



TÍTULO

ESTUDIOS MEDIANTE SIMULACIÓN DE LOS MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS DEL CRECIMIENTO Y DIVISIÓN BACTERIANA

AUTOR

Andrés Delgado Campos

	Esta edición electrónica ha sido realizada en 2022
Director	Dr. D. Alejandro Cuetos Menéndez
Instituciones	Universidad Internacional de Andalucía ; Universidad de Huelva
Curso	<i>Máster Universitario en Simulación Molecular (2020/21)</i>
©	Andrés Delgado Campos
©	De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía
Fecha documento	2021

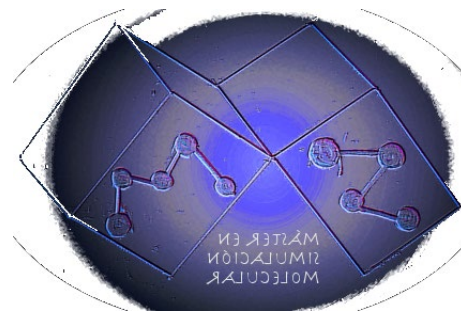


**Atribución-NoComercial-SinDerivadas
4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)**

Para más información:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>



Estudios mediante simulación de los mecanismos homeostáticos del crecimiento y división bacteriana

Andrés Delgado Campos

Director: Alejandro Cuetos Menéndez

Trabajo de fin de master del Master oficial en
Simulación Molecular.

Diciembre 2021

Resumen:

Los microorganismos, como las bacterias, tienen una gran capacidad de colonizar multitud de ambientes y superficies mediante la formación del biofilms. Pese a que los investigadores llevan décadas estudiando su forma de vida y de crecimiento aún no se tienen todas las respuestas. Este trabajo busca aportar información a un debate existente entre las diferentes teorías que existen para explicar el mecanismo de crecimiento y división bacteriana.

Para ello, utilizando técnicas de Modelización basada en el individuo (IbM) de la bacteria *Pseudomonas putida*, y distintos escenarios de simulación, mostrar las diferencias, si existen, producidas en las colonias según qué tipo de mecanismo homeostático de crecimiento entre los propuestos en la literatura: Adder o Sizer. También, se han tenido en cuenta los distintos crecimientos posibles para cada bacteria individual: lineal y exponencial.

Los resultados obtenidos muestran como los distintos escenarios de crecimiento no generan características que los diferencien. Sin embargo, el parámetro Γ , creado para controlar el efecto de la difusión y del crecimiento, produce diferencias características, según su valor, en la estructura y morfología de la colonia.

Abstract:

The microorganism, like bacteria, have are incredible able to colonize new environments and surfaces by protection given by the biofilm. Although, researchers have spent decades studying their way of life and growth yet there are still many answers to be found. This thesis aims to give some information to the discussion between the different theories that try to explain the different mechanism that control the bacterial growth and division.

This thesis tries to prove, by using techniques of Individual based modelling (IbM) in *Pseudomonas putida* and distinct simulated scenarios, the differences, if they exist, produced in the colonies depending of which growth homeostatic mechanism, proposed in the literature, was used: Adder or Sizer. It was also taken in account both types of growth bacteria can use, linear or exponential.

The results show how the growth models do not create a distinct difference between them, as it can be explained by the statistical noise. However, the parameter Γ , created to control the effect of the diffusion and the growth rate, did create significant differences in the structure and morphology of the colonies.

Agradecimientos:

A quien más agradecido estoy por haber podido completar este trabajo es a Alejandro Cuetos, por todo lo que me ha enseñado no solo de simulación sino de la investigación. Por permitirme que este trabajo luego pueda convertirse en un paper y sobre todo por su infinita paciencia conmigo, gracias a eso este trabajo ha llegado a presentarse.

También, quiero agradecer a mis padres y amigos por aguantarme todo este tiempo y sobre todo a mi madre por echarme una mano a que mi escritura sea legible.

Gracias a todos,

Andrés.

