

Dimensões Fractais Aplicadas ao Estudo de Bactérias

Elisa Morandé Sales

12 de Novembro de 2013

1 INTRODUÇÃO

A observação de colônias de bactérias com estruturas fractais vem sendo relatada na literatura há algumas décadas. Alguns autores sugerem ainda que a dimensão fractal pode ser um dos melhores parâmetros para descrever colônias de fungos e bactérias, uma vez que pode ser calculada independentemente da morfologia e está diretamente associada com o comportamento de ramificações. [1]

Nesse trabalho são mostradas duas abordagens para descrever e quantificar o surgimento de padrões fractais em colônias de bactérias. A primeira e mais estabelecida, vincula a formação de padrões fractais à nutrição da colônia e sua mobilidade no meio em que se encontra. A segunda e mais recente, descreve o problema considerando apenas a influência de fatores físicos.

2 INTERAÇÃO DA COLÔNIA COM OS NUTRIENTES E O MEIO

Considerando a interação da colônia de bactérias com os nutrientes e o meio ao seu redor, foi possível encontrar na literatura descrições experimentais e por simulação computacional de como tais fatores influenciam na formação de padrões fractais.

2.1 EXPERIMENTOS

Os fatores que mais influenciam para a formação de diferentes padrões, assim como na dimensão fractal destes, estão listados abaixo:

QUANTIDADE DE NUTRIENTES A presença de nutrientes em um meio é essencial para que uma colônia desenvolva-se. Entretanto, pequenas colônias expostas a uma grande difusão tridimensional de nutrientes não apresentaram uma morfologia fractal inicialmente, sendo observada a formação de ramificações consideradas fractais só após 4 semanas.

Por outro lado, a falta de nutrientes, assim como compostos tóxicos gerados pelas colônias, pode inibir o crescimento de uma segunda colônia (Figura 2.1 C).

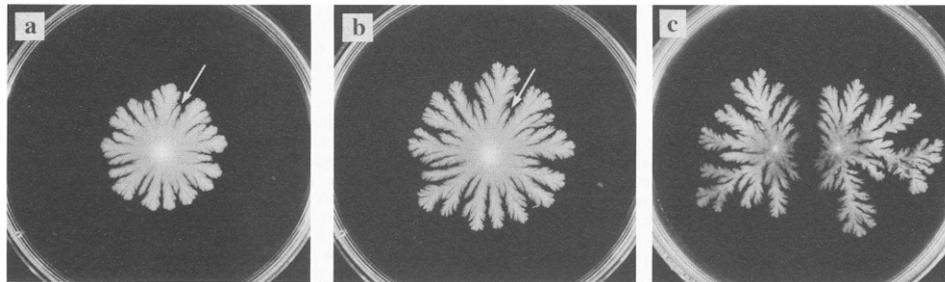


Figura 2.1: Colônias de *Salmonella spp. S. anatum* incubadas por 2 (A) e 4 (B) semanas. (C): Duas colônias de *S. typhimurium* incubadas por 3 semanas. Figura extraída de [2].

TAMANHO INICIAL DA COLÔNIA Matsuyama e Matsushita [2] também reportaram a importância do tamanho inicial da colônia. Quando o diâmetro da colônia é menor que a profundidade de agarose na placa, o contorno da colônia tende a ser mais suave. Além disso, o modo da difusão de nutrientes ocorre também influencia na estrutura: uma colônia com comprimento relativamente grande em comparação à profundidade do agarose na placa, tem crescimento predominantemente superficial.

MOBILIDADE Organismos flagelados contribuem para uma forma dendrítica, tendo um padrão fractal distinto de outras colônias, como podemos observar na Figura 2.2. Além de uma morfologia diferente, o tempo necessário de incubação foi de apenas 18 horas para obter uma estrutura muito mais ramificada do que bactérias não flageladas, mesmo após semanas de incubação, como visto na Figura 2.1.

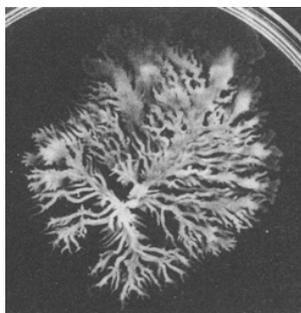


Figura 2.2: Colônias de *P. mirabilis* incubadas por 18 horas. Figura extraída de [2].

RRIGIDEZ DO MEIO As colônias mostradas na Figura 2.1 cresceram bidimensionalmente na superfície de agarose, principalmente por não terem a habilidade de submergir em uma agarose dura, indicando que quando conseguem fazê-lo, é formado um padrão autosimilar tridimensional. Isso já indica que a mobilidade em um meio e a sua desse, também alteram os padrões fractais formados pelas colônias. No caso da Fugura 2.3, foram necessárias 7 semanas de incubação. [2]

No que diz respeito a contribuição da rigidez do meio, Matsushita e colaboradores [3] verificaram que os padrões gerados em superfícies de agarose, podem ser classificados em 5 tipos de acordo com a concentração de nutriente e a rigidez do meio, nesse caso, dada pela concentração de agarose. O diagrama de fases morfológicas pode ser visto na Figura 2.4.

