

1 **ANÁLISE DE PADRÕES FRACTAIS DE COLÔNIAS MICROBIANAS**

2 Natália da S. **MENDONÇA**¹; Maxwel A. **ABEGG**; Ana P. **FACCIO**;

3 Universidade Federal do Amazonas – UFAM

4 Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET

5 ¹Bolsista FAPEAM: Graduação em Farmácia

6 natalia_natty04@hotmail.com; maxabegg@gmail.com; apfaccio@yahoo.com.br

7

8 Análise de padrões fractais de colônias microbianas

9 **Resumo**

10 Objetos e fenômenos encontrados na natureza são formas não lineares e por
11 apresentarem irregularidades, dimensão fracionada e complexidade infinita, são
12 descritos pela geometria fractal. A análise fractal na microbiologia pode descrever
13 padrões de crescimento de microrganismos e permite a integração de diversos temas das
14 ciências exatas e da saúde. Certas espécies de bactérias e fungos quando expostas a
15 ambientes que promovam certos tipos de estresse, podem desenvolver estratégias de
16 adaptação e sobrevivência como a formação de colônias complexas, por vezes com
17 geometria fractal, apresentando dimensão fractal entre 1 e 2. Neste estudo, utilizamos
18 diferentes meios de cultura e condições de crescimento, a fim de induzir a formação de
19 colônias fractais por bactérias e leveduras e avaliamos, de forma preliminar, a influência
20 de soro humano no desenvolvimento fractal bacteriano. Através da utilização do
21 software *IMAGEJ* 1.46r e aplicação do método de *Box Counting*, foi possível
22 comprovar a natureza fractal das colônias e averiguar diferenças no padrão de
23 crescimento em função do meio de cultura utilizado e da presença de soro humano. Foi
24 verificado que o soro humano influencia no padrão fractal de microrganismos
25 potencialmente patogênicos e promove, de modo geral, o aumento nas dimensões das
26 colônias, mesmo na presença de atividade inibitória do sistema imune. O presente
27 estudo permitiu a padronização de uso do software referido acima para futuros trabalhos
28 envolvendo a influência de diferentes fatores no crescimento de microrganismos em
29 superfícies sólidas, ocasionalmente envolvendo a formação de colônias fractais.

30 **Palavras-Chave:** geometria fractal, dimensão fractal, *Box Counting*, bactérias,
31 leveduras.

32 **Abstract**

33 Objects and phenomena found in nature are nonlinear forms and present
34 irregularities, fractional dimension and infinite complexity, being described by fractal
35 geometry. The fractal analysis in microbiology can describe growth patterns of
36 microorganisms and allows integration of diverse subjects of sciences and health.
37 Certain species of bacteria and fungi when exposed to environments which promote
38 some types of stress may develop strategies to adapt and survive the formation of
39 complex colonies, sometimes with fractal geometry, with fractal dimensions between 1
40 and 2. In this study, we used culture media and growth conditions to induce fractal
41 colony formation by bacteria, yeasts and evaluated in a preliminary manner, the
42 influence on the development of human serum fractal bacteria. By using the ImageJ
43 1.46r software application Box Counting method, it was possible to prove the fractal
44 nature of the colonies and to evaluate differences in growth pattern depending on
45 culture medium used and the presence of human serum. It was found that human serum
46 influences the fractal pattern of potentially pathogenic microorganisms and promotes, in
47 general, the increase in size of the colonies, even in the presence of the inhibitory
48 activity of the immune system. This study allowed us to standardize the use of the
49 software mentioned above for future work involving the influence of different factors on
50 the growth of microorganisms on solid surfaces, occasionally involving the formation of
51 colonies fractals.

52

53 **Keywords:** fractal geometry, fractal dimension, Box Counting, bacteria, yeasts.

54 1. INTRODUÇÃO

55 Nos anos 60, o matemático Benoît Mandelbrot usou o adjetivo “fractal” para
56 indicar objetos cuja complexidade geométrica não pode ser caracterizada por uma
57 dimensão inteira. O termo fractal deriva do adjetivo latino *fractus*, vindo do verbo
58 *frangere*, cujo significado é “quebrar, fraturar” (Guerrini 1996). O conceito de fractal
59 foi proposto por Mandelbrot como uma forma de descrever dimensões “entre” as
60 dimensões convencionais de 0 a 3 e estruturas que não são nem pontos, linhas e
61 superfícies Euclidianas, nem sólidos (Mandelbrot 1982).

62 A principal atração da geometria fractal vem de sua habilidade de descrever a
63 forma irregular ou fragmentada de aspectos naturais, bem como de outros objetos
64 complexos que a geometria Euclidiana falha em analisar (Lopes e Betrouni 2009).

65 Segundo Menezes e Cunha (2003), existem dois tipos de fractais: os
66 geométricos (determinísticos) e os não lineares (ou aleatórios). Os fractais geométricos
67 ou determinísticos são gerados a partir de reproduções exatas de si mesmos em menor
68 escala. Apesar de suas características especiais, os objetos fractais descritos como
69 determinísticos não permitem descrever inteira ou adequadamente as formas existentes
70 na natureza. Já os fractais não lineares, exibem auto semelhança aproximada. Esta
71 classe recebeu a denominação de fractais não determinísticos e difere dos anteriores por
72 incluir certo grau de aleatoriedade.

73 Das características que definem um fractal, a mais importante é a dimensão
74 fractal, a qual representa o nível de irregularidade de um fractal e pode ser determinada
75 pelo método de aproximação *Box Counting* (método de contagem de caixas), o qual é
76 indicado para formas não lineares. Este método emprega o princípio do preenchimento
77 do objeto e consiste em cobrir a imagem com uma malha de quadrados/caixas, feito a

78 cada interação com caixas sucessivamente menores e a partir daí procede-se a contagem
79 dessas caixas, necessárias para cobrir o objeto (Backes e Bruno 2005). Segundo
80 Papagianni (2006), a dimensão fractal expande a dimensão Euclidiana de forma que esta
81 indica o grau pelo qual o delineamento de uma imagem ou objeto desvia da lisura e
82 regularidade.

83 Teorias comuns do crescimento e fisiologia microbianas são formuladas
84 exclusivamente em termos de microrganismos isolados, especialmente bactérias.
85 Segundo Boschke e Bley (1998), “esta é uma simplificação inadmissível em função de
86 que é óbvio que a organização de populações microbianas e colônias seguem certas
87 regras gerais”.

88 Um aspecto do comportamento cooperativo de bactérias é a formação de
89 colônias complexas com padrões espaço temporais diferentes, conforme necessário para
90 resposta eficiente a condições ambientais difíceis, tais como em ausência de nutrientes,
91 superfícies rígidas, calor extremo e químicos danosos. Para coordenar tais iniciativas
92 cooperativas, bactérias desenvolveram métodos de sinalização célula-célula, incluindo
93 interações físicas diretas, secreção de materiais extracelulares lubrificantes,
94 comunicação bioquímica por moléculas *quorum sensing* e sinalização por quimiotaxia.
95 Estes comportamentos complexos envolvem a ativação de muitos genes e possibilitam a
96 sobrevivência da colônia como um todo (Be'er *et al.* 2009).

97 O comportamento cooperativo é observado em uma ampla gama de
98 microrganismos. Todos possuem um amplo e inesperado repertório de mecanismos de
99 sinalização químicos e físicos. *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* usam
100 quimiotaxia atrativa para recrutar seus pares para detoxificação de seu ambiente.

101 *Paenibacillus dendritiformis* e *Serratia marcescens* cooperativamente produzem
102 lubrificantes nos quais nadam (revisado em Be'er *et al.* 2009).

103 A análise fractal foi introduzida na microbiologia para descrever padrões de
104 crescimento. Foram observadas que diferenças morfológicas de estruturas miceliais
105 fúngicas ou de colônias de bactérias e leveduras tem correlação com patogenicidade
106 (Tremblay e Déziel 2010), bem como com crescimento, atividade metabólica, produção
107 enzimática e pigmentação (Obert *et al.* 1990).

