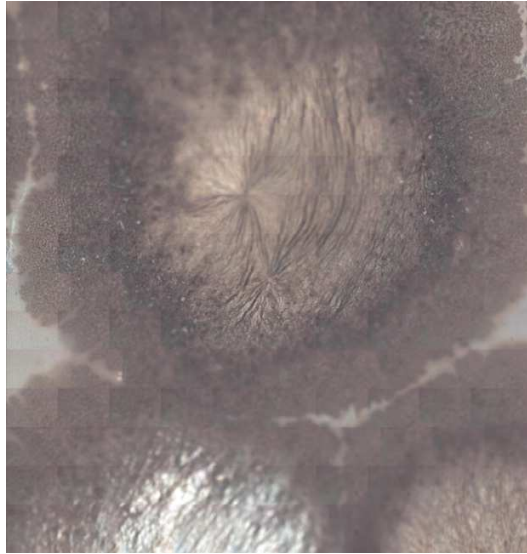


Figura 14. Imagen del estado de la superficie de una colonia de *Bacillus polymyxa*, dimensiones 94 micras x 112 micras. *Fuente: autor.*

En la Figura 15, se pueden observar las imágenes superpuestas de la superficie de una colonia adquiridas el 16 de Agosto de 2013, con un objetivo de 5x. Se tomaron cerca de 25 imágenes.



Figura 15. Imagen del estado de la superficie de una colonia de *Bacillus polymyxa*, dimensiones 58 micras x 100 micras. *Fuente: autor.*

En la Figura 16, se pueden observar las imágenes superpuestas de la superficie de una colonia adquiridas el 18 de Agosto de 2010, con un objetivo de 20x. Se tomaron cerca de 140 imágenes.

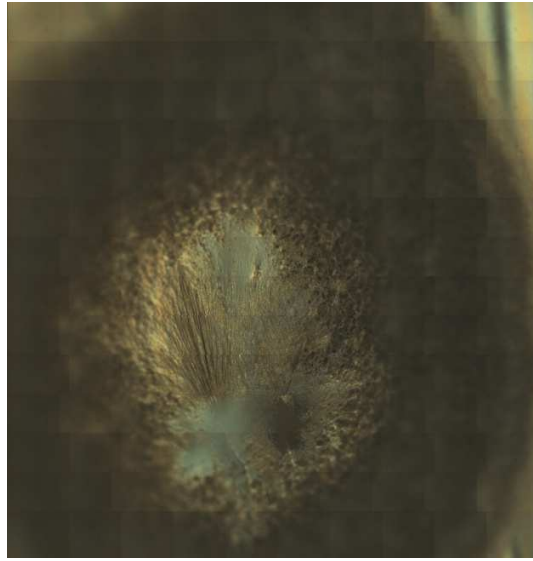


Figura 16. Imagen del estado de la superficie de una colonia de *Bacillus polymyxa*, dimensiones 72 micras x 120 micras. Fuente: autor.

En la Figura 17, se pueden observar las imágenes superpuestas de la superficie de una colonia adquiridas el 7 de Junio de 2013, con un objetivo de 5x. Se tomaron cerca de 16 imágenes.

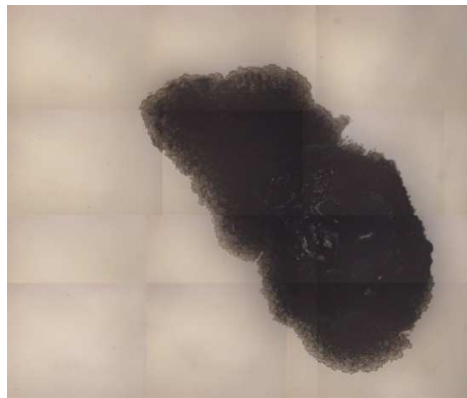


Figura 17. Imagen del estado de la superficie de una colonia de *Bacillus polymyxa*, dimensiones 3 mm x 5 mm. Fuente: autor.

2.2. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES

2.2.1. KURTOSIS

De las imágenes adquiridas por el método de profundidad de campo extendido se obtiene información de rango y de textura a través de la distribución de la intensidad; por lo tanto se puede hacer la caracterización de las texturas a través del estudio de perfiles de superficies que muestran que es en la forma de la distribución de intensidad donde aparecen los aspectos de los cambios de la imagen. El momento de orden 4 normalizado también llamado kurtosis, mide la agudeza de la distribución de intensidad. Los valores se comparan con el valor de la kurtosis de la distribución de Gauss que es 3. Un valor mayor implica, generalmente, una distribución con un pico más agudo, es decir, que la mayoría de los valores se encuentran concentrados en un rango pequeño. Un valor menor habla de una distribución más plana. [17]

De esta forma aplicando el método de *Moment Calculator* [8] en ImageJ 1.43c [16] para las imágenes de las Figuras del numeral 2.1.2. Se tiene lo siguiente:

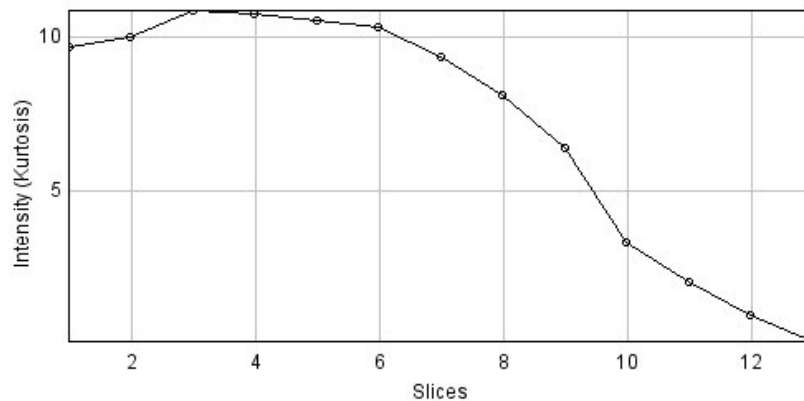


Figura 18. Variación del parámetro estadístico de kurtosis durante el crecimiento de colonias de *Bacillus polymyxa* mostrado en la Figura 4. Fuente: autor.

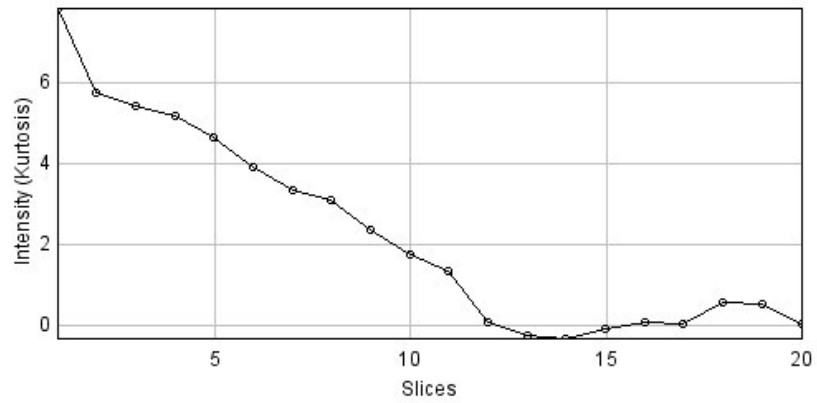


Figura 19. Variación del parámetro estadístico de kurtosis durante el crecimiento de colonias de *Bacillus polymyxa* mostrado en la Figura 5. Fuente: autor.