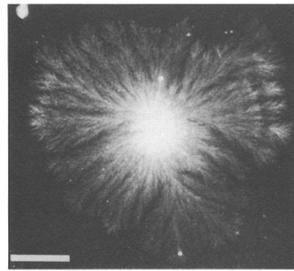


Figura 2.3: Colônia de *L. monocytogenes* incubada por 7 semanas. Figura extraída de [2].

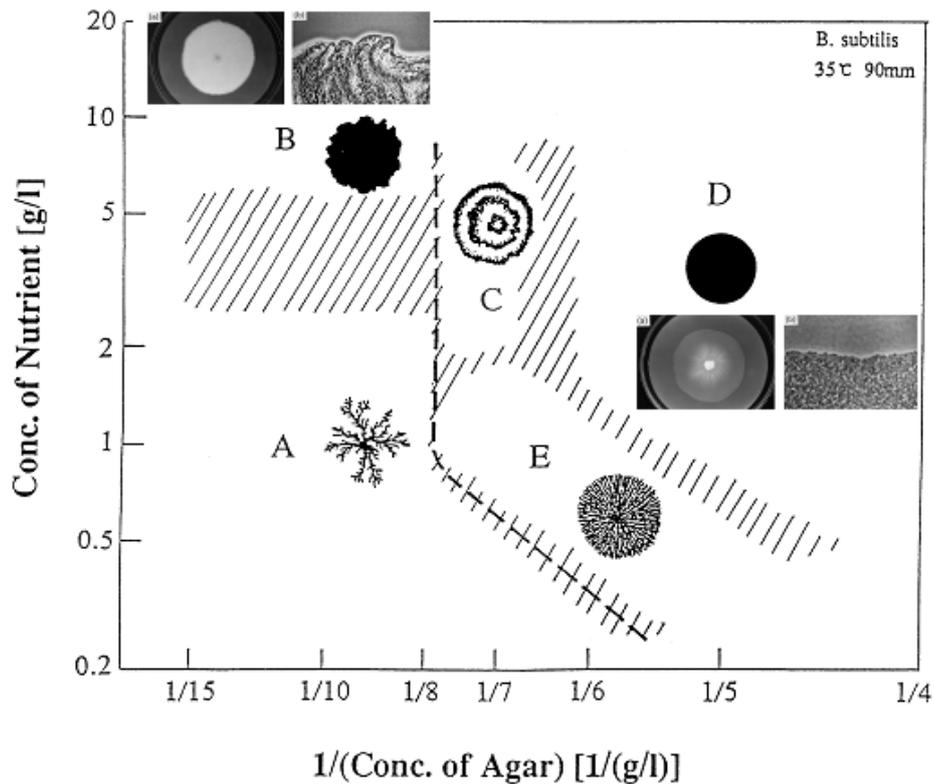


Figura 2.4: Diagrama de fases morfológicas de *B. Subtilis*, variando as concentrações de nutrientes e de agarose. Figura extraída de [3].

SOLUÇÃO DE BACTÉRIAS E POLÍMEROS Lambert e colaboradores [4] estudaram um sistema composto pela bactéria *E. coli* e polímeros e verificaram que há um aumento da dimensão fractal com o passar do tempo. Além disso, foi mostrado que o tempo de agitação da amostra também influenciou na dimensão fractal encontrada: para 60 minutos de agitação, as dimensões encontradas são maiores do que para 10 minutos.

2.2 SIMULAÇÕES

Recentemente Huang e colaboradores [5] descreveram a formação de padrões fractais a partir de simulações computacionais com um modelo do tipo DLA (diffusion limited aggregation). Nesse modelo, uma semente central cresce quando agentes difusores seguindo um caminho aleatório colidem e ligam-se ao agregado em crescimento. Os parâmetros utilizados são baseados em princípios físicos que levam em conta as diferentes influências que a nutrição tem na colônia de bactérias, chamadas pelos autores de agentes.

A difusão dos nutrientes, Y , é dada pelas equações:

$$\frac{\partial Y}{\partial \tau} = D\nabla^2 Y - B \frac{Y}{Y+A} \quad \text{na presença do agente } i \quad (2.1)$$

$$\frac{\partial Y}{\partial \tau} = D\nabla^2 Y \quad \text{na ausência de agentes} \quad (2.2)$$

E o comportamento da massa adimensional X , é descrito por:

$$\frac{dX_i}{d\tau} = C \frac{Y}{Y+A} (1 + X_i) \quad \text{para } X_i = 0 \quad (2.3)$$

$$\frac{dX_i}{d\tau} = C \frac{Y}{Y+A} (1 + X_i) - E \frac{1}{\sqrt{1+X_i}} \quad \text{para } 0 < X_i < 1 \quad i = 1, \dots, N \quad (2.4)$$

$$X_i^+ = 0; \quad X_{N+i} = 0 \quad \text{para } X_i^- = 1 \quad (2.5)$$

Cada um dos parâmetros utilizados e seus efeitos na dimensão fractal e forma da colônia será detalhado adiante.