108 Obert *et al.* (1990) foram os primeiros a demonstrar a utilidade da geometria
109 fractal para descrever padrões de crescimento microbiano em diferentes cenários de
110 meios de cultura. Boschke e Bley (1998) testaram leveduras com relação ao seu padrão
111 de crescimento, através da variações de parâmetros do meio como a concentração de
112 nutrientes. Estes autores observaram padrões de crescimento similares aos descritos na
113 literatura para bactérias.

114 Papagianni (2006) demonstrou que a sensibilidade a efeitos de tratamentos é um
115 dos maiores benefícios de utilizar a dimensão fractal. Em qualquer caso, a análise
116 fractal fornece índices quantitativos de morfologia que podem ter aplicabilidade geral e
117 podem ser utilizadas em correlações empíricas ou teóricas entre morfologia e outras
118 propriedades. A atração na análise fractal baseia-se em sua habilidade de quantificar
119 aspectos do desenvolvimento de fungos em crescimento e através disso fornecer uma
120 ferramenta para quantificar objetivamente o efeito de várias mudanças no ambiente de
121 cultivo. Segundo esta autora, desde que dimensões fractais dão uma medida do grau de
122 complexidade e das propriedades de preenchimento de um objeto, pode ser possível que
123 um grande número de parâmetros morfológicos que contribuem para a complexidade
124 geral de partículas, podem ser substituídos por estes índices efetivamente.

125 Neste estudo, objetivou-se gerar informações acerca da análise de colônias
126 fractais de microrganismos a partir de ciências não lineares, capazes de modelar a
127 complexidade tanto estrutural quanto funcional observada nestes fenômenos naturais.
128 Promover a integração das ciências exatas às ciências da saúde, apropriando-se dos
129 conhecimentos da geometria fractal para caracterizar o processo de crescimento de
130 microrganismos. E, desde que, até onde sabemos a influência da ação do soro humano
131 no crescimento de colônias fractais de microrganismos potencialmente causadores de
132 septicemia, não foi previamente determinada, o que levou a realizar este tipo de análise.

133 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

134 **2.1.Revisão de definições, classificações e dimensão de fractais**

135 Considerou-se fundamental a introdução de conceitos necessários para o
136 desenvolvimento do projeto. A fim de possibilitar o acesso a definições, classificações e
137 dimensão da teoria de fractais, referências bibliográficas clássicas e páginas da internet,
138 tais como: <http://classes.yale.edu/fractals/> (Frame *et al.* 2012), foram utilizadas.

139 **2.2.Obtenção de colônias fractais de microrganismos**

140 O crescimento fractal de espécies bacterianas foi observado principalmente
141 com a utilização de meios mínimos, como o de Davis e Mingioli (1950), e não foi
142 possível observar tal padrão em meios completos, como o ágar infuso cérebro-coração
143 (BHI) (Matsuyama *et al.* 1989).

144 Inicialmente induziu-se a formação de colônias fractais em cepas das seguintes
145 espécies de enterobactérias: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e
146 *Salmonella thyphimurium* e do coco gram-positivo *Staphylococcus aureus*.

147 Os meios de cultivo para bactérias utilizados foram os seguintes, de acordo
148 com Matsuyama *et al.* (1989) e (Fujikawa 1994):

149 O meio mínimo de Davis e Mingioli, tem a seguinte composição: K_2HPO_4 7,0
150 g, KH_2PO_4 3,0 g, Na_3 -citrato x $3H_2O$ 0,5 g, $MgSO_4$ x $7H_2O$ 0,1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1,0 g,
151 glicose (autoclavada separadamente) 2 g, H_2O 1000 mL, pH 7,0. Agar 1,5% como
152 agente solidificante. As placas foram incubadas a 37 °C (Davis e Mingioli 1950).

153 O meio Fujikawa, contendo 5 g de NaCl, 5 g de fosfato dibásico de potássio,
154 10 g L^{-1} de peptona e 7 g L^{-1} de ágar, pH 7,1 de acordo com Fujikawa (1994). Aqui,
155 igualmente, ágar 1,5% foi utilizado como agente solidificante. A concentração de ágar
156 de 1,5% impede, a princípio, a movimentação do tipo *swarming* de praticamente todos
157 os microrganismos testados. No caso de avaliar o crescimento fractal, o deslocamento
158 tipo *swarming*, em muitos casos não geraria padrões fractais, conforme demonstrado na
159 literatura (Butler *et al.* 2010).

160 Foram adicionados 20 mL dos meios a uma placa de Petri plástica de 88 mm
161 de diâmetro (Ben-Jacob *et al.* 2000; Ingham e Jacob 2008). Segundo Ben-Jacob *et al.*
162 (2000), a espessura exata e uniforme do ágar é importante para a obtenção de padrões
163 reprodutíveis de crescimento.

164 Um teste foi realizado inoculando-se as bactérias em ambos os meios no centro
165 da placa de Petri, incubando-as a 37 °C por aproximadamente 25 dias. Tal procedimento
166 foi realizado para confirmar quais espécies bacterianas cresceriam nos meios utilizados.

167 Posteriormente, para uma consequente padronização, realizando leituras de
168 absorvância em um espectrofotômetro, as bactérias foram inoculadas através da
169 aplicação de 10 μL de uma suspensão de cultivos frescos ajustada a uma $OD_{650\text{nm}} = 1,0$
170 (OD: Densidade óptica), no centro da placa dentro de uma câmara que foi mantida
171 úmida (Be'er *et al.* 2009). As placas foram incubadas a 37 °C durante 15 e 21 dias.
172 Realizou-se o mesmo procedimento para cepa de referência *Escherichia coli* K12

173 MG1655), *Escherichia coli* ATTC 25922, *Escherichia coli* 83 (isolada da cama de aves
174 em granjas do RS, pelo Dr. Benito Brito - UFRGS), *Salmonella typhi* ATCC 6539,
175 RS218 (cepa de referência NMEC, isolado do líquido cefalorraquidiano de recém-nascido
176 com meningite neonatal).

177 As seguintes espécies de leveduras foram inoculadas no meio Davis e Mingioli
178 e Fujikawa, com aproximadamente um mês de incubação a 30 °C: *Candida albicans*
179 ATCC 18804 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

180 **2.3.Verificação da influência de soro humano no padrão fractal de** 181 **microrganismos potencialmente patogênicos**

182 Considerando que todas as espécies bacterianas são eventualmente associadas
183 com infecções sanguíneas, as mesmas foram igualmente cultivadas em placas com os
184 meios de cultura descritos acima, suplementados com 20% de um *pool* de soro humano
185 de vários indivíduos adultos ou, para comparação, acrescidos de água destilada em lugar
186 do soro, igualmente a 20% (a partir daqui, chamaremos este meio de “meio diluído”) a
187 fim de verificar a influência dos fatores presentes no soro no crescimento fractal das
188 referidas espécies.

189 O soro foi previamente filtrado em um filtro de membrana (22 µm) e
190 adicionado, na sua respectiva concentração, aos meios. A água destilada foi autoclavada
191 antes de ser adicionada. Os meios suplementados com soro e diluídos com água foram
192 vertidos em placas de Petri plásticas, com diâmetro de 88 mm. As placas foram
193 deixadas paradas, fechadas, mas não seladas, a temperatura ambiente por 24 horas
194 (Be'er *et al.* 2009).

195 Foram aplicados 10 µL de uma suspensão de cultivos frescos das seguintes
196 bactérias: *E. coli* K12 MG1655, *E. coli* ATTC 25922, *S. typhi* ATCC 6539, *B. subtilis*

197 ATCC 19659, *B. cereus* ATCC 11778 e *S. aureus*, ajustados a uma $OD_{650nm} = 1,0$. As
198 placas foram incubadas a 37 °C, durante 15 dias. Todos os experimentos foram
199 realizados em triplicata. Realizou-se colorações de Gram com os cultivos de *B. cereus*
200 ATCC 11778, a fim de observar diferenças na morfologia celular em meio de cultura
201 com e sem a adição de soro humano.

202 **2.4. Medição das colônias**

203 Para mensurar o tamanho que cada colônia alcançou no tempo de incubação,
204 foram realizadas medições com auxílio de uma régua de 30 cm no final de cada
205 incubação.