Índice

1.	Introducción:	7
1.1	Mecanismos de control.....	8
1.1.1	Sizer:	8
1.1.2	Adder:.....	9
1.2	Biofilm bacteriano:.....	10
1.3	<i>Pseudomonas putida</i> :.....	12
1.4	Precedentes de simulación:.....	14
1.5	Objetivos:	16
2.	Métodos:.....	17
2.1	Modelización de <i>P.putida</i> :	17
2.2	Condiciones de la simulación:.....	18
2.3	Cinética del crecimiento:	21
3.	Resultados:	26
4.	Conclusión.....	39
5.	Bibliografía	40
6.	Anexo	43

1. Introducción:

El tamaño es un parámetro de los seres vivos, tanto unicelulares como pluricelulares, que presenta una gran influencia en la vida de éstos, así como el ritmo metabólico, la temperatura interna, los cambios citoplasmáticos, la viabilidad de la célula y la ratio de volumen-superficie¹. En la naturaleza mantener un tamaño consistente generación tras generación, permite la supervivencia de las células de cualquier tipo de organismo. Si se produce, por ejemplo, un aumento de tamaño celular se produciría también un incremento del volumen de la célula manteniendo la superficie sin apenas cambios. Ello implica una mayor facilidad para mantener temperatura, pero una menor superficie para obtener la nutrición necesaria, poniendo en peligro la supervivencia de dicha célula ². En 1958 Maalow, Schaechter y Kjeldgaard pudieron explicar la consistencia del tamaño celular estableciendo el principio básico de la fisiología microbiana, la Ley del crecimiento: *“El tamaño medio celular es proporcional a la ratio de crecimiento impuesto por los nutrientes”* ³, Esta ley fue escrita como consecuencia de la mera observación sin tener aún ningún conocimiento de los mecanismos que permitían a las células mantener la homeostasis del tamaño.

A día de hoy, aunque se han realizado avances muy importantes, tanto en cantidad como en calidad de las mediciones de las células a nivel individual, no existe un consenso de cuál es el mecanismo que permite la función de homeostasis del tamaño celular, puesto que casi ninguna de las teorías que se han desarrollado al respecto es capaz de explicar el proceso de crecimiento y división en las distintas especies celulares ⁴. Las razones que dificultan el consenso de los mecanismos subyacentes de la homeostasis del tamaño son:

-La dificultad de estudiar una célula, bacteria, ... durante sus distintos ciclos celulares y hacerle las suficientes mediciones de tamaño³.

-La dificultad de estudiar su tamaño y a la vez como éste es influenciado por el ADN puesto que una ligera mutación dicho genoma podría variar el comportamiento de la célula^{1,4}.

-Según qué parámetros de la célula se midan, éstas pueden interpretarse que siguen alguno de los mecanismos homeostáticos sugerido en la literatura, o una combinación de ellos, ya que la línea que las separa en ocasiones es muy fina⁴.

Los tres mecanismos del control del tamaño celular más aceptados son Sizer, Adder y timer, centrándose este trabajo en las dos primeras. Antes que nada, es necesario hacer un breve resumen de las características y diferencias de cada uno de estos mecanismos. Así el primero, llamado timer, consiste en que la célula intenta

crecer durante un tiempo determinado antes de dividirse, lo que plantea ciertos problemas ya que la acumulación de moléculas divisorias no va a la par del crecimiento ⁵. El mecanismo Adder supone que una célula, tras dividirse, tiene un incremento de tamaño máximo y que una vez alcanzado éste comienza de nuevo proceso de división. Este incremento puede generar una célula adulta de un tamaño mayor o menor que la célula que le dio lugar (célula madre) puesto que, aunque en una colonia las células tienden a crecer hacia el tamaño promedio de la colonia, el incremento de cada una es independiente ². Por último, el mecanismo Sizer consiste en que, tras la división celular, la nueva célula crece hasta un tamaño preestablecido al nacer, tras el cual se dividirá y creará unas colonias en las que sus células alcanzan el tamaño promedio en apenas una o dos generaciones ⁶.