CINÉTICA DE ABSORÇÃO DOS NUTRIENTES Segundo os autores, o parâmetro mais influente no modelo é aquele correlacionado com a cinética de absorção de nutrientes pelos agentes, denominada de parâmetro A. As simulações numéricas foram realizadas com $A=0$, ou seja, em absorção de nutrientes, até 4, onde ocorre a absorção total desses.

A Figura 2.5 mostra que a estrutura da colônia depende fortemente desse parâmetro. Mais especificamente, a Figura 2.5.A mostra o gráfico da dimensão fractal obtida pelo método "box-counting" e a Figura 2.5.B mostra a razão entre agentes ativos, ambos em função de A. As morfologias correspondentes estão mostrados na Figura 2.5.C.

Para $A=0$, os nutrientes de fora da colônia não são capazes de difundir para o interior desta, uma vez que os nutrientes são rapidamente absorvidos pelos agentes no perímetro. Assim sendo, o número de agentes ativos decresce com A e conseqüentemente, a dimensão fractal dessas colônias é pequena.

Para $A \gg 1$, não há o esgotamento rápido dos nutrientes, mas tampouco o número de agentes ativos cresce indiscriminadamente. A explicação dada pelos autores é que isso ocorre porque os agentes consomem sua massa para gerar energia cinética. Quando a taxa de absorção de nutrientes não é suficiente para compensar a energia necessária, a massa de cada agente tende ao seu mínimo. Como resultado, os agentes tornam-se imóveis e a colônia apresenta uma forma não fractal com poucas ramificações. Um exemplo típico, para $A=4$, é mostrado na figura 2.5.C, mostrando um comportamento similar ao observado experimentalmente na figura 2.4, na morfologia do tipo D.

Por outro lado, para valores intermediários de A, os agentes se auto-organizam em colônias com uma estrutura fractal. Para $A=0.25$, obteve-se uma dimensão fractal igual a 1.75 que diminui com o aumento de A.

A transição entre esses três regimes encontrados se deve ao fato de que as colônias atingem um estado estacionário. Isso ocorre porque os efeitos da movimentação e da divisão da colônia na massa total acabam se anulando, ou seja, a absorção de nutrientes resulta no aumento da massa, mas o movimento consome energia metabólica, diminuindo-a.

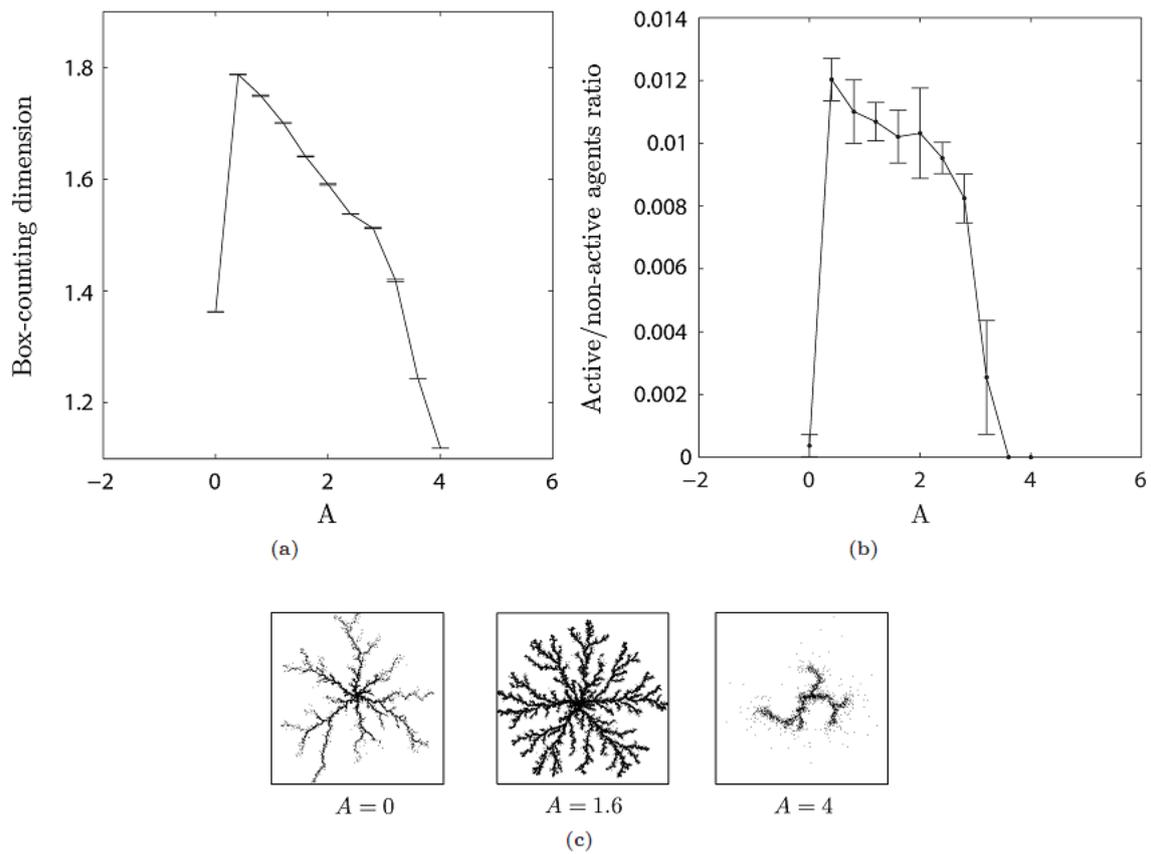


Figura 2.5: Efeito do parâmetro A na estrutura da colônia. Figura extraída de [5].