206 O tamanho das colônias em meio de cultura com adição de soro humano (20%)
207 e em placas com água (20%), em lugar de soro, foi mensurado após 96 horas de
208 incubação com a extensão máxima das duas secções transversais perpendiculares
209 (Golinski *et al.* 2008). Mediram-se as colônias novamente após 120, 216, 240 e 360
210 horas.

211 **2.5. Determinação da dimensão fractal de colônias pelo método *Box*** 212 ***Counting***

213 Capturaram-se todas as imagens das colônias com uma máquina fotográfica
214 Canon *PowerShot* SD 1200 IS. As imagens foram tratadas com o *software Adobe*
215 *Photoshop CS5.1* e com o *PhotoScape v3.6.3* tornando-se adequadas para estimação da
216 dimensão fractal através do método de contagem de caixas (*Box Counting*), no
217 programa *IMAGEJ 1.46r (Image Processing and Analysis in Java)*.

218 Para determinar a Dimensão fractal das imagens no programa, primeiramente,
219 colocou-se a imagem em 8 *bit*, transformando-a em imagem binária, analisando-a na
220 ferramenta *Fractal Box Counting*, com um *box* de tamanho determinado em 64 divisões.

221 **2.6. Validação da abordagem de utilização do *software IMAGEJ 1.46r***

222 Para ser utilizado na análise da dimensão fractal no presente trabalho,
223 inicialmente o programa *IMAGEJ 1.46r* foi validado através da análise fractal de dez
224 imagens de artigos já publicados (Matsuyama *et al.* 1989; Matsushita e Fujikawa 1990;
225 Matsuyama e Matsushita 1992; Fujikawa 1994; Mihail *et al* 1995; Ben-Jacob *et al.*
226 2000) com suas respectivas dimensões fractais já determinadas, comparando-se o valor
227 descrito no artigo com o obtido durante a análise no programa.

228 **2.7. Análise estatística dos dados**

229 As médias de dimensões fractais de três colônias de cada microrganismo foram
230 comparadas usando-se teste T de Student pareado para dois grupos ou ANOVA uma
231 via, utilizando o *software R* (versão 2.15.1). O *software* estatístico R, de livre acesso
232 (<http://www.r-project.org/foundation/>) foi utilizado em lugar do *software SPSS*, em
233 função da licença de uso do mesmo ter expirado.

234 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

235 **3.1. Obtenção de colônias fractais de microrganismos**

236 Primeiramente, foi acompanhado o crescimento das placas das seguintes
237 enterobactérias: *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. typhimurium* e de *S. aureus* inoculadas
238 tanto no meio Fujikawa, como no meio Davis e Mingioli.

239 Observou-se um padrão de formas irregulares e ramificadas em algumas das
240 colônias em crescimento, ou seja, foram obtidas colônias das enterobactérias cultivadas
241 nos meios citados que possuem um baixo teor de nutrientes, as quais sugeriram
242 inicialmente possuírem um caráter fractal devido as suas formas complexas, aleatórias e
243 aparentemente repetitivas, o que foi confirmado com a determinação da Dimensão
244 fractal por *Box Counting*, posteriormente.

245 Segundo Be'er *et al.* (2009), bactérias não são as criaturas solitárias simples de
246 capacidades limitadas, conforme acreditava-se a alguns anos. Quando expostas a
247 ambientes difíceis, tais como em ausência de nutrientes, podem coletivamente
248 desenvolver estratégias sofisticadas de adaptação e sobrevivência, como a formação de
249 colônias fractais.

250 Cada colônia tomou uma forma diferente, porém, nem todas as bactérias
251 cresceram de forma ramificada em ambos os meios: *E. coli* formou colônias com
252 aspecto fractal tanto no meio Fujikawa, quanto no meio Davis e Mingioli, porém, no
253 meio Fujikawa, foi observado que para a colônia formar ramificações precisa-se de um
254 tempo mais prolongado e apesar disso, as formas obtidas apresentaram-se menos
255 ramificadas que as colônias da mesma cepa no meio Davis e Mingioli.

256 *S. typhimurium* só formou colônias fractais no meio Davis e Mingioli,
257 apresentando uma colônia com forma mais arredondada no meio Fujikawa. *B. subtilis* e
258 *B. cereus* só formaram colônias fractais no meio Fujkawa e colônias com aspecto
259 circular no meio Davis e Mingioli. O *S. aureus* não formou colônia fractal em nenhum
260 dos dois meios utilizados, pois, apresentou uma forma completamente arredondada em
261 ambos os meios.

262 Vale ressaltar que a morfologia das colônias também diferiu com a espécie
263 bacteriana. Certas espécies de bactérias geram colônias morfologicamente
264 características em placas de ágar. O crescimento de colônias bacterianas obedece a
265 várias leis biológicas, químicas e físicas e é controlado por fatores do meio ambiente.
266 Quando estes, em determinadas condições, desempenham um papel no crescimento de
267 bactérias, podem afetar a morfologia das colônias desenvolvidas. Assim, uma estirpe

268 bacteriana pode formar colônias com diferentes tipos de morfologia em meios contendo
269 diferentes constituintes (Fujikawa 1994).

270 Depois do conhecimento das espécies bacterianas que crescem no meio
271 Fujikawa, Davis e Mingioli e as quais não crescem em nenhum dos dois meios, como o
272 *S. aureus*, foram feitas padronizações. O procedimento foi repetido três vezes durante o
273 projeto, onde o primeiro teve a duração de 15 dias e os dois últimos um período de 21
274 dias. Obteve-se então, novas colônias fractais, com formas bastante complexas de: *E.*
275 *coli*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *S. typhimurium*. Colônias fractais de K12 MG1655, *E. coli*
276 ATTC 25922, *E. coli* 83, *S. typhi* ATCC 6539, RS218, foram obtidas posteriormente
277 (Figura 1).

278 Já com 24 horas de incubação, observou-se a formação de uma massa de
279 células na zona de inoculação. Essa massa, na maioria das vezes, durante todo o
280 crescimento, manteve seu padrão circular, sendo mais compactada em alguns casos
281 como nas colônias de: *S. typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus*, *E. coli* ATCC, *S. typhi*, K12
282 MG1655, RS218 e menos compactadas como nas colônias de: *E. coli* 83. Com o passar
283 do tempo de incubação, as colônias foram criando formas irregulares totalmente
284 aleatórias, ultrapassando a zona de inoculação, atingindo a partição o que as tornavam
285 ramificadas. A massa de células formadas nas ramificações das colônias era inferior em
286 quantidade às da zona de inoculação, onde havia uma concentração de células maior.
287 Em geral, o mecanismo de crescimento de todas as colônias apresentou-se complexo
288 (Figura 2).

289 Com a impossibilidade de aquisição de um dos reagentes (dihidrogenofosfato
290 de sódio e amônio) para induzir colônias fractais de leveduras de acordo com o previsto
291 originalmente no projeto, foram realizadas tentativas de obtenção de tais padrões de

292 crescimento com o meio Davies e Mingioli e com o meio de Fujikawa. Para *C. albicans*
293 ATCC 18804 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, obteve-se colônias fractais somente no
294 meio Fujikawa, após aproximadamente um mês de incubação (Figura 3). O meio de
295 Fujikawa pareceu apropriado para o estudo da influência de fatores no crescimento
296 fractal de leveduras.

297 As colônias fractais obtidas de leveduras ocuparam na maioria das vezes, quase
298 a dimensão total da placa de Petri. Sendo que as ramificações só foram visíveis nos
299 últimos dias de incubação, Nos dias anteriores, visualizava-se apenas a massa de células
300 presente na zona de inoculação, porém esta não se formou logo após 24 horas, como as
301 de bactérias.

302 **3.2.Verificação da influência de soro humano no padrão fractal de** 303 **microrganismos potencialmente patogênicos**

304 A influência dos fatores presentes no soro no crescimento fractal de bactérias
305 patogênicas foi perceptível, logo nos primeiros dias de incubação ao analisar as
306 propriedades morfológicas das colônias, observando que a mesma espécie de uma
307 determinada bactéria forma em meio com soro humano, um tipo específico de colônia e
308 no mesmo meio, porém, sem o *pool* de soro humano, somente diluído com água, a
309 colônia bacteriana adquire outra forma. Obteve-se crescimento bacteriano em todos os
310 meios com soro ou diluídos com água a 20%. No ágar Davis e Mingioli das cepas de:
311 K12 MG1655, *E. coli* ATTC 25922, *S. typhi* ATCC 6539. No ágar Fujikawa de: *B.*
312 *subtilis* ATCC 19659, *B. cereus* ATCC 11778 e *S. aureus*.