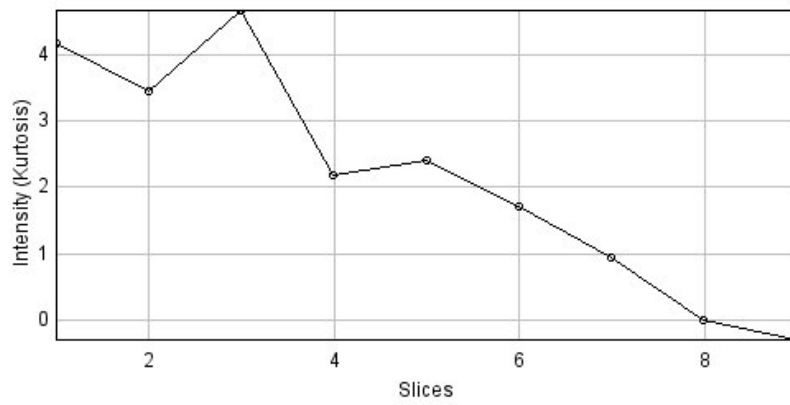


Figura 20. Variación del parámetro estadístico de kurtosis durante el crecimiento de colonias de *Bacillus polymyxa* mostrado en la Figura 6. Fuente: autor.

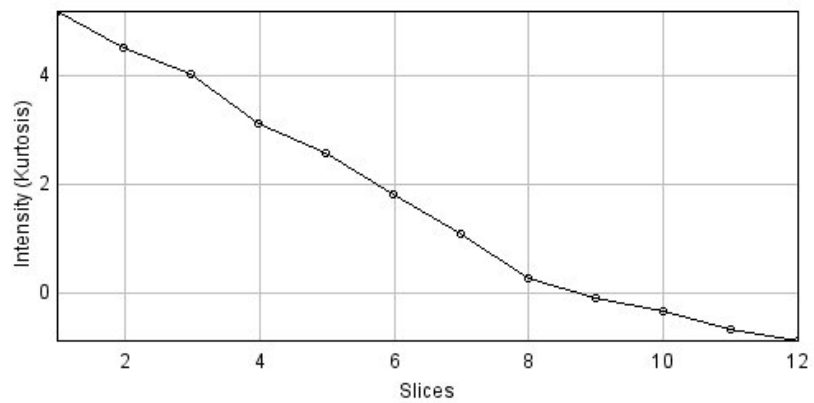


Figura 21. Variación del parámetro estadístico de kurtosis durante el crecimiento de colonias de *Staphylococcus aureus* mostrado en la Figura 7. Fuente: autor.

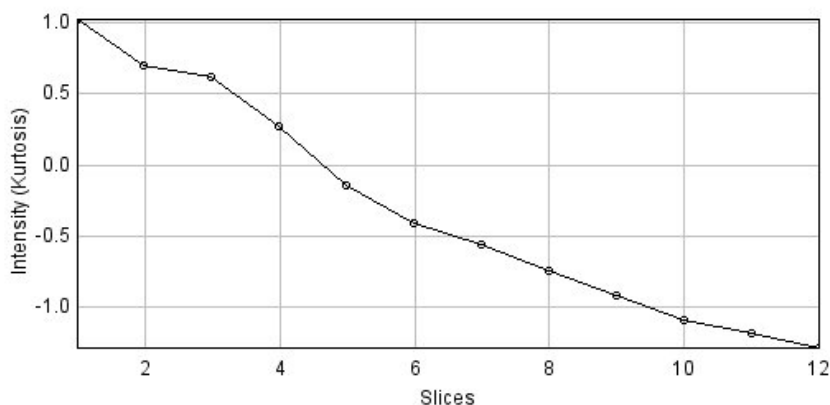


Figura 22. Variación del parámetro estadístico de kurtosis durante el crecimiento de colonias de *Micrococcus sp.* mostrado en la Figura 8. Fuente: autor.

Observando las Figuras 18, 19, 20, 21 y 22, Podemos decir que presentan un comportamiento similar, empieza con una kurtosis positiva, es decir, que la distribución tiene más picos que la distribución normal (Gaussiana); esto se traduce en que la población de bacterias está creciendo rápidamente a medida que consume los nutrientes, es decir se encuentra en fase exponencial. Luego de esto la kurtosis se vuelve negativa; es decir, que la distribución se vuelve más plana que la distribución normal (Gaussiana), por lo tanto a medida que pasa el tiempo y se van consumiendo los nutrientes, el crecimiento poblacional entra en la fase estacionaria.

2.2.2. DIMENSIÓN FRACTAL

Los fractales son conjuntos matemáticos con un alto grado de complejidad que pueden modelar muchos fenómenos naturales. Desde hace un tiempo el modelado de fractales y sus conceptos asociados se han convertido en importantes herramientas en diversas áreas de las ciencias naturales, principalmente debido a que el modelado de fractales no supone que los objetos estudiados tengan buenas propiedades de continuidad y suavidad. Una de las características más importantes de la geometría fractal es que permite la caracterización de irregularidades que no pueden tratarse mediante la geometría euclidiana. Como resultado, se definen varias características fractales, entre las cuales la dimensión fractal es una de las más importantes [19].

De esta forma aplicando el método de *Box-counting* [20] en ImageJ 1.43c [16] se hizo el análisis de la naturaleza fractal para las imágenes de las Figuras del numeral 2.1.2. Por lo cual se obtuvo lo siguiente:

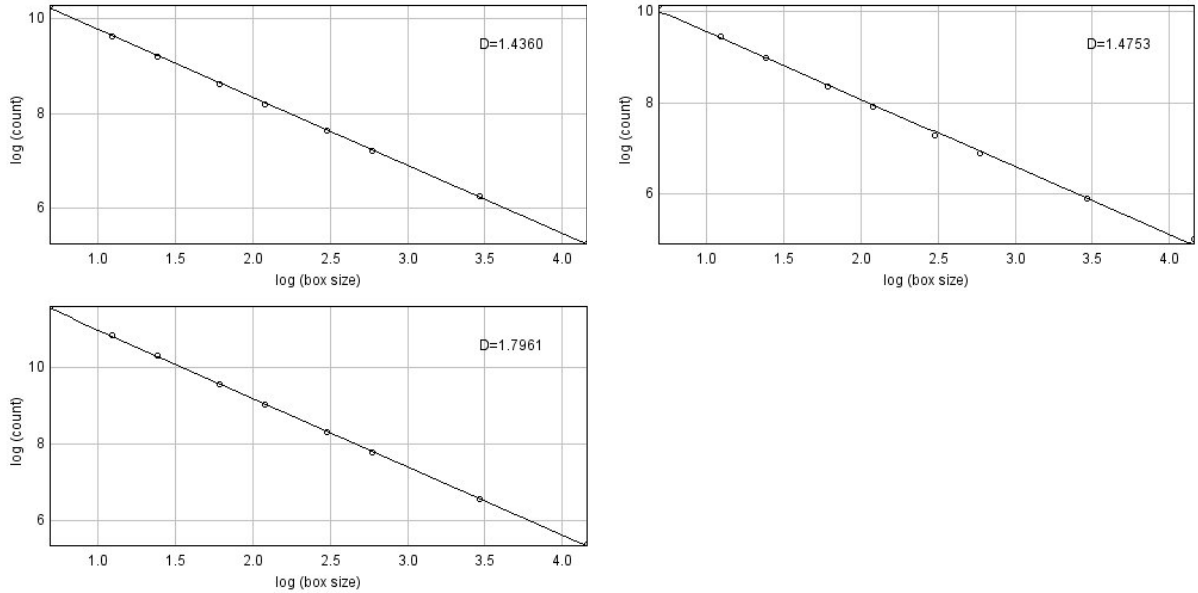


Figura 23. Dimensión fractal para algunas de las imágenes obtenidas durante el crecimiento de colonias de *Bacillus polymyxa* mostradas en la Figura 4. (a) $D=1.4360$ para las 8:00 am. (b) $D=1.4753$ para las 11:00 am y (c) $D=1.7961$ para las 2:30 pm. Fuente: autor.