ABSORÇÃO DOS NUTRIENTES Além da cinética de absorção, outros parâmetros foram introduzidos para um detalhamento maior dos sistemas. O parâmetro B está correlacionado com a diminuição da camada de nutrição, enquanto que o fator C complementa a descrição da absorção dos nutrientes pelos agentes, sendo que a dimensão fractal atinge um platô a partir de determinado valor de C, o que representaria a saturação da absorção por parte desses agentes. Apesar da dimensão não se alterar, podemos observar que as estruturas têm padrões diferentes.

Para uma mesma concentração de nutrientes, uma diminuição devagar da camada de nutrição (B) tem efeitos similares a uma absorção alta dos nutrientes (C) (Figuras 2.6A e 2.6C).

A contribuição da massa foi descrita pelo parâmetro E. Podemos observar na Figuras 2.6E e F que, respectivamente, a fração de agentes ativos decresce com o aumento de E e que a dimensão fractal decai linearmente com o aumento da contribuição da massa.

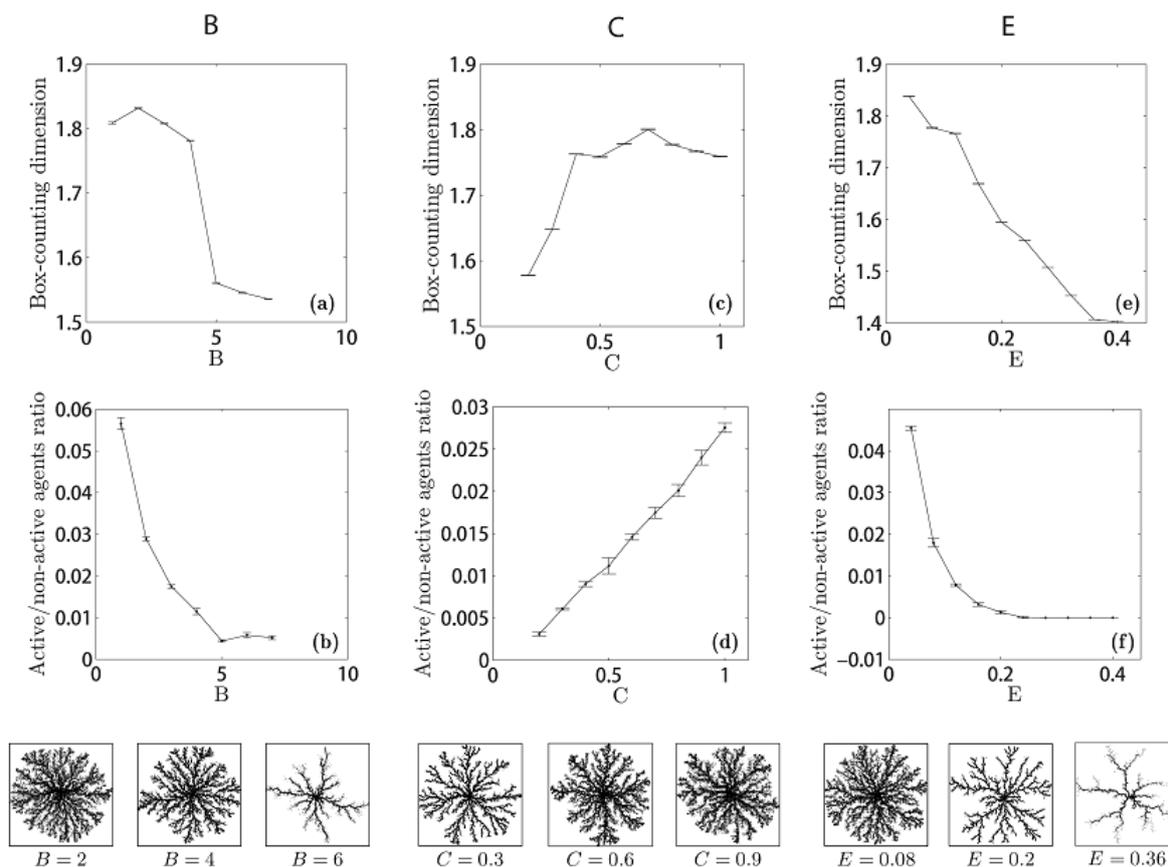


Figura 2.6: Efeito dos parâmetros B, C e E na estrutura da colônia. Figura extraída de [5].

DIFUSIVIDADE DOS NUTRIENTES NA CAMADA DE NUTRIÇÃO O parâmetro D é a difusividade adimensional dos nutrientes da camada de nutrição. As estruturas obtêm suas formas características principalmente devido a difusão limitada dos nutrientes para os agentes, cujas ações dependem inteiramente da quantidade de nutrientes que são capazes de absorver. Assim sendo, esse é o parâmetro que mais influencia no processo de ramificação.