313 Em meios com soro humano, mesmo com a inibição do sistema imune, as
314 bactérias conseguiram sobreviver e formar colônias complexas, algumas vezes
315 apresentando um crescimento bastante rápido, como das colônias fractais de *S. typhi*

316 ATCC 6539, que assim como *E. coli* ATCC 25922, formaram colônias fractais no meio
317 Davis e Mingioli com soro e no meio diluído, o mesmo acontecendo com K12
318 MG1655, porém nesse caso a massa de células da zona de inoculação da colônia no
319 meio com soro era bem menos compactada. A compactação menor também foi
320 observada em colônias de *B. subtilis* ATCC 19659, no meio Fujikawa com soro.
321 Quando no meio diluído, observou-se que não houve formação de colônias fractais
322 dessa espécie. As colônias obtidas de *S. aureus* no meio Fujikawa com soro
323 apresentaram aspectos fractais, possuindo ramificações ao redor da zona de inoculação,
324 diferentemente das colônias obtidas nesse meio em sua composição normal (Figura 4).

325 Em 96 horas de incubação, foi perceptível o aparecimento de um halo branco ao
326 redor das colônias de *B. cereus* ATCC 11778, ou seja, ocorreu uma precipitação
327 proteica do soro, as colônias formadas nesse meio não apresentaram aspecto fractal,
328 porém no meio diluído, a mesma espécie apresentou colônias de natureza fractal com a
329 massa de células além da zona de inoculação bastante ramificada (Figura 4).

330 O método de coloração de Gram foi realizado com as colônias de *B. cereus*
331 ATCC 11778 obtidas nos meios com soro ou diluído. As colorações foram feitas a partir
332 de células da zona de inoculação e da massa de células que ultrapassou essa zona. A
333 partir de células da zona de inoculação do meio diluído, observaram-se bacilos curtos, a
334 maioria corando-se Gram negativo. Das células da zona de inoculação do meio com
335 soro, observou-se um pequeno número de bacilos levemente alongados. A maioria
336 corou Gram negativo.

337 Nas células que ultrapassaram a zona de inoculação, no meio diluído, foram
338 observados bacilos mais alongados e muitos em divisão binária. A maioria corou Gram
339 positivo. Algumas das células apresentaram-se alongadas, como hastes retas com

340 extremidades arredondadas. Já nas células que ultrapassaram a zona de inoculação no
341 meio com soro observou-se uma tendência a diferenciação no sentido de alongação da
342 célula. Todos os bacilos eram notavelmente maiores e muitos estavam em divisão. A
343 maioria corou Gram positivo. Segundo Fazline et al. 2009, culturas jovens de *B. cereus*
344 coram-se Gram-positivo e culturas antigas Gram-negativo, o que condiz com nossas
345 observações.

346 *B. cereus* pode ter realizado motilidade por *swarming* nas placas contendo soro
347 humano, já que nesse meio não houve a formação de colônias fractais e observou-se que
348 as células apresentaram uma diferenciação a alongação. Bactérias capazes de realizar
349 motilidade por *swarming* como o *B. cereus*, passam por um processo de diferenciação,
350 caracterizado pela produção de células multinucleadas, alongadas e hiperflageladas. Em
351 contraste com os processos de crescimento fractal, *swarming* não é uma resposta à falta
352 de nutrientes e varia dependendo do organismo e das condições ambientais de
353 crescimento. Acredita-se que o *swarming* é uma estratégia desenvolvida por
354 microrganismos flagelados para assegurar a sua rápida expansão no ambiente natural,
355 onde as atividades microbianas estão frequentemente associadas a superfícies sólidas
356 (Senesi et al. 2002).

357 **3.3. Medição das colônias**

358 Das padronizações, no período de 15 dias obteve-se como maior crescimento *E.*
359 *coli* 4,0 x 3,2 cm, *B. cereus* 3,9 x 3,2 cm, *S. thyphimurium* 3,9 x 3,0 cm, *B. subtilis* 3,5
360 x 3,2 cm. No período de 21 dias obteve-se: *B. cereus* 6,1 x 5,0 cm, *E. coli* 5,0 x 4,2 cm,
361 *S. thyphimurium* 4,6 x 3,6 cm, *B. subtilis* 2,7 x 2,6 cm, K12 MG1655 4,8 x 3,2 cm, *E.*
362 *coli* ATCC 25922 5,8 x 4,0 cm, *E. coli* 83 4,1 x 2,9 cm, *S. typhi* ATCC 6539 3,4 x 2,3
363 cm, RS218 1,6 x 1,1 cm (Tabela 1).

364 Notavelmente, o crescimento das colônias bacterianas nos meios
365 suplementados com um *pool* de soro humano foi maior que nos meios diluídos, durante
366 os 15 dias, destacando que *S. typhi* ATCC 6539 formou colônias fractais maiores que
367 das outras bactérias, atingindo 7,5 x 7,1 cm no meio Davis e Mingioli com soro (Tabela
368 2). Possivelmente, embora o soro em placas de meio de cultura apresente atividade de
369 imunoglobulinas potencialmente inibitórias, por ser um meio sólido, as mesmas tem sua
370 atividade limitada e os nutrientes do soro são explorados para ampliar o crescimento
371 microbiano (Psychogios *et al.* 2011).

372 **3.4.Determinação da dimensão fractal de colônias pelo método *Box*** 373 ***Counting***

374 Inicialmente, para algumas colônias fractais obtidas, foi utilizado o método
375 manual de *Box Counting*. Observou-se com estas análises que não seria possível aplicar
376 o mesmo tratamento de divisões que é obtido com *softwares*. Assim, a dimensão fractal
377 foi estimada pelo método *Box Counting*, com auxílio do *software IMAGEJ 1.46r* do
378 Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), amplamente utilizado na
379 literatura e disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Esse
380 *software* considera o *Box Counting* em duas dimensões, permitindo a quantificação da
381 distribuição de pixels nesse espaço, não considerando, portanto, a textura da imagem. A
382 influência disso é que duas imagens com a mesma distribuição dos pixels, uma
383 binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a mesma dimensão fractal.

384 A imagem obtida foi tratada para uma melhor estimacão de sua dimensão fractal,
385 observando que vários fatores, como a iluminação e o ruído das imagens interferem na
386 estimacão da dimensão fractal pelo programa utilizado.

387 As dimensões fractais obtidas com o *IMAGEJ* 1.46r apresentaram valores entre
388 1 e 2. (Tabela 2 e 3). Estas forneceram uma indicação da complexidade das colônias
389 fractais obtidas. Muitas aplicações de conceitos fractais baseiam-se na habilidade de
390 estimar acuradamente as dimensões fractais de objetos de amostras, especialmente
391 quando sistemas caóticos, não lineares estão sendo caracterizados (Huang *et al.* 1994).

392 Ao compararmos as dimensões fractais (ANOVA uma via) de colônias das cepas
393 de *E. coli*: *E. coli* ATTC 25922, K12 MG1655 e *E. coli* 83, cultivadas por 21 dias, não
394 foram observadas diferenças significativas (valor F = 2,151). A utilização do teste T
395 Student pareado para comparação das dimensões fractais entre cepas crescidas em meio
396 com soro e em meio diluído, revelou diferença significativa somente para K12 MG1655
397 ($p = 0,0045$) e para *B. subtilis* ATCC 19659 ($p = 0,0033$). A observação visual das
398 placas, em conformidade com os resultados do teste T, demonstraram a complexidade
399 das colônias e natureza fractal similar nas placas com soro e no meio diluído.

400 A dimensão fractal, conforme exposto acima, não é um indicativo do tamanho
401 da colônia ou do grau de crescimento do microrganismo. A mesma revela o grau de
402 complexidade ou tortuosidade da imagem. O resultado aqui obtido, está de acordo com
403 outras observações, como as de Roy *et al.* (2010), à medida que o tempo de cultivo ou a
404 quantidade crescente de nutrientes, embora permita o crescimento da colônia, não
405 necessariamente tornará a mesma mais complexa.