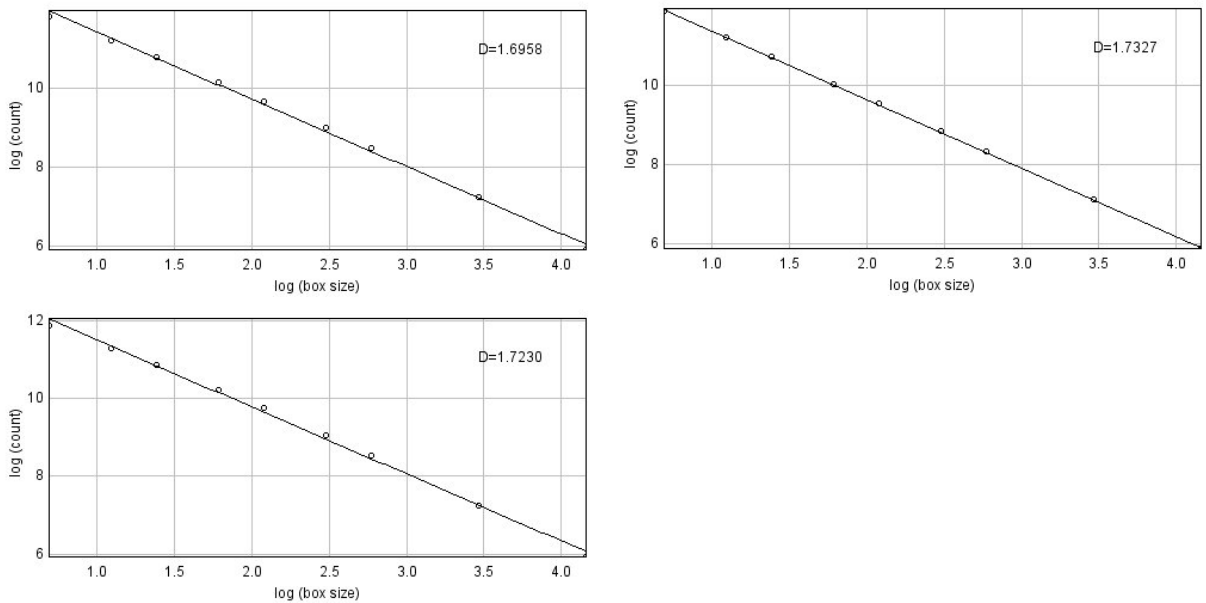


Figura 24. Dimensión fractal para algunas de las imágenes obtenidas durante el crecimiento de colonias de *Bacillus polymyxa* mostradas en la Figura 5. (a) $D=1.6958$ para las 8:00 am. (b) $D=1.7327$ para la 1:00 pm y (c) $D=1.7230$ para las 5:00 pm. Fuente: autor.

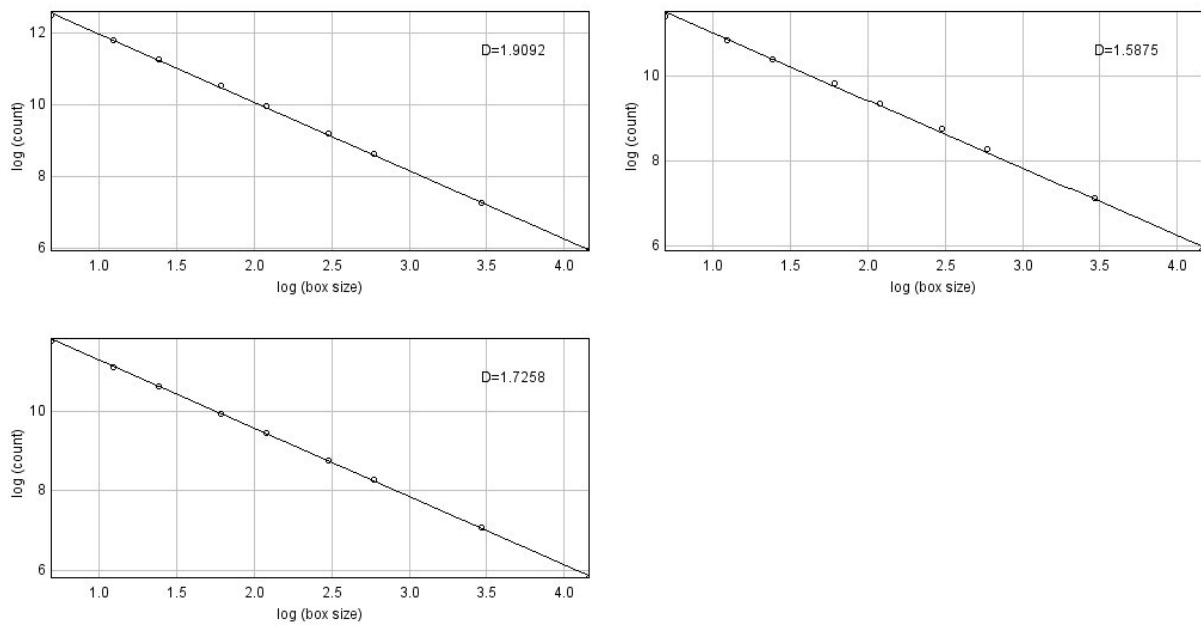


Figura 25. Dimensión fractal para algunas de las imágenes obtenidas durante el crecimiento de colonias de *Bacillus polymyxa* mostradas en la Figura 5. (a) $D=1.9092$ para las 8:00 am. (b) $D=1.5875$ para la 10:00 am y (c) $D=1.7258$ para las 12:00 pm. Fuente: autor.

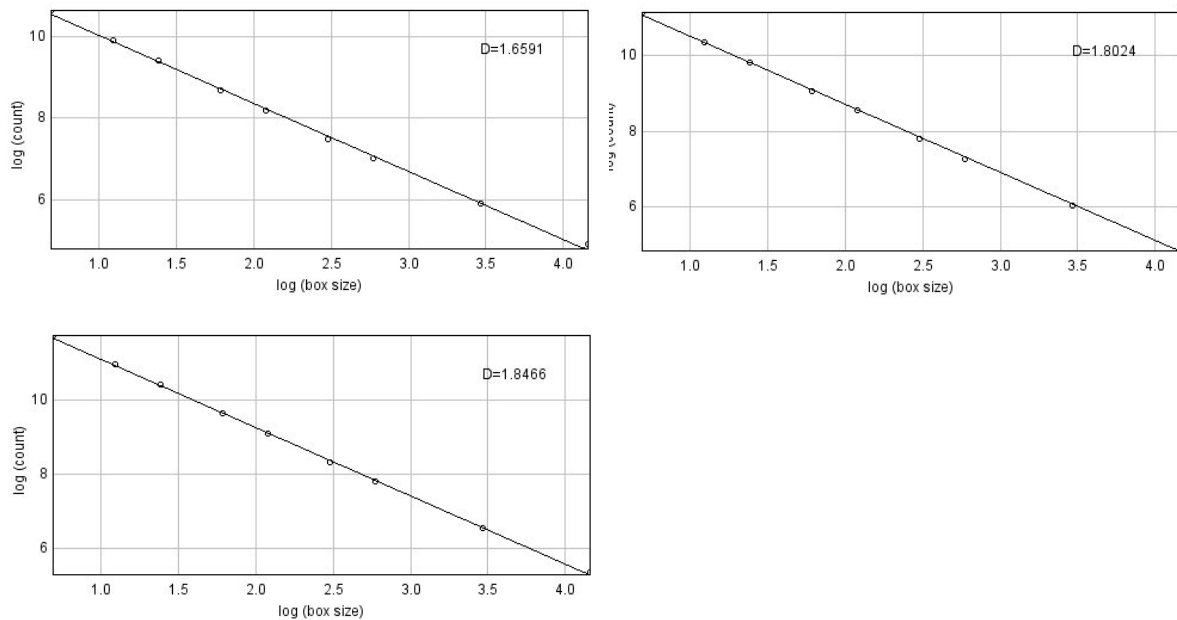


Figura 26. Dimensión fractal para algunas de las imágenes obtenidas durante el crecimiento de colonias de *Staphylococcus aureus* mostradas en la Figura 7. (a) $D=1.6591$ para las 8:00 am. (b) $D=1.8024$ para la 10:30 am y (c) $D=1.8466$ para las 1:30 pm. Fuente: autor.