Uma ampla difusividade dos nutrientes na camada de nutrição produz efeitos similares a uma alta absorção dos nutrientes. Entretanto, os valores da dimensão fractal saturam para valores altos e há uma relação linear entre o número de agentes ativos e o parâmetro de difusividade.

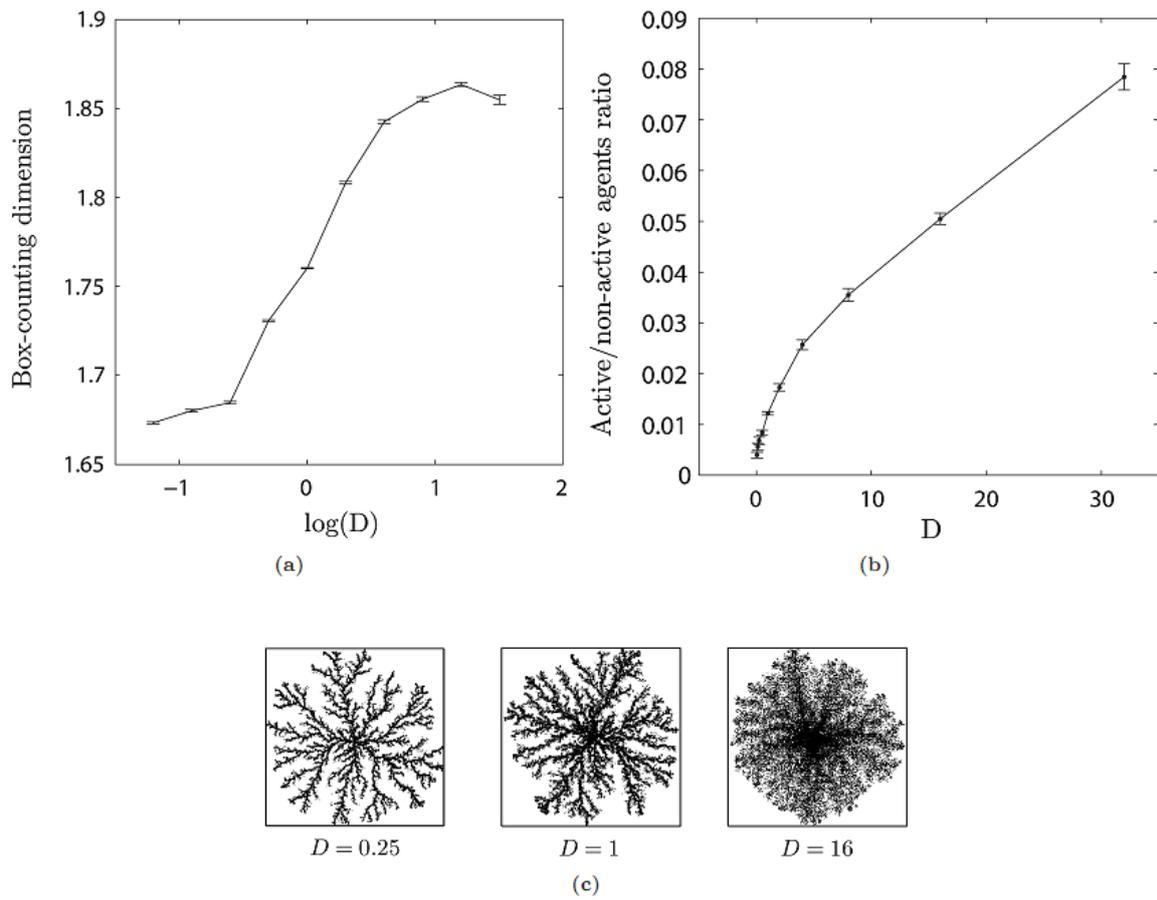


Figura 2.7: Efeito da difusividade adimensional dos nutrientes, D , na estrutura da colônia. Figura extraída de [5].

3 FENÔMENO DESCRITO PELA INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS

Fatores moleculares e genéticos, como a diferenciação das células e a diminuição dos nutrientes podem afetar na dinâmica de crescimento. Entretanto, na ausência de tais efeitos, a população de bactérias pode ser aproximada por um sistema físico com expansão rígida e capsulas que se dividem. Assim sendo, Rudge e colaboradores investigaram com experimentos e uso de modelagem computacional (CellModeller) se um dado sistema de capsulas que crescem, dividem-se e interagem localmente poderia gerar o padrão fractal observado nas colônias de *E. coli*. Tal bactéria, assim como as cápsulas simuladas, possui forma cilíndrica, com extremidades arredondadas, exibe crescimento extremamente regular e dinâmica de divisão.[6]

3.1 SIMULAÇÃO

O sistema modelado considera as seguintes premissas:

1. Células são cápsulas alongadas e rígidas;
2. As células são imóveis e movem-se apenas quando sujeitas a uma força;
3. A distribuição dos tamanhos das células em divisão é constante e cada célula se divide em duas;
4. A taxa de crescimento de cada célula é proporcional ao seu tamanho e
5. O crescimento é limitado por forças entre as células e provenientes do arrasto viscoso (Figura 3.2.A).