406 **3.5. Validação da abordagem de utilização do software *IMAGEJ* 1.46r**

407 Para o uso do programa no decorrer do projeto, se fez necessário uma
408 validação da nossa metodologia de utilização do mesmo. Para tal, valores de Dimensão
409 fractal de diferentes imagens de colônias microbianas, de referências sobre o tema,
410 foram por nós determinadas (Figura 5). A média (\bar{x}) da variação das dimensões fractais

411 obtidas foi de 1,28 e o desvio padrão (σ) apresentou o valor de 0,34 (Tabela 4), com
412 isso, acredita-se que a metodologia e a utilização do software seja satisfatória para os
413 nosso propósitos.

414 **4. CONCLUSÃO**

415 A teoria de fractais foi aplicada para descrever padrões de crescimento de
416 bactérias e leveduras, que em meios de cultura com baixas quantidades de nutrientes
417 cresceram formando colônias fractais, as quais apresentaram uma dimensão fractal entre
418 1 e 2, a partir de estimativa com o *software IMAGEJ 1.46r*.

419 O *software* referido aparentemente mostrou-se, considerando a validação feita,
420 promissor para este fim. A influência da ação do soro humano no crescimento de
421 colônias fractais de microrganismos potencialmente causadores de septicemia foi
422 determinada. Foi possível observar que em meios com soro humano algumas espécies
423 bacterianas crescem mais rapidamente que em meios pouco nutritivos normais, mesmo
424 com a inibição por imunoglobulinas presentes no soro, formando colônias com aspecto
425 fractal na maioria das vezes.

426 A análise fractal é uma ferramenta útil para caracterizar as dimensões fractais de
427 sistemas caóticos como o crescimento não linear microbiano, integrando as ciências
428 exatas às ciências da saúde.

429 **5. AGRADECIMENTOS**

430 À Profa. Ms. Ana Paula Faccio e ao Prof. Dr. Maxwell Adriano Abegg ao
431 apoio, confiança e orientação no desenvolvimento deste trabalho. Ao Instituto de
432 Ciências Exatas e Tecnologia (ICET) pela infraestrutura, ambiente proporcionado e
433 apoio financeiro e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
434 (FAPEAM) pela bolsa concedida.

435 **6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

- 436 BACKES, A. R. & BRUNO, O. M. 2005. Técnicas de estimativa da dimensão fractal:
437 Um estudo comparativo. INFOCOMP Journal of Computer Science, 4 (3): 50-58.
- 438 BE'ER, A.; ZHANG, H. P.; FLORIN, E. L. et al. *Deadly competition between sibling*
439 *bacterial colonies*. PNAS, 106 (2): 2009.
- 440 BEN-JACOB, E.; COHEN, I.; GOLDING, I. et al. 2000. *Bacterial cooperative*
441 *organization under antibiotic stress*. Physica A, 282: 247-282.
- 442 BOSCHKE, E.; BLEY, T. H. 1998. *Growth patterns of yeast colonies depending on*
443 *nutrient supply*. Acta Biotechnologica, 18 (1): 17-27.
- 444 BUTLER, M. T.; WANG, Q.; HARSHEY, R. M. 2010. Cell density and mobility
445 protect sawarming bacteria against antibiotics. Proc Natl Acad Sci USA, 2010 Feb 23,
446 107(8):3776-81, doi 10.1073/pnas.0910934107, epub 2010 Feb 2.
- 447 DAVIS, B.D.; MINGIOLI, E.S. 1950. *Mutants of Escherichia coli requiring methionine*
448 *or vitamin B1*. J. Bacteriol., 60 (1): 17-28.
- 449 FAZLANI, S. A.; ABUBAKAR, M.; SHAH, S. I.; HASSAN, M.; ARSHED, M. J.
450 2009. *Bio-Morphological Characteristics of Bacterial Species Identified from Mastitic*
451 *Milk Samples of Camel*. The International Journal of Veterinary Medicine. Vol. 6 N° 1.
452 DOI: 10.5580/28 de 2009.
- 453 FRAME, M.; MANDELBROT, B.; NEGER, N. 2012. *Fractal Geometry*. Yale
454 University. Disponível em: <http://classes.yale.edu/fractals>. Acesso: 02/04/2012.
- 455 FUJIKAWA, H. 1994. *Diversity of the growth patterns of Bacillus subtilis colonies on*
456 *agar plates*. FEMS Microbiology Ecology, 13: 159-168.

457 GOLINSKI, M. R.; BOECKLEN, W. J.; DAWE, A. L. 2008. *Two-dimensional fractal*
458 *growth properties of the filamentous fungus Cryphonectria parasitica: the effects of*
459 *hypovirus infection*. Journal of Basic Microbiology, 48: 426-429.

460 GUERRINI, I. A. Apostila: Caos e fractais em Física Aplicada. Botucatu: IB/UNESP,
461 1996.

462 HUANG, Q.; LORCH, J. R.; DUBES, R. C. 1994. *Can the fractal dimension of images*
463 *be measured?* Pattern Recognition, 27 (3): 339-349.

464 INGHAM, C. J.; JACOB, E. B. 2008. *Swarming and complex pattern formation in*
465 *Paenibacillus vortex studied by imaging and tracking cells*. BMC Microbiology, 8: 1-
466 16.

467 LOPES, R. & BETROUNI, N. 2009. *Fractal and multifractal analysis: A review*.
468 Medical Image Analysis, 13: 634-649.

469 MANDELBROT, B. B. 1982. *The fractal geometry of nature*. New York: W. H.
470 Freeman and Company.

471 MATSUSHITA, M.; FUJIKAWA, H. 1990. *Difusion limited growth in bacterial*
472 *colony formation*. Physica A, 168: 498-506.

473 MATSUYAMA, T.; MATSUSHITA, M. 1992. *Self-similar colony morphogenesis by*
474 *gram-negative rods as the experimental model of fractal growth by a cell population*.
475 Appl. Environ. Microbiol., 58 (4): 1227-1232.

476 MATSUYAMA, T.; SOGAWA, M.; NAKAGAWA, Y. 1989. *Fractal spreading*
477 *growth of Serratia marcescens wich produces surface active exolipids*. FEMS
478 Microbiology Letters, 61: 243-246.

479 MENEZES, M. S.; CUNHA JR, H. A. 2003. Formas geométricas e estruturas fractais
480 na cultura africana e afrodescendentes In: DE PRETO A AFRODESCENDENTE:

481 trajetos de pesquisa sobre o negro, cultura negra e relações étnico-raciais no Brasil ed.
482 São Carlos: EduFSCar Editora da Universidade Federal de São Carlos, 307-320.

483 MIHAIL, J. D.; OBERT, M.; BRUHN, J. N. et al. 1995. *Fractal geometry of diffuse*
484 *mycelia and rhizomorphs of Armillaria species*. Mycological Research, 99 (1): 81-88.

485 OBERT, M.; PFEIFER, P.; SERNETZ, M. 1990. *Microbial growth patterns described*
486 *by fractal geometry*. Journal of Bacteriology, 172 (3): 1180-1185.

487 PAPAGIANNI, M. 2006 *Quantification of the fractal nature of mycelial aggregation in*
488 *Aspergillus niger submerged cultures*. Microbial Cell Factories, 5: 1-13.

489 PSYCHOGIOS, N; HAU, DD; PENG, J. et al. 2011. *The Human Serum Metabolome*.
490 PLoS ONE, 6(2): e16957.

491 ROY, M. K.; BANERJEE, P.; SENGUPTA, T. K.; DATTA GUPTA, S. 2010. *Glucose*
492 *induced fractal colony pattern of Bacillus thuringiensis*. Journal of Theoretical Biology
493 265, 189-295.

494 SENESI, S.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; BEECHER, D. J.; WONG, A. C. L.;
495 GHELARDI, E. 2002. *Swarming motility in Bacillus cereus and characterization of a*
496 *fliY mutant impaired in swarm cell differentiation*. Microbiology, 148, 1785–1794.