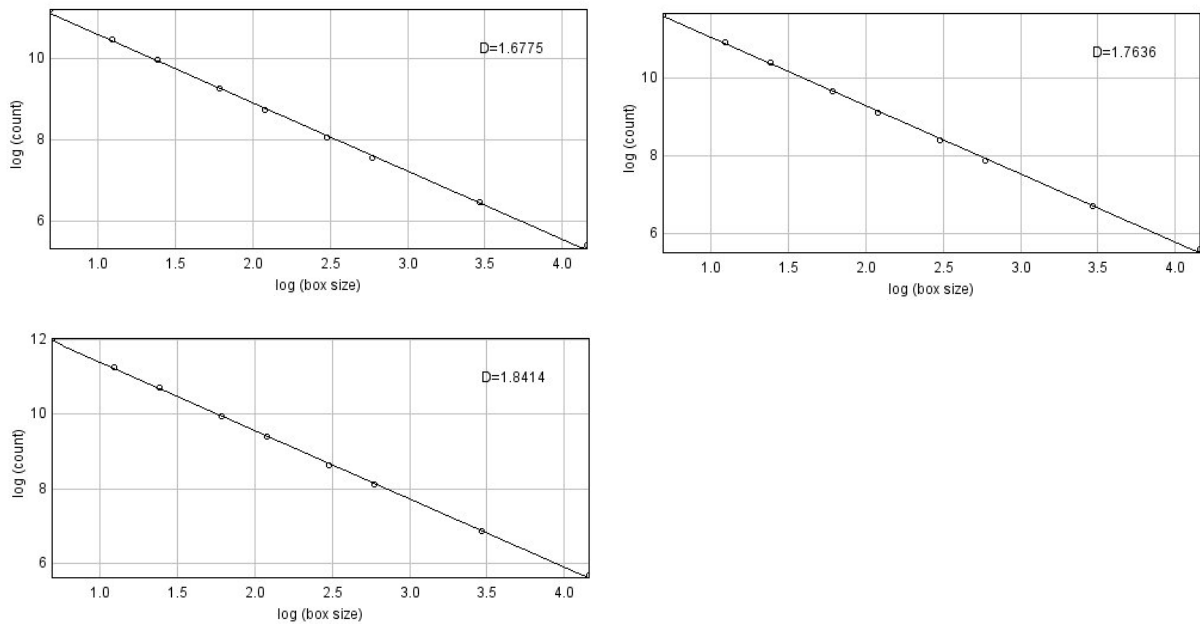


Figura 27. Dimensión fractal para algunas de las imágenes obtenidas durante el crecimiento de colonias de *Micrococcus sp.* mostradas en la Figura 8. (a) $D= 1.6775$ para las 8:00 am. (b) $D=1.7636$ para la 10:30 am y (c) 1.8414 para las 1:30 pm. Fuente: autor.

Como se puede ver se graficó el número de cajas *count* que contiene cada imagen versus el tamaño de las cajas *box size*, la pendiente de la gráfica representa la dimensión fractal.

Para las colonias de *Bacillus polymyxa*, se tiene una dimensión fractal promedio de 1.6757, en el caso de las colonias de *Staphylococcus aureus*, se tiene una dimensión fractal promedio de 1.7693 y para las colonias de *Micrococcus sp.* se tiene una dimensión fractal promedio de 1.7608. Lo cual indica un crecimiento de la colonia con microorganismos sin mucho movimiento, es decir un crecimiento estático. [19] Además son congruentes con los valores reportados por [15] que están entre ± 1.73 , donde también observaron que la dimensión fractal aumenta en medios con altos niveles de nutrientes y disminuye en medios con alta rugosidad, llegando a tener valores menores que 1, es decir no son estructuras fractales.

3. SIMULACIÓN

Con el fin de entender mejor el proceso de crecimiento de las colonias bacterianas y establecer relaciones entre un modelo teórico y lo observado en la adquisición de las imágenes, se asumió que el movimiento de las bacterias podía ser considerado como la simple difusión de una partícula y por lo tanto se empleó el Modelo de Reacción-Difusión a través de las ecuaciones mostradas en [10]. Las ecuaciones de reacción-difusión para la densidad de bacterias b y la concentración de nutrientes n son descritas como:

$$\frac{\partial b}{\partial t} = D_b \nabla^2 b + \frac{kn}{K_s + n} b \quad (1)$$

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D_n \nabla^2 n - \frac{\alpha kn}{K_s + n} b \quad (2)$$

Donde D_b y D_n son los coeficientes de difusión de las bacterias y los nutrientes respectivamente. k , K_s y α son la constante de la rata de reacción, la constante de Michaelis y la eficiencia de los nutrientes respectivamente. Los segundos términos en el lado derecho de las ecuaciones (1) y (2) corresponden a la reproducción de las bacterias y al consumo de los nutrientes respectivamente.

Las ecuaciones (1) y (2) fueron solucionadas mediante el Método Implícito de Dirección Alternante mostrado en [21] que proporciona un medio para resolver ecuaciones diferenciales parciales parabólicas en dos dimensiones espaciales usando matrices tridiagonales.

La discretización para b se muestra a continuación:

$$-\lambda_b b_{i,j+1}^{\ell+\frac{1}{2}} + 2(1 + \lambda_b) b_{i,j}^{\ell+\frac{1}{2}} - \lambda_b b_{i,j-1}^{\ell+\frac{1}{2}} = \lambda_b b_{i+1,j}^{\ell} + 2(1 - \lambda_b) b_{i,j}^{\ell} + \lambda_b b_{i-1,j}^{\ell} + \Delta t \frac{kn_{i,j}^{\ell} b_{i,j}^{\ell}}{K_s + n_{i,j}^{\ell}} \quad (3)$$

$$-\lambda_b b_{i,j+1}^{\ell+1} + 2(1 + \lambda_b) b_{i,j}^{\ell+1} - \lambda_b b_{i,j-1}^{\ell+1} = \lambda_b b_{i+1,j}^{\ell+1/2} + 2(1 - \lambda_b) b_{i,j}^{\ell+1/2} + \lambda_b b_{i-1,j}^{\ell+1/2} + \Delta t \frac{kn_{i,j}^{\ell} b_{i,j}^{\ell}}{K_s + n_{i,j}^{\ell}} \quad (4)$$

La discretización para n está dada por las siguientes ecuaciones:

$$-\lambda_n n_{i,j+1}^{\ell+1/2} + 2(1 + \lambda_n) n_{i,j}^{\ell+1/2} - \lambda_n n_{i,j-1}^{\ell+1/2} = \lambda_n n_{i+1,j}^{\ell} + 2(1 - \lambda_n) n_{i,j}^{\ell} + \lambda_n n_{i-1,j}^{\ell} - \Delta t \frac{kn_{i,j}^{\ell} b_{i,j}^{\ell}}{K_s + n_{i,j}^{\ell}} \quad (5)$$

$$-\lambda_n n_{i,j+1}^{\ell+1} + 2(1 + \lambda_n) n_{i,j}^{\ell+1} - \lambda_n n_{i,j-1}^{\ell+1} = \lambda_n n_{i+1,j}^{\ell+1/2} + 2(1 - \lambda_n) n_{i,j}^{\ell+1/2} + \lambda_n n_{i-1,j}^{\ell+1/2} - \Delta t \frac{kn_{i,j}^{\ell} b_{i,j}^{\ell}}{K_s + n_{i,j}^{\ell}} \quad (6)$$

Donde $\lambda_b = D_b \frac{\Delta t}{(\Delta x)^2}$ y $\lambda_n = D_n \frac{\Delta t}{(\Delta x)^2}$. En el primer medio paso de tiempo que va desde ℓ hasta $\ell+1/2$, que son las ecuaciones (3) y (5) la dimensión implícita es Y y en el segundo medio paso de tiempo que va desde $\ell+1/2$ hasta $\ell+1$, que son las ecuaciones (4) y (6) la dimensión implícita es X .