3.2 EXPERIMENTOS

As imagens foram obtidas com microscópio confocal de alta resolução. A colônia de bactérias cresceu por 12h em um meio com 1.5% de agar, a 37C.

Os autores observaram que, além dessa colônia de bactérias apresentar um padrão fractal, este é auto-similar, ou seja, a aparência fractal é observada em várias escalas utilizadas (de micrômetros a milímetros) como mostrado na Figura 3.1.

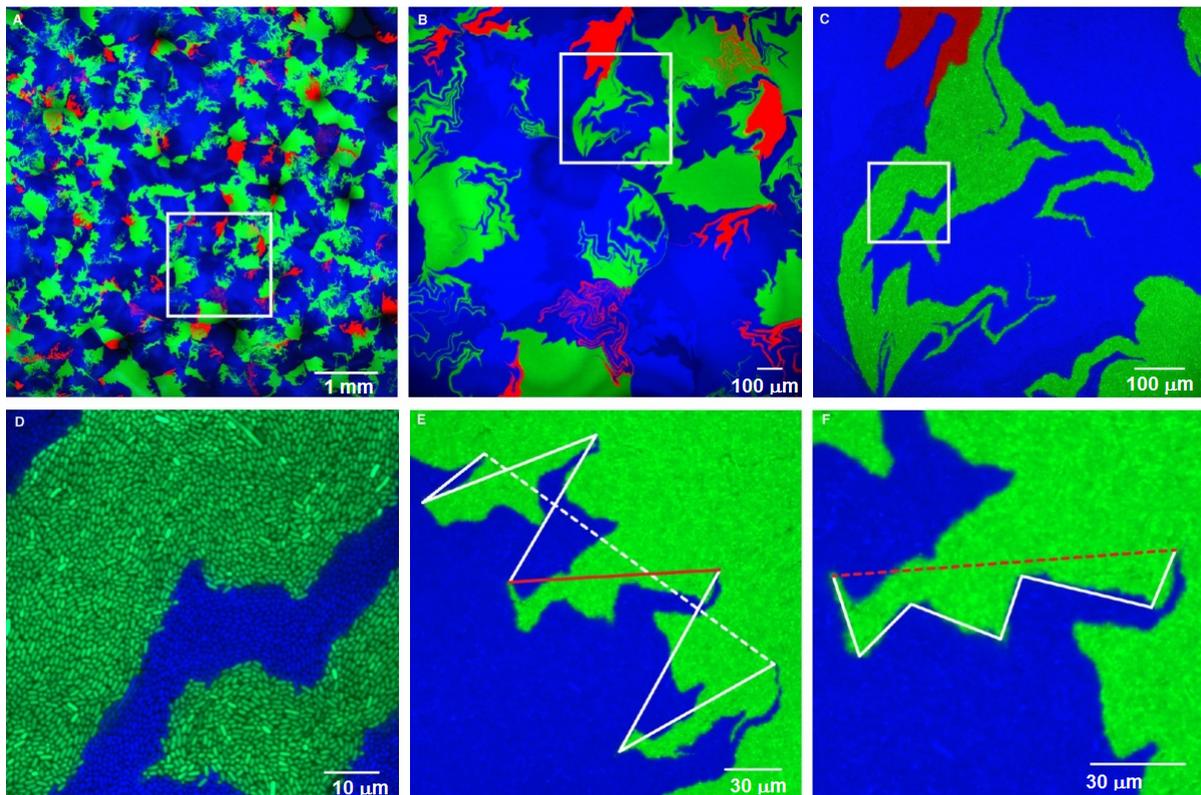


Figura 3.1: Formação de contornos entre populações de *E. coli*, as cores diferentes representam marcadores de fluorescência em três diferentes proteínas. Figura extraída de [6].

3.3 COMPARAÇÃO ENTRE SIMULAÇÃO E DADOS EXPERIMENTAIS

As simulações reproduziram as características de alinhamento celular e as formas dos domínios observados experimentalmente para colônias de *E. Coli*. (Figura 3.2C e D). O desenvolvimento de uma fronteira entre dois domínios em crescimento observado por microscopia confocal (Figura 3.2.E) teve seu comportamento reproduzido ao longo do tempo por simulações com condições iniciais similares (Figura 3.2.F). As propriedades características e complexas dos domínios observados experimentalmente também foram alcançadas por simulações (Figura 3.2G-J). Além disso, as dimensões fractais obtidas foram consistentes com as imagens de microscopia. (Figura 3.2K).