Aparte de la discusión sobre el mecanismo que siguen las células para crecer y dividirse, existe otra controversia en el estudio de las formas de crecimiento celular/bacteriano que tiene que ver con el crecimiento de cada célula individual, es decir, si este es lineal o exponencial. La teoría aceptada era la del crecimiento exponencial, pero cada vez que se dividen las células la fluctuación del tamaño de éstas aumenta por lo que sería difícil mantener una homeostasis del tamaño adecuado ³. Este es otro tema que exploramos en este TFM: Si existe la necesidad de elegir qué modelo de crecimiento, lineal o exponencial, se adapta mejor al modelo de simulación con el que se quiera investigar.

A continuación, paso a explicar los dos mecanismos que se han utilizado en este TFM para el desarrollo de los modelos, de los que queremos verificar si la utilización de uno u otro supone una gran diferencia en las simulaciones, Sizer y Adder.

1.1 Mecanismos de control

1.1.1 Sizer:

Las células que siguen el mecanismo Sizer tienen un tamaño requerido que debe alcanzar para poder dividirse, da igual cual fuera el tamaño de la célula al nacer porque si no llega al tamaño marcado en ella, no se dividirá ^{6,7}. Mayormente se consideran a las eucariotas y a las levaduras como Sizer. Aunque ha habido un aumento sustancial de las mediciones de la homeostasis del tamaño, los mecanismos que la mantienen no están completamente definidos, y no hay consenso de las implicaciones de parecidos y diferencias que tiene este control sobre el crecimiento celular ⁸.

El tamaño medio de las células Sizer está regido por el ambiente, por el número de células que tiene alrededor suyo y por los nutrientes presentes en dicho ambiente. Así, siempre que las condiciones se mantengan constantes el tamaño no cambiará ². Pese a que en un principio las células pueden tener un tamaño distinto unas a otras,

al activarse el mecanismo Sizer en un mismo ambiente, el tamaño, el incremento de longitud y la velocidad de crecimiento se adaptaran para mantener el tamaño medio de división ⁶. El mecanismo Sizer actúa extremadamente rápido y en una única generación por lo que se puede ver ampliamente sus efectos. Sin embargo, esto no significa que según pasen las generaciones no haya ningún tipo de variación ya que se ha demostrado que las células individuales pueden desviarse un 19-26% de su tamaño sin que el tamaño medio poblacional se vea afectado, lo que permite es que el mecanismo sea más flexible y robusto a la hora de controlar el tamaño de la población ².

A día de hoy se piensa que el mecanismo Sizer puede estar regulado en cierta medida por la acumulación de proteínas, que varían según la especie estudiada y que se acumulan a un ritmo parecido al del crecimiento de la propia célula ⁶. En estudios que buscan producir una división acelerada para ver los efectos en las células pudieron apreciar cómo una de estas moléculas se acumulaba a un ritmo superior al normal ⁷. En otros estudios en los que detenían el crecimiento celular comprobaron cómo la división tampoco sucedía, pese a que si se inhibe la división el crecimiento celular se mantiene ¹.

Se ha comprobado que es posible romper con el mecanismo de la homeostasis en células que siguen el patrón Sizer, ya sea por sobreacumulación de proteínas que producen la división como por mutaciones. En bacterias de crecimiento lento, que no presentan múltiples orígenes de replicación de su ADN, la acumulación de moléculas como FTSZ o acumuladores parecidos al ADN-A pueden provocar la división celular sin que la duplicación del ADN se complete ⁸. Por otro lado, en la literatura revisada no se ha encontrado que las mutaciones que afectan al tamaño no sean del todo indicativas de la afección a los mecanismos relacionados en la homeostasis, ya que son difíciles de distinguir los implicados en la división de los que afectan a la maquinaria que controla el tamaño previo a la división.

1.1.2 Adder:

El mecanismo Adder se centra en que toda célula tiene asignada un incremento de tamaño celular tras la división y que este incremento es constante, o por lo menos muy parecido, en todas las células de una población ³. Este incremento de volumen es fijo y no tiene en cuenta el tamaño de la célula tras la división, ⁹ permitiendo que según vayan pasando las generaciones, poco a poco, las células vayan adquiriendo un mismo tamaño. Si las células son más grandes que la media, el incremento de tamaño será menor que el tamaño que tenía la célula al dividirse, por tanto, al volver

a dividirse habrá reducido su tamaño. Esto también ocurre a la inversa, es decir, las células pequeñas van creciendo lentamente hasta que se llega a la homeostasis del tamaño. Para que esto tenga efecto hay que matizar que las divisiones de las células que tienen el mecanismo Adder, se hacen por la mitad generándose de una célula madre dos células hijas aproximadamente iguales ^{2,6}.