497 TREMBLAY, J. & DÉZIEL, E. 2010. *Gene expression in Pseudomonas aeruginosa*
498 *swarming motility*. BMC Genomics, 11: 587.

499

500 7. TABELAS

501 Tabela 1. Medição das colônias fractais obtidas nos meio Fujikawa e Davis e Mingioli

Bactérias	Meio de Cultivo	Medidas (cm)	Tempo de incubação
<i>Escherichia coli</i>	Davis e Mingioli	3,5 x 3,0	15 dias
		4,0 x 3,2	15 dias
		5,0 x 4,2	21 dias
		4,7 x 4,4	21 dias
	Fujikawa	1,9 x 2,7	21 dias
		1,7 x 1,3	21 dias
1,8 x 1,7		21 dias	
<i>Salmonella thyphimurium</i>	Davis e Mingioli	3,5 x 3,0	15 dias
		3,9 x 3,0	15 dias
		4,6 x 3,6	21 dias
		3,9 x 3,5	21 dias
		2,4 x 2,1	21 dias
<i>Staphylococcus aureus</i>	Davis e Mingioli	1,8 x 1,8	15 dias
<i>Bacillus cereus</i>	Fujikawa	4,0 x 3,5	15 dias
		3,9 x 3,2	15 dias
		4,8 x 5,0	21 dias
		5,9 x 4,1	21 dias
		6,1 x 5,0	21 dias
<i>Bacillus subtilis</i>	Fujikawa	3,2 x 3,2	15 dias
		3,5 x 3,2	15 dias
		2,6 x 2,3	21 dias
		2,7 x 2,6	21 dias
		2,6 x 2,3	21 dias
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Davis e Mingioli	2,5 x 2,8	21 dias
		5,0 x 4,0	21 dias
		4,0 x 3,5	21 dias
		5,0 x 4,5	21 dias
<i>Escherichia coli</i> 83	Davis e Mingioli	2,8 x 3,1	21 dias
		4,1 x 2,9	21 dias
		3,2 x 3,0	21 dias
K12 MG1655	Davis e Mingioli	4,0 x 3,2	21 dias
		4,6 x 4,5	21 dias
		4,7 x 4,8	21 dias
		4,7 x 4,9	21 dias
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	Davis e Mingioli	3,4 x 2,3	21 dias
		3,1 x 2,3	21 dias
RS218	Davis e Mingioli	1,6 X 1,1	21 dias

502

503

504 Tabela 2. Medição de colônias de diferentes cepas bacterianas testadas nos meios com
 505 soro ou diluídos com água e suas respectivas Dimensões fractais obtidas com o
 506 *IMAGEJ* 1.46r.

Bactéria	Meio	Dimensão (cm)					Dimensão Fractal
		96 h	120 h	216 h	240 h	360 h	
SORO							
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	Fujikawa	1,5 x 1,4	1,9 x 1,9	1,9 x 1,9	2,2 x 2,0	2,7 x 2,3	1,866
		1,9 x 1,4	2,0 x 1,6	2,9 x 2,9	3,8 x 3,2	5,0 x 4,7	1,946
		1,5 x 1,5	1,6 x 1,6	2,0 x 1,9	2,2 x 2,1	3,1 x 3,0	1,844
		1,8 x 1,5	1,9 x 1,5	2,2 x 1,9	2,3 x 1,9	3,1 x 2,6	1,929
DILUÍDO							
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	Fujikawa	1,4 x 1,5	1,7 x 1,7	2,0 x 2,7	2,6 x 2,9	4,5 x 4,4	1,733
		1,3 x 1,1	1,35 x 1,2	2,0 x 1,9	2,3 x 2,1	3,4 x 3,2	1,82
		1,6 x 1,5	1,7 x 1,6	2,7 x 2,8	3,1 x 3,2	4,4 x 4,4	1,828
		1,5 x 1,5	1,9 x 1,8	2,7 x 2,4	2,9 x 2,7	3,0 x 3,8	1,874
SORO							
K12 MG1655	Davis e Mingioli	1,4 x 1,3	1,6 x 1,4	2,2 x 2,0	2,5 x 2,2	3,5 x 2,8	1,865
		1,4 x 1,2	1,4 x 1,4	2,2 x 1,8	2,4 x 1,9	3,4 x 3,0	1,889
		1,3 x 1,3	1,4 x 1,4	1,7 x 1,6	1,8 x 1,7	2,2 x 1,7	1,865
		1,3 x 1,4	1,6 x 1,5	2,3 x 2,0	2,3 x 2,0	3,2 x 2,7	1,857
DILUÍDO							
K12 MG1655	Davis e Mingioli	1,1 x 1,0	1,2 x 1,1	1,6 x 1,3	1,6 x 1,3	1,9 x 1,7	1,885
		1,1 x 1,0	1,3 x 1,2	1,7 x 1,4	1,7 x 1,5	2,1 x 1,9	1,901
		1,2 x 1,4	1,3 x 1,4	1,5 x 1,5	1,7 x 1,7	2,0 x 1,7	1,882
		1,2 x 0,9	1,3 x 1,1	1,7 x 1,5	1,8 x 1,5	2,0 x 2,0	1,88
SORO							
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Davis e Mingioli	1,5 x 1,3	1,6 x 1,5	2,5 x 2,0	2,9 x 2,3	4,2 x 2,5	1,811
		1,5 x 1,4	1,75 x 1,7	3,2 x 3,1	3,7 x 3,5	5,7 x 5,4	1,902
		1,4 x 1,2	1,5 x 1,4	1,8 x 1,7	2,0 x 1,9	2,8 x 2,4	1,913
		1,5 x 1,2	1,6 x 1,3	2,4 x 2,1	2,7 x 2,3	3,7 x 3,5	1,9
DILUÍDO							
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Davis e Mingioli	1,1 x 1,0	1,2 x 1,1	1,5 x 1,4	1,6 x 1,5	1,8 x 1,9	1,909
		1,2 x 1,1	1,3 x 1,2	1,6 x 1,5	1,7 x 1,7	2,0 x 1,9	1,888
		1,1 x 1,1	1,3 x 1,2	1,5 x 1,5	1,6 x 1,5	1,7 x 1,7	1,895
		1,1 x 1,1	1,2 x 1,2	1,4 x 1,3	1,5 x 1,4	1,9 x 1,6	1,901
SORO							
<i>S. typhi</i> ATCC 6539	Davis e Mingioli	2,3 x 1,8	2,7 x 2,3	4,3 x 3,8	4,3 x 4,6	6,1 x 6,1	1,845
		2,3 x 2,2	2,7 x 2,8	5,4 x 4,6	6,0 x 5,0	7,3 x 6,1	1,914
		2,3 x 1,7	3,0 x 2,5	5,2 x 5,4	5,9 x 5,3	7,5 x 7,1	1,867
		2,2 x 1,7	2,5 x 2,1	3,9 x 4,2	4,3 x 3,7	4,6 x 4,7	1,922

507

DILUÍDO							
<i>S. typhi</i> ATCC 6539	Davis e Mingioli	1,7 x 1,8	2,1 x 2,0	3,3 x 3,2	3,5 x 3,5	4,9 x 4,7	1,933
		1,6 x 1,5	1,8 x 1,9	3,0 x 3,1	3,2 x 3,3	4,5 x 4,4	1,935
		1,7 x 1,4	2,0 x 1,6	2,0 x 2,8	3,1 x 2,4	4,1 x 3,1	1,923
		1,5 x 1,5	1,8 x 1,7	2,6 x 2,6	2,8 x 2,7	3,8 x 3,7	1,924
SORO							
<i>B. subtilis</i> ATCC 19659	Fujikawa	1,4 x 1,2	1,5 x 1,3	1,9 x 1,6	2,0 x 1,9	2,3 x 2,3	1,892
		1,7 x 1,4	1,7 x 1,4	2,2 x 1,7	2,4 x 1,9	2,7 x 2,1	1,885
		1,3 x 1,1	1,3 x 1,1	1,6 x 1,4	1,9 x 1,5	2,1 x 1,9	1,884
		1,1 x 1,1	1,2 x 1,2	1,7 x 1,6	1,7 x 1,7	2,1 x 2,1	1,903
DILUÍDO							
<i>B. subtilis</i> ATCC 19659	Fujikawa	0,8 x 0,8	0,9 x 0,85	1,1 x 1,1	1,2 x 1,1	1,5 x 1,4	1,613
		1,0 x 0,9	1,0 x 0,95	1,2 x 1,1	1,3 x 1,2	1,7 x 1,6	1,645
		0,9 x 1,0	1,1 x 1,0	1,3 x 1,2	1,4 x 1,3	1,9 x 1,6	1,45
SORO							
<i>S. aureus</i>	Fujikawa	1,0 x 1,3	1,5 x 1,1	2,0 x 1,4	2,0 x 1,4	2,5 x 1,6	1,874
		1,5 x 1,6	1,5 x 1,6	1,9 x 1,6	2,0 x 1,7	2,3 x 2,0	1,888
		1,6 x 1,3	1,6 x 1,5	1,9 x 1,7	2,0 x 1,9	2,3 x 2,2	1,866