Las ecuaciones (3), (4), (5) y (6) fueron solucionadas por el programa implementado en Matlab mostrado en [9] con una malla bidimensional cuadrada (1600x1600). Con las siguientes condiciones iniciales: La distribución inicial de bacterias se eligió como una distribución normal $\beta_0(r, 0) = \beta_M \exp\{-(x^2 + y^2)/6.25\}$, donde β_M es la máxima densidad en el centro del plano, con un paso de tiempo y un ancho de malla de $\Delta t = 0.1414$, $\Delta x = 0.4205$ respectivamente [14]. La distribución inicial de nutrientes se hizo de la forma $n(r, 0) = n_0 + \eta(r, 0)$, donde η es un número aleatorio en el intervalo (-0.1,0.1) [15]. Con constantes de difusión $D_b = 1.3 \times 10^{-4}$ y $D_n = 2.3 \times 10^{-2}$, constante de la rata de reacción $k = 0.6$, constante de Michaelis $K_s = 1.5$ y eficiencia de nutrientes $\alpha = 1 \times 10^{-9}$ [10].

Los patrones espacio temporal simulados tanto de bacterias como de nutrientes son mostrados a continuación:

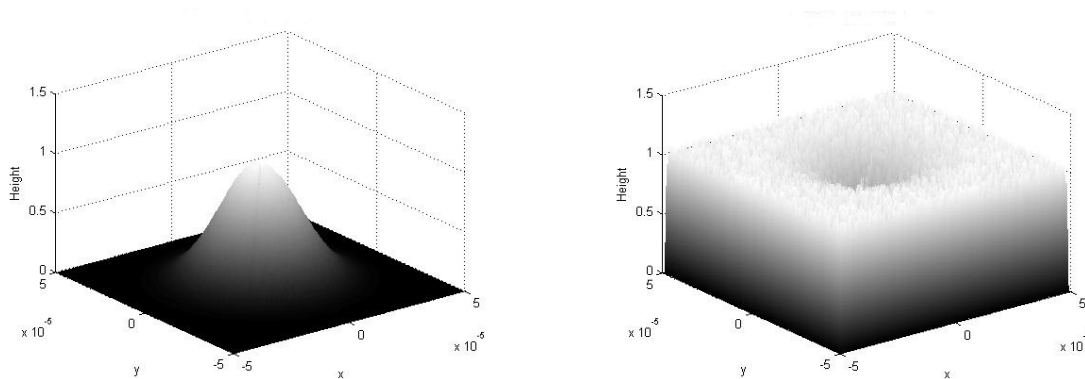


Figura 28. (a) Densidad de bacterias. (b) concentración de nutrientes. Para $n_0=1$, en iteración=5 y propagación en el eje Z. Fuente: autor.

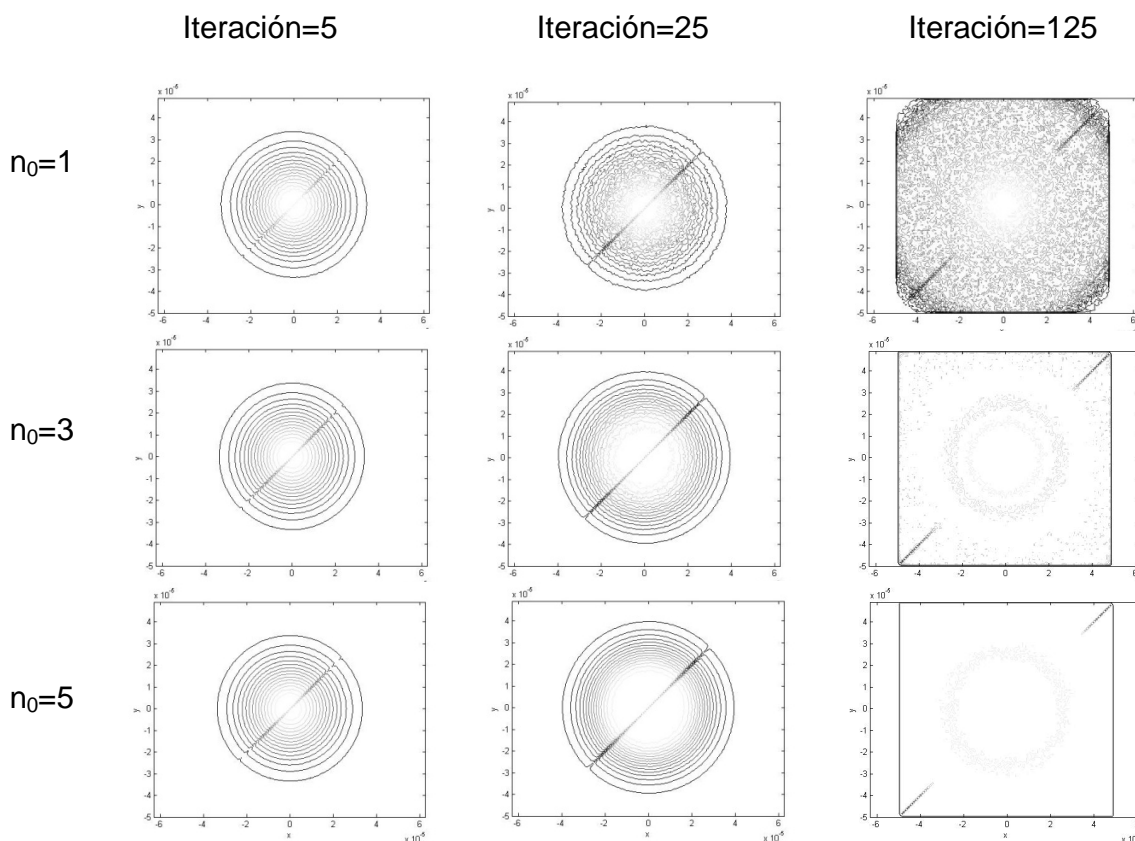


Figura 29. Cambios morfológicos de las colonias debido al incremento de n_0 . Fuente: autor.

La formación de anillos concéntricos mostrados en la Figura 29, corresponden a incrementos en la concentración de los nutrientes, en estas regiones las bacterias presentan un comportamiento dinámico, que va de fases de consolidación a fases de migración y viceversa, este tipo de ciclos son periódicos [15].