3.4 EFEITO DA FORMA CELULAR NA GEOMETRIA DA FRONTEIRA DO DOMÍNIO

As forças físicas entre as células de uma população são altamente dependentes da forma celular e orientação de crescimento. Em particular, formas axiais produzirão distribui-

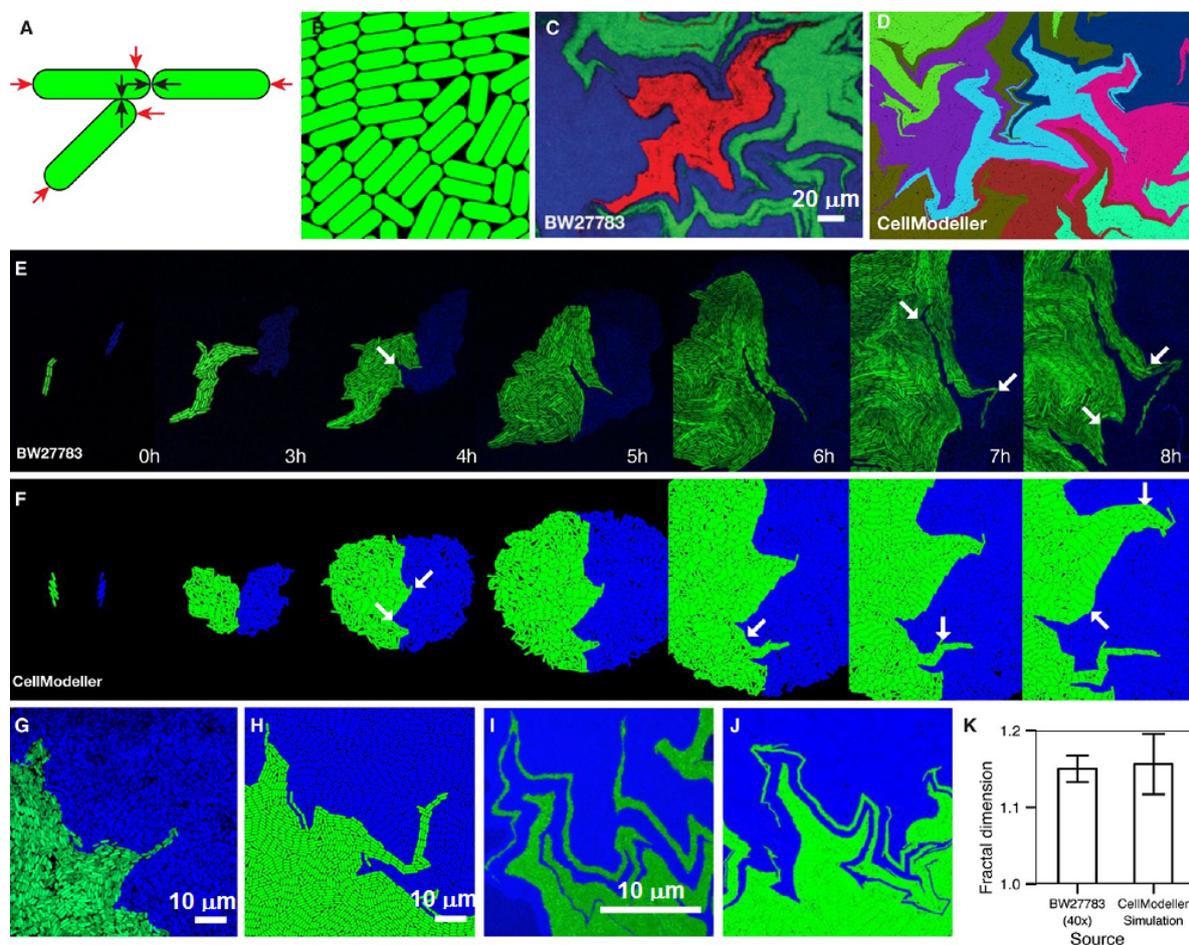


Figura 3.2: (A): modelagem do arraste viscoso; (B): arranjo das células simuladas é similar aos experimentos; (C, D): comparação entre experimento e simulação das células alongadas; (E, F): comparação da evolução temporal; (G-J): comparação dos contornos dos domínios; (K): comparação das dimensões fractais . Figura extraída de [6].

ções localmente anisotrópicas de forças. Esse modelo biofísico sugere que essas forças axialmente alinhadas e anisotrópicas são forças compressivas que levam a instabilidades e causam o dobramento desses contornos (Figura 3.3.A). Alinhamentos dos eixos celulares também contribuem para a anisotropia das forças do biofilme, amplificando os efeitos de torção (Figura 3.3B-F).

Além disso, no que diz respeito ao tamanho da célula, foi verificado que há um pequeno aumento no valor da dimensão fractal com o aumento do tamanho da célula (Figura 3.3.G)

Seguindo os mesmos procedimentos, foram estudados os domínios celulares de populações de duas mutações de *E. coli*: KJB24, que faz com que ela tenha uma forma esfé-

rica (Figura 3.3.I) e BW27783, que acentua o comportamento cilíndrico (Figura 3.3.H). Além da observação de um contorno mais suave para as células esféricas, a dimensão fractal também é mais próxima de 1 (Figura 3.3.J), indicando que a formação de padrões fractais está possivelmente relacionada com as interações entre células cilíndricas.