508

509

510 Tabela 3. Dimensões fractais obtidas com o *IMAGEJ* 1.46r das colônias nos meios

511 Davis e Mingioli e Fujikawa.

Bactérias	Meio de Cultivo	Dimensão Fractal	Tempo de incubação
<i>Escherichia coli</i>	Davis e Mingioli	1,932	15 dias
		1,918	15 dias
		1,848	21 dias
	Fujikawa	1,924	21 dias
		1,844	21 dias
		1,844	21 dias
<i>Salmonella thyphimurium</i>	Davis e Mingioli	1,883	21 dias
		1,929	15 dias
		1,932	15 dias
		1,928	21 dias
<i>Staphylococcus aureus</i>	Davis e Mingioli	1,919	21 dias
		1,925	21 dias
		1,933	15 dias
		1,933	15 dias
<i>Bacillus cereus</i>	Fujikawa	1,807	15 dias
		1,93	15 dias
		1,926	21 dias
		1,927	21 dias
		1,853	21 dias
<i>Bacillus subtilis</i>	Fujikawa	1,931	15 dias
		1,89	15 dias
		1,9	21 dias
		1,87	21 dias
		1,868	21 dias
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Davis e Mingioli	1,891	21 dias
		1,879	21 dias
		1,89	21 dias
		1,899	21 dias
<i>Escherichia coli</i> 83	Davis e Mingioli	1,873	21 dias
		1,903	21 dias
		1,883	21 dias
K12 MG1655	Davis e Mingioli	1,902	21 dias
		1,902	21 dias
		1,902	21 dias
		1,9	21 dias
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	Davis e Mingioli	1,907	21 dias
		1,899	21 dias
RS218	Davis e Mingioli	1,818	21 dias

512

513

514 Tabela 4. Validação da abordagem de utilização do *software IMAGEJ* 1.46r.

Figuras	Referências	Df de referências	Df obtida (IMAGEJ)	Variação (%)
A	Matsushita e Fujikawa, 1990	1,72	1,75	1,74
B	Fujikawa, 1994	1,73	1,76	1,73
C	Matsuyama e Matsushita, 1992	1,76	1,78	1,14
D	Matsuyama e Matsushita, 1992	1,80	1,83	1,11
E	Bem-Jacob <i>et al.</i> 2000	1,8	1,82	1,11
F	Mihail <i>et al.</i> 1995	1,36	1,34	1,47
G	Mihail <i>et al.</i> 1995	1,40	1,38	1,43
H	Mihail <i>et al.</i> 1995	1,48	1,46	1,35
I	Mihail <i>et al.</i> 1995	1,62	1,61	0,62
J	Mihail <i>et al.</i> 1995	1,81	1,73	3,31

$\bar{x} =$	1,28
$\sigma =$	0,34

515

516

517 **8. FIGURAS**

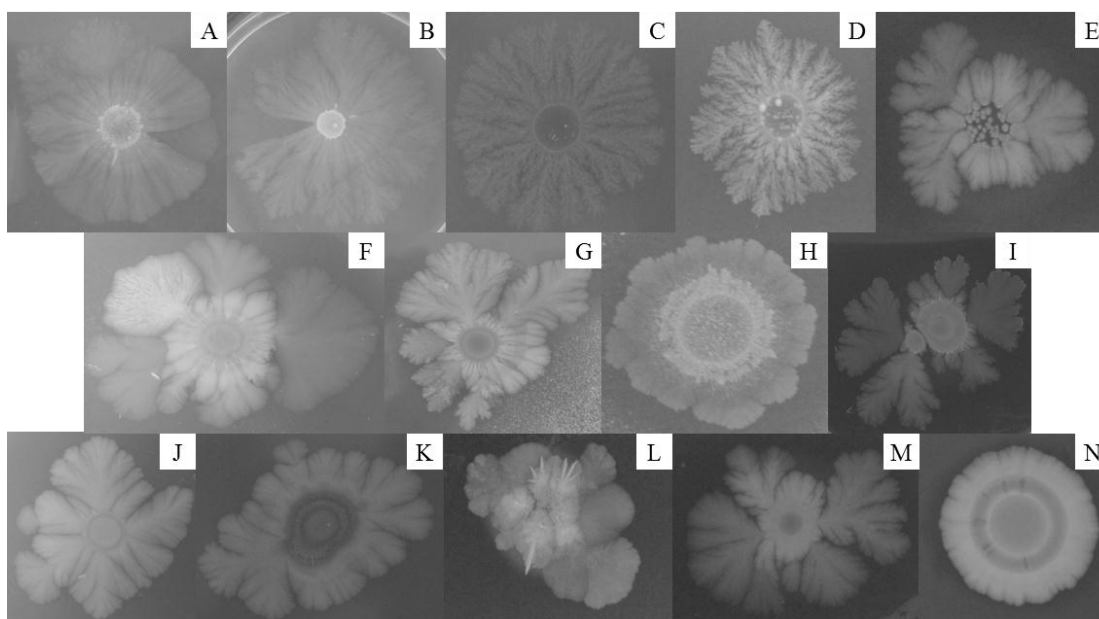


Figura 1. Obtenção de colônias fractais de bactérias incubadas durante 15 ou 21 dias. (A) *B. cereus*, meio Fujikawa – 15 dias; (B) *B. cereus*, meio Fujikawa – 21 dias; (C) *B. subtilis*, meio Fujikawa – 15 dias; (D) *B. subtilis*, meio Fujikawa – 21 dias; (E) *E. coli* 83, meio Davis e Mingioli – 21 dias; (F) *E. coli*, meio Davis e Mingioli – 21 dias; (G) *E. coli*, meio Davis e Mingioli – 21 dias; (H) *E. coli*, meio Fujikawa – 21 dias; (I) *E. coli* ATTC 25922, meio Davis e Mingioli – 21 dias; (J) *S. typhimurium*, meio Davis e Mingioli – 21 dias; (K) *S. typhimurium*, meio Davis e Mingioli – 15 dias; (L) *S. typhi* ATCC 6539, meio Davis e Mingioli – 21 dias; (M) K12 MG1655, meio Davis e Mingioli – 21 dias; (N) *S. aureus*, meio Davis e Mingioli – 15 dias.