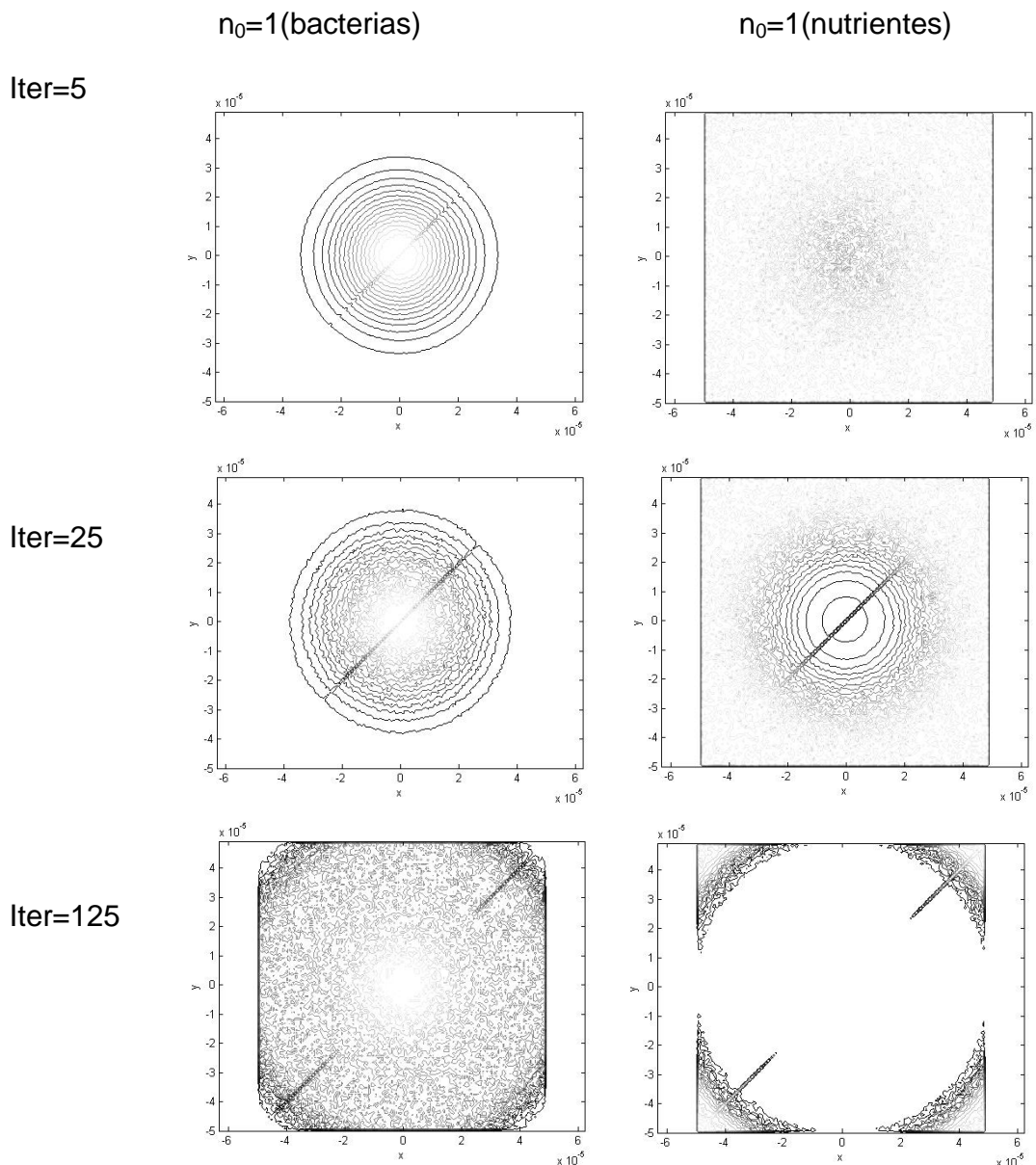


Figura 30. Evolución temporal de la densidad de bacterias y de la concentración de nutrientes. *Fuente: autor.*

Como se puede ver en la Figura 30, el inoculo inicial se esparce radialmente al principio, que luego es limitado debido a que el nivel de concentración de nutrientes decrece, cuando los nutrientes se agotan por completo dentro de la colonia, aún quedan suficientes nutrientes fuera de la colonia de manera que las bacterias situadas en la periferia pueden proliferar [14].

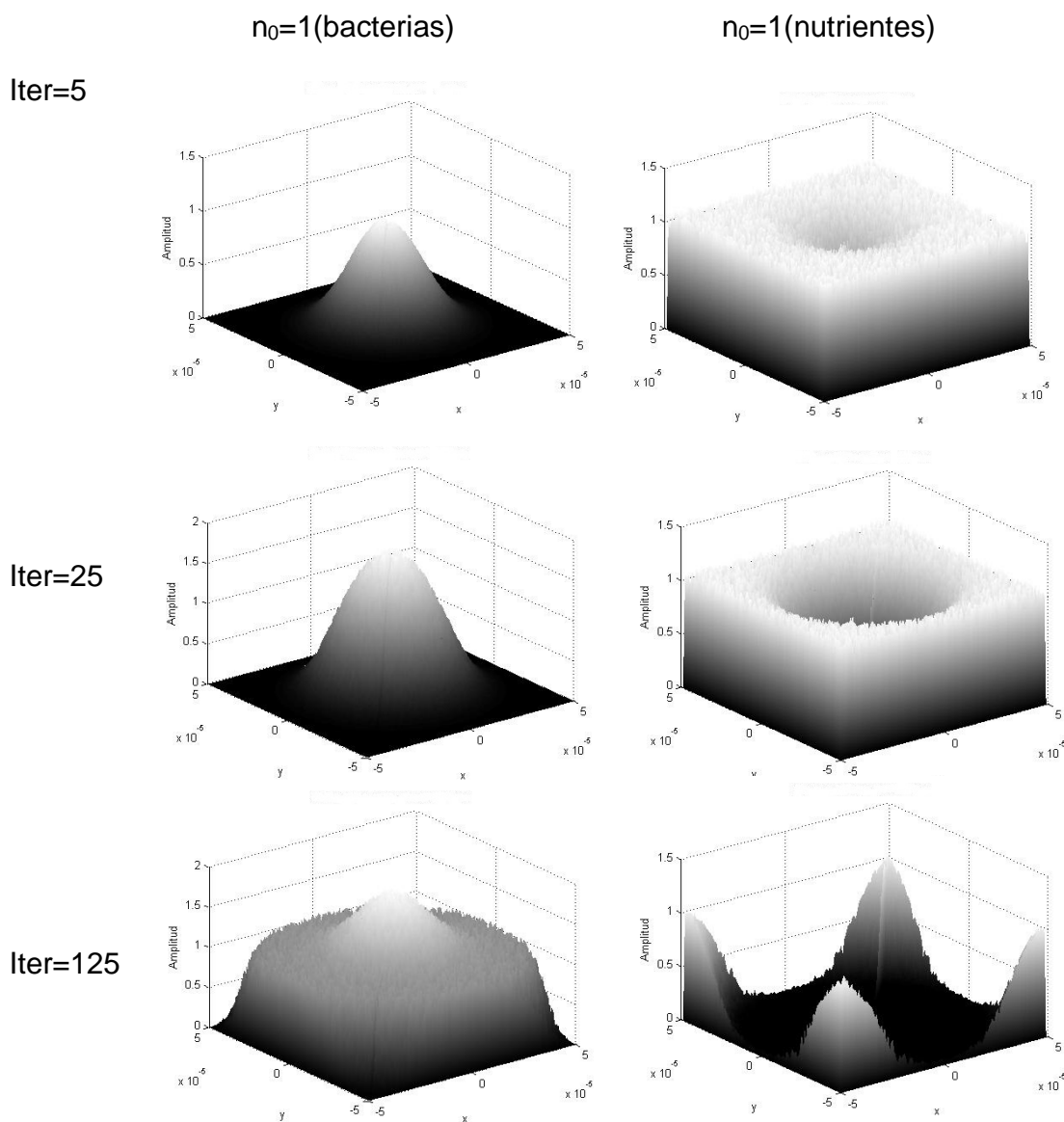


Figura 31. Evolución temporal de la densidad de bacterias y de la concentración de nutrientes vista en 3D. Fuente: autor.