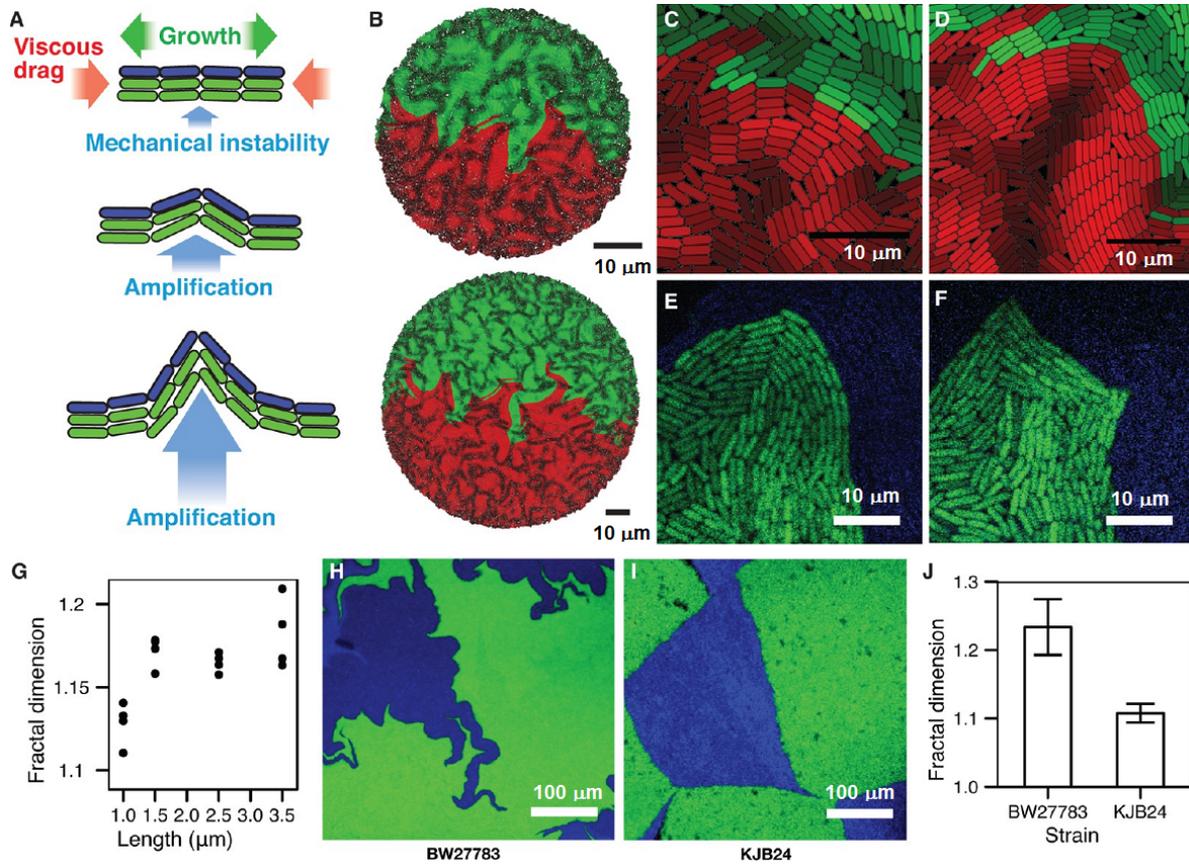


Figura 3.3: (A) Uma iteração do processo que produz as torções; (B): Alinhamento celular em dois momentos sucessivos; Dobramento das regiões ordenadas: (C-D): simulação, (E- F): microscopia confocal; (G): efeito do tamanho da célula na dimensão fractal; Comparação do contorno de células cilíndricas (H) com esféricas (I) e o efeito da dimensão fractal (J). Figura extraída de [6].

Assim sendo, foi possível encontrar trabalhos na literatura que descreveram e correlacionaram como a interação da colônia de bactérias com os nutrientes e o meio ao seu redor influenciam na formação de padrões fractais em colônias de bactérias.

Além disso, um modelo simplificado de interações locais entre as células produz uma morfologia fractal comparável às observadas experimentalmente. Esses resultados recentes sugerem que as interações físicas também têm fundamental importância nos padrões observados de domínios celulares.

REFERÊNCIAS

- [1] D. J. Barry, “Quantifying the branching frequency of virtual filamentous microbes using fractal analysis,” *Biotechnology and Bioengineering* **110** (2013) 437–447.
- [2] T. Matsuyama and M. Matsushita, “Self-similar colony morphogenesis by gram-negative rods as the experimental model of fractal growth by a cell population,” *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(4) (1992) 1227–1232.
- [3] M. Matsushita, J. Wakita, H. Itoh, I. , T. Matsuyama, H. Sakaguchi, and M. Mimura, “Interface growth and pattern formation in bacterial colonies,” *Physica A* **249** (1998) 517–524.
- [4] S. Lambert, S. Moustier, P. Dussouillez, M. Barakat, J. Bottero, J. L. Petit, and P. Ginestet, “Analysis of the structure of very large bacterial aggregates by small-angle multiple light scattering and confocal image analysis,” *Journal of Colloid and Interface Science* **262** (2003) 384–390.
- [5] Y. Huang, I. Krumanocker, and M.-O. Coppens, “Fractal self-organization of bacteria-inspired agents,” *Fractal* **20** (2012) 179–195.
- [6] T. J. Rudge, F. Federici, P. J. Steiner, A. Kan, and J. Haseloff, “Cell polarity-driven instability generates self-organized, fractal patterning of cell layers,” *ACS Synthetic Biology In Press* (2013) DOI:10.1021/sb400030p.