518

519

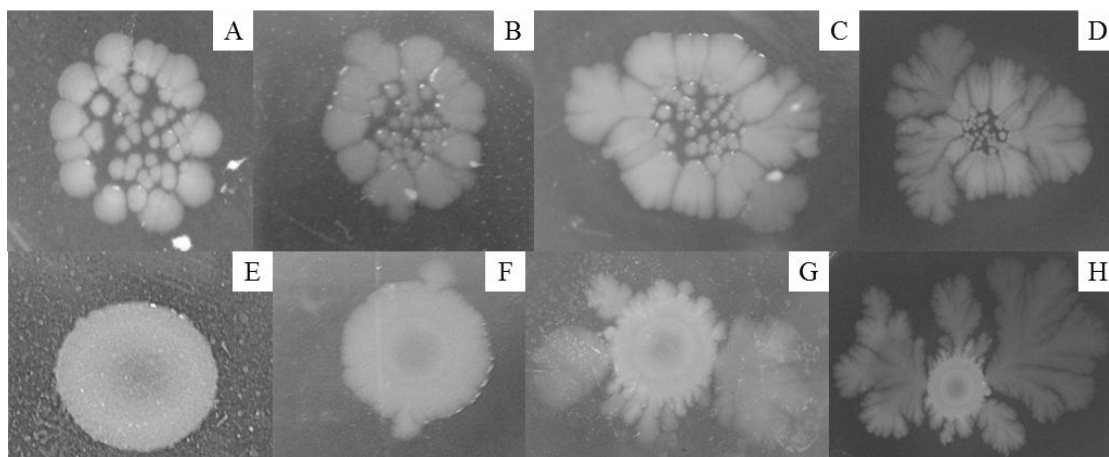


Figura 2. Crescimento das colônias a partir do segundo dia até o décimo quinto dia de incubação no meio Davis e Mingioli. (A) Massa de células com menor compactação de *E. coli* 83 formada na zona de inoculação no segundo dia; (B) Massa de células da zona de inoculação iniciando ramificação no sétimo dia; (C) Colônia fractal aos 15 dias; (D) Colônia fractal da referida espécie ao final dos 21 dias; (E) Massa de células compactada de *E. coli* ATCC 25922, formada na zona de inoculação no segundo dia; (F) Massa de células da zona de inoculação iniciando ramificação no sétimo dia; (G) Colônia fractal aos 15 dias; (H) Colônia fractal da referida espécie ao final dos 21 dias.

520

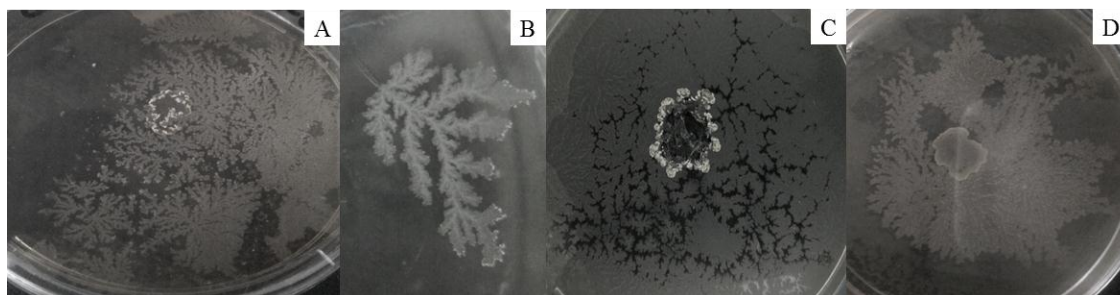


Figura 3. Colônias fractais obtidas de leveduras no meio Fujikawa em aproximadamente 1 mês de incubação. (A) *Candida parapsilosis* ATCC 22019; (B) Ramificação de *Candida parapsilosis* ATCC 22019; (C) *Candida parapsilosis* ATCC 22019; (D) *Candida albicans* ATCC 18804.

521

522

523

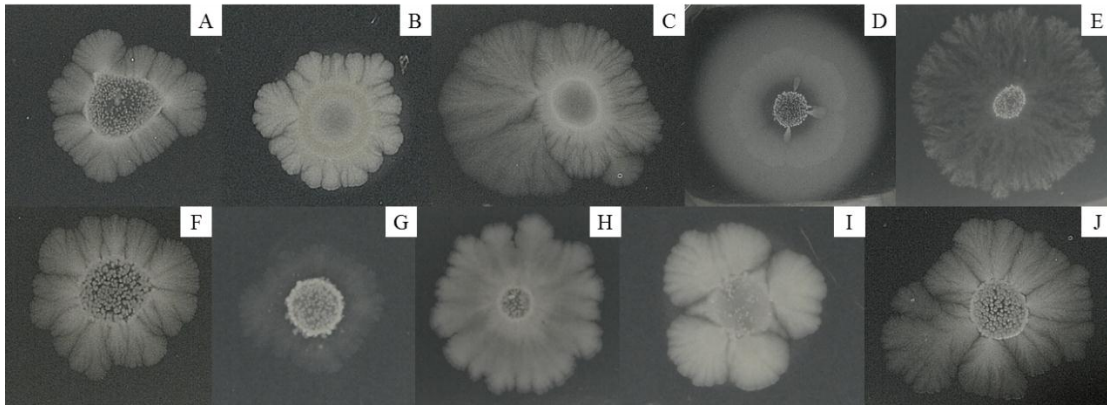


Figura 4. Colônias obtidas do experimento de verificação da influência de soro humano no padrão fractal de microrganismos potencialmente patogênicos. (A) *S. aureus*, meio Fujikawa com soro; (B) *E. coli* ATCC 25922, meio Davis e Mingioli diluído; (C) *E. coli* ATCC 25922, meio Davis e Mingioli com soro; (D) *B. cereus* ATCC 11778, meio Fujikawa com soro – formação de halo; (E) *B. cereus* ATCC 11778, meio Fujikawa diluído; (F) *B. subtilis* ATCC 19659, meio Fujikawa com soro; (G) *B. subtilis* ATCC 19659, meio Fujikawa diluído; (H) *S. typhi* ATCC 6539, meio Davis e Mingioli diluído; (I) K12 MG1655, meio Davis e Mingioli com soro; (J) K12 MG1655, meio Davis e Mingioli diluído.

524

525

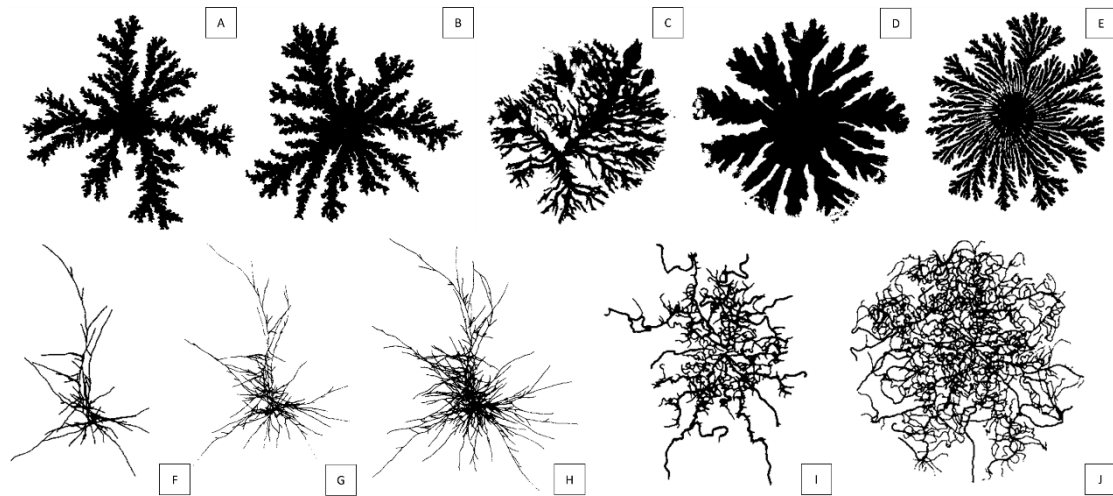


Figura 5. Validação da abordagem de utilização do software *IMAGEJ* 1.46r. (A) Matsushita e Fujikawa, 1990; (B) Fujikawa, 1994; (C) Matsuyama e Matsushita, 1992; (D) Matsuyama e Matsushita, 1992; (E) Bem-Jacob *et al.* 2000; (F) Mihail *et al.* 1995; (G) Mihail *et al.* 1995; (H) Mihail *et al.* 1995; (I) Mihail *et al.* 1995; (J) Mihail *et al.* 1995.

526

527

9. CRONOGRAMA

Nº	Descrição	Ago 2012	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2013	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Levantamento bibliográfico	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
2	Revisão de definições, classificações e dimensão de fractais	x	x	x	x								
3	Obtenção de colônias fractais de microrganismos	x	x	x	x	x	x						
4	Verificação da influência de soro humano no padrão fractal de microrganismos potencialmente patogênicos				x	x	x	x					
5	Cálculo da dimensão fractal de colônias pelo método <i>Box counting</i>					x	x	x	x	x			
6	Análise estatística dos dados									x	x	x	
7	Elaboração do Resumo e Relatório Final. Preparação da Apresentação Final para o Congresso											x	x