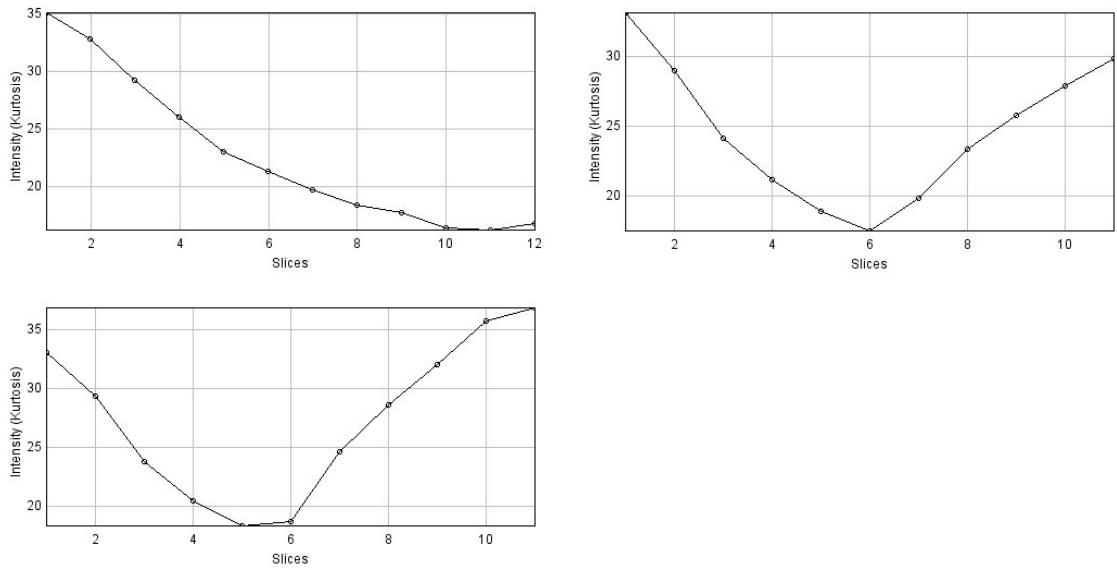
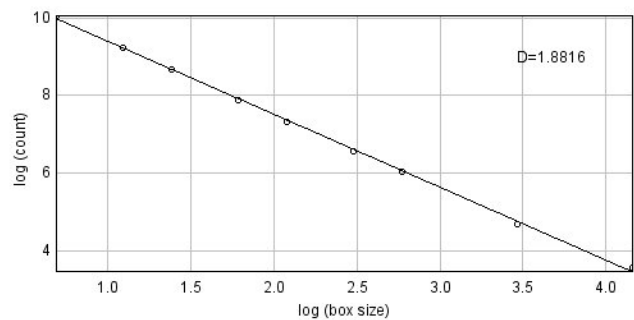
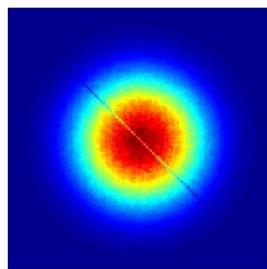


Figura 32. Grafica de los valores kurtosis para las imágenes de la **Figura 29**, (a) $n_0=1$, (b) $n_0=3$ y (c) $n_0=5$.
Fuente: autor.

La Figura 32 muestra la variación de la kurtosis con respecto a la concentración de nutrientes, para $n_0=1$ la kurtosis decrece, es decir la superficie se vuelve más plana, mientras que para $n_0=3$ y $n_0=5$ hay un decrecimiento en la primera mitad y por lo tanto las superficies son mas planas, pero en la segunda mitad hay un aumento del parámetro que indica que a mayor concentración de nutrientes la superficie tiene más picos que la distribución Gaussiana, es decir hay más alimento para las bacterias y por lo tanto la colonia puede crecer.

$n_0=1$



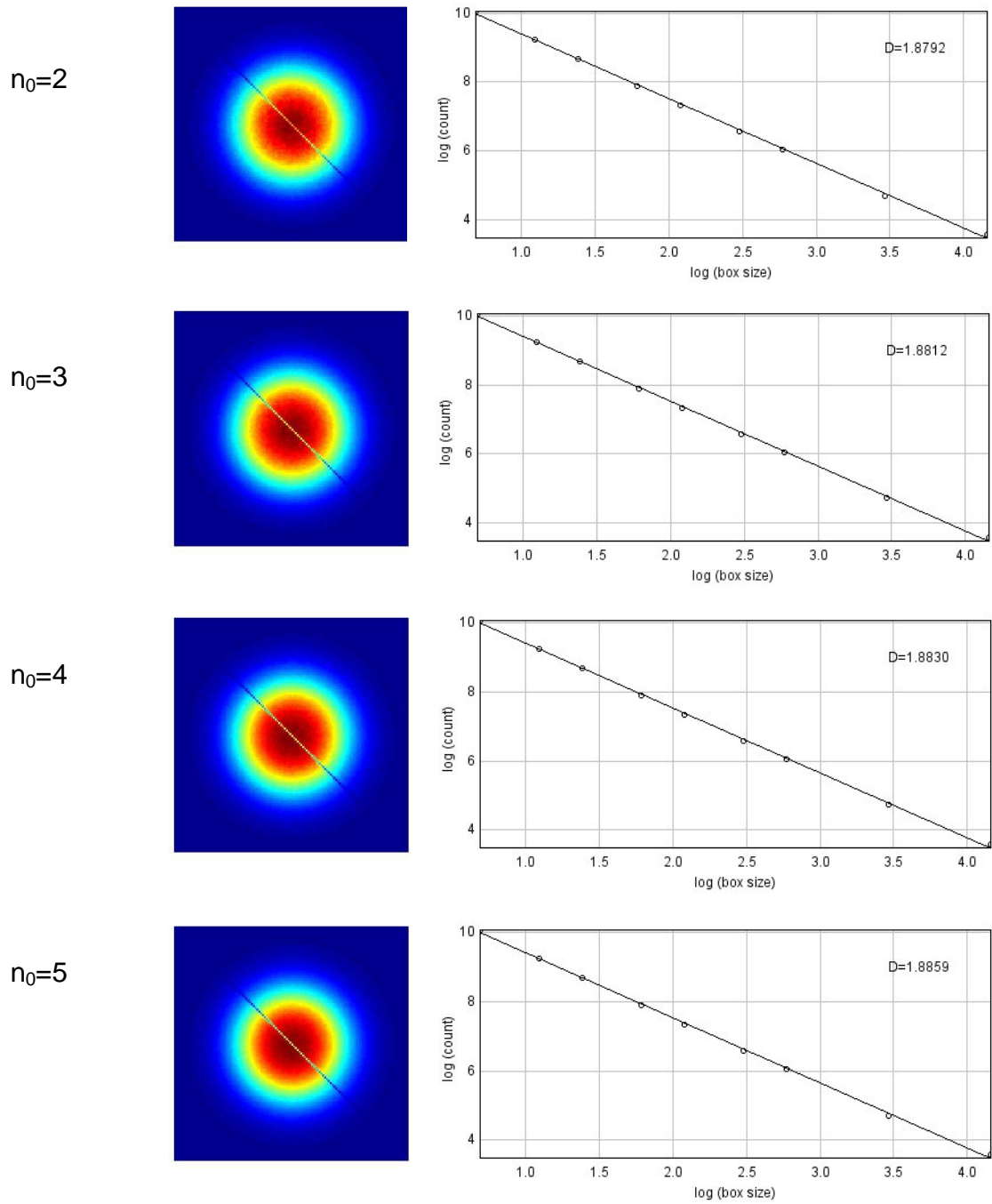


Figura 33. Dimensión fractal de los patrones espacio temporal con iteración=20 para (a) $n_0=1$, (b) $n_0=2$, (c) $n_0=3$, (d) $n_0=4$ y (e) $n_0=5$. Fuente: autor.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Realizando el proceso adaptativo con métodos tales como la profundidad de campo extendida y la ampliación del campo de visión, se consigue un aumento de contraste y una reducción del desenfoque de las imágenes, evitando así, los detalles que no proporcionan información significativa de la muestra.
- A través de las imágenes obtenidas por el método de la profundidad de campo extendida se pueden obtener parámetros estadísticos de orden superior como la kurtosis. En las Figuras 18 a 22 se puede ver que existe una relación inversa entre éste parámetro y el crecimiento de la colonia.
- A partir de las imágenes obtenidas por el método de profundidad de campo extendida también se obtiene información tridimensional de la muestra mediante las imágenes de topografía y de textura, con ellas se consigue una imagen sintética en la cual se puede cuantificar en iguales condiciones todos los componentes de la muestra para crear así reconstrucciones en 3D, ya que los pasos a los que se adquieren las imágenes son de hecho alturas reales. Esto puede verse en las Figuras 10 a 13.
- A través de las imágenes obtenidas por el módulo de MosaiX del microscopio mediante la ampliación del campo de visión, se pueden obtener características físicas de las colonias tales como altura y diámetro, que se ven en las Figuras 14 a 17.
- Al hacer el seguimiento del crecimiento de las colonias hay que tener en cuenta las condiciones en las cuales las bacterias se pueden desarrollar; es decir, el tipo de agar utilizado, el espesor y la dureza de éste; las condiciones ambientales como la temperatura, la humedad y la luz. Ya que

para este estudio se presentaron inconvenientes tales como que al principio el agar era muy delgado y debido a la temperatura y humedad del laboratorio, sumado a la exposición permanente de la muestra a la luz focalizada del microscopio, el agar se deshidrató en cuestión de pocas horas y se terminaba despegando de la placa Petri haciendo imposible el seguimiento del crecimiento para el mismo punto del espacio. También se presentó que debido a estas condiciones se presentaban retrasos en el crecimiento de las colonias y pasaban horas sin poder hacerse adquisición de imágenes porque no había cambio alguno que se pudiera registrar.

- Es importante en este tipo de trabajos tener muy claras las normas de bioseguridad en todo momento y no olvidar ninguna de las recomendaciones del asesor para evitar que el microscopio, el laboratorio y las personas cercanas sufran daño alguno, debido a que las muestras eran transportadas fuera del laboratorio de bacteriología y una de ellas era un patógeno.
- Las colonias bacterianas poseen una estructura fractal, esto se puede observar en los valores mostrados en las Figuras 23 a 27, comprobando lo hecho por [4], el crecimiento estático tiene que ver con que las bacterias se sembraron en un medio sólido y allí su movimiento es muy limitado [10, 14, 15 y 22]. A partir de la Figura 33, se puede decir que la dimensión fractal aumenta cuando aumenta la concentración de nutrientes.
- Varios tipos de modelos matemáticos han sido propuestos para entender los mecanismos de formación del patrón de las colonias usando ecuaciones de reacción-difusión, con los cuales se han reproducido diferentes patrones mediante simulaciones numéricas [10, 14, 15 y 22], en la literatura se reportan cinco clases de patrones exhibidos por *Bacillus subtilis* que son el modelo de agregación limitada por difusión (DLA), la morfología de ramificación densa (DBM), la morfología circular homogénea, los patrones de anillos concéntricos y los patrones densamente poblados mostrados en [14, 15]. Mediante las ecuaciones trabajadas se lograron reproducir los patrones de la morfología de ramificación densa (DBM), los patrones de anillos concéntricos que tienen que ver con la concentración del agar que regula la dureza del medio [22] y los patrones de la morfología circular densa que se pueden ver en las Figuras 29 y 30.

- Al escoger las ecuaciones de reacción-difusión hay que tener en cuenta la complejidad que representa el querer abarcar todos los tipos de formación de patrones, ya que esto supone el consumo de mucho tiempo, conocimiento de métodos numéricos, conocimiento de modelos matemáticos que describan sistemas biológicos, químicos y físicos, además de recursos computacionales. Para este trabajo se estudiaron las ecuaciones planteadas por [15] que resuelven por el método de Runge-Kutta de cuarto orden, pero no fue posible desacoplar las dos ecuaciones para ser solucionadas y los autores de este artículo no fueron de mucha ayuda debido a que el artículo tiene más de 10 años. También se estudiaron las ecuaciones planteadas por [14] que resuelven por el método Implícito de Dirección Alternante, pero estas ecuaciones si bien no son tan complicadas ni dependen de tantos parámetros como las anteriores, tampoco se logró hacer el desacople.

- No se pudo hacer una comparación directa entre las imágenes obtenidas por el microscopio y la imágenes obtenidas mediante la simulación debido que en estas últimas se usaron parámetros adimensionales, además de esto, no se puede saber el tipo de bacteria que se simuló porque este tipo de parámetros no está contemplado en las ecuaciones, ellas están planteadas para simular mecanismos de respuesta a las condiciones del medio y al estrés a las que son sometidas.

- El uso de las herramientas matemáticas de la física y la química para describir sistemas biológicos complejos es cada vez más común y permite desarrollar nuevos materiales basados en formaciones biológicas [9, 10, 12, 11].

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lozupone, C.A., and Knight, R., "Global patterns in bacterial diversity". PNAS 104, 11436-40(2007).
- [2] Davidson, M. W., and Abramowitz, M., "Optical microscopy", 1 de Agosto de 2003, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/pdfs/microscopy.pdf>.
- [3] Murphy, D. B., [Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging], Wiley-Liss Inc., New York, 90-95(2001).
- [4] Biomedical Imaging Group de la École Polytechnique Fédérale de Lausanne, "Extended depth of field", 11 de Julio de 2011. <http://bigwww.epfl.ch/demo/edf/>.
- [5] Zeiss, C. [AxioVision User's Guide], Release 4.8, Carl Zeiss MicroImaging GMBH, Jena 9-115(2009).
- [6] Kuenzel, S., Ladoni, M., Kutsche, E. "paenibacillus polymyxa" 26 de Abril de 2012, http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Paenibacillus_polymyxa.
- [7] Public Health Agency of Canada, "Staphylococcus aureus", 30 de Abril de 2012, <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/staphylococcus-aureus-eng.php>.
- [8] Public Health Agency of Canada, "Micrococcus", 19 de Abril de 2012, <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/micrococcus-eng.php>.
- [9] Bonachela, J. A., Nadell, C. D., Xavier, J. B., Levin, S. A., "Universality in bacterial colonies" J. Stat. Phys. 144, 303–315 (2011).
- [10] Eiha, N., Komoto, A., Maenosono, S., Wakano, J. Y., Yamamoto, K., Yamaguchi, Y., "The mode transition of the bacterial colony" Physica A 313, 609-624(2002).
- [11] Schultz, D., Lu, M., Stavropoulos, T., Onuchic, J., & Ben-Jacob, E., "Turning Oscillations Into Opportunities: Lessons from a Bacterial Decision Gate", 27 de Junio de 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3627974/pdf/srep01668.pdf>.

- [12] Murray, J. D., [Mathematical Biology II: Spatial Models and Biomedical Applications], Springer-Verlag, Berlin, 71-310 (2003).
- [13] Guevara E., "3-D Simulation of a gaussian pulse propagated in free space", 18 de Mayo de 2007, http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/16102-finite-differences-beam-propagation-method-in-3-d/content/FDBPM3D_free_space.m.
- [14] Kawasaki, K., Mochizuki, A., Matsushita, M., Umeda, T., and Shigesada, N., "Modelling spatio-temporal patterns generated by *Bacillus subtilis*" J. theor. Biol. 188, 177-185(1997).
- [15] Lacasta, A. M., Cantalapiedra, I. R., Auget, E. C., Peñaranda, A., and Ramírez-Psicina, L., "Modelling of spatiotemporal patterns in bacterial colonies" PRE 59, 7036-7041(1999).
- [16] Wayne Rasband National Institutes of health, USA, "ImageJ 1.47c" 8 de Septiembre de 2012, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
- [17] Brudny, P., Pérez, L., D'Attellis, C., "Análisis de señales por métodos estadísticos", 21 de Agosto de 2013. http://www.cnea.gov.ar/cac/glea/trabajos/analisis_senales.pdf.
- [18] Francois, R., University of Ottawa - Earth Sciences, "Moment Calculator", 9 de Febrero de 2007, <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/moments.html>.
- [19] Cattaneo, C. A., Biasonia, E. M., Larchera, L. I., Ruggeria, A. I., Gómez Khairallaha, A. O., "Aplicación de dimensión fractal al estudio de sistemas naturales" Mecánica Computacional XXVIII, 2021-2038(2009).
- [20] Karperien, A., "Box-countig method", Charles Sturt University, Canadá, 2007 a 2012 , <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/fractac/FLHelp/BoxCounting.htm>.
- [21] Chapra, S., Canale, R., [Metodos numéricos para ingenieros], Mc Graw Hill, 900-904 (2003).
- [22] Nishiyama, A., Tokihiro, T., Badoual, M., Grammaticos, B., "Modelling the morphology of migrating bacterial colonies" PhysicaD 239, 1573-1580(2010).