Las células que siguen el mecanismo Adder tienen que cumplir una serie de claves para que este tipo de crecimiento tenga efecto:

- Las células individuales tienen que crecer exponencialmente ².
- La biosíntesis balanceada de todas las moléculas iniciadoras de la división celular tiene que ser producidas al mismo ritmo que crece la célula ¹⁰.
- Para que suceda la división, las moléculas iniciadoras tienen que llegar a un umbral para que se inicie el proceso ^{2,8}.

Al igual que el mecanismo Sizer, para que Adder sea un mecanismo robusto que pueda mantenerse en distintas condiciones necesita que sea bastante flexible. Por eso, pese a que hay fluctuaciones en el incremento de tamaño de célula a célula, hasta de un 40%, el tamaño medio no varía o se acerca a la media ⁹. Esto provoca una dificultad a la hora de separarlo del mecanismo Sizer y del propio estudio de cuánto afecta la acumulación de moléculas iniciadoras de la división al tamaño celular ¹⁰. Otra razón que dificulta su estudio es que distintas especies celulares usan genes distintos para mantener el mismo, lo que retrasa el estudio al tener que encontrar cuales son los genes implicados ⁵.

Al igual que con Sizer, las mutaciones pueden suponer una gran variación de tamaño y una complicación en el estudio del mecanismo, puesto que son capaces de romper el equilibrio homeostático tanto de forma directa como indirecta ⁹. La disrupción de este mecanismo también es posible por una mala acumulación de las moléculas que inician la división, ya sea por obra propia o de factores ambientales, así como la falta de mecanismos de replicación del ADN que vayan a la par del crecimiento de la célula ⁸.

El objetivo de este trabajo es ver la influencia que tienen estos mecanismos en las propiedades estructurales de los primeros estadios de las colonias bacterianas, también conocidos como biofilms, por medio de métodos de simulación celular.

1.2 Biofilm bacteriano:

Los biofilm bacterianos son un tipo de crecimiento colectivo de colonias bacterianas sobre un sustrato o en la interfase entre dos fluidos. Fue observado por

primera vez hace siglos por Antonie van Leeuwenhoek, pero el término biofilm fue acuñado por Costerton en 1978. En la década de 1990 surgió un verdadero entusiasmo por su estudio, debido mayormente a dos razones: la observación de cómo viven las bacterias en comunidad y la creciente resistencia a antibióticos y otros tóxicos que adquieren al crear el biofilm, debido a que presentaban problemas médicos e industriales ^{11,12}.

Los biofilms son estructuras que buscan aumentar la resistencia de colonias bacterianas que se encuentran ancladas a una superficie. Su composición varía no solo dependiendo de la bacteria que lo ha creado sino también de la información de ambiente en el que se encuentra, aunque normalmente esta matriz está compuesta por uno o más polisacáridos extracelulares, ADN y proteínas ^{11,13}. La matriz extracelular permite conexiones entre las bacterias y permite el paso de agua, oxígeno y nutrientes y también, si las condiciones se vuelven inviables para la vida, las bacterias dejarían de producir matriz extracelular para crear enzimas que les permitan liberarse del biofilm ¹³.

En "*Pseudomonas putida*" la clave de la regulación de su biofilm es el gen c-di-GMP, así como el gen *lapA*, que funciona también como una adhesina en experimentos hechos en laboratorio. La matriz extracelular formada consiste principalmente en celulosa, la proteína LapA, alginato y putida exopolisacárido a y b, que dan estructura al biofilm ^{13,14}. Cabe decir que el biofilm no es un elemento estático, sino que, durante su vida, y la de las colonias que tiene dentro, puede cambiar tanto su estructura interna como de forma, siendo normal que en biofilm maduros de *P. putida* se creen microcolonias con protuberancias ¹² (ver Figura 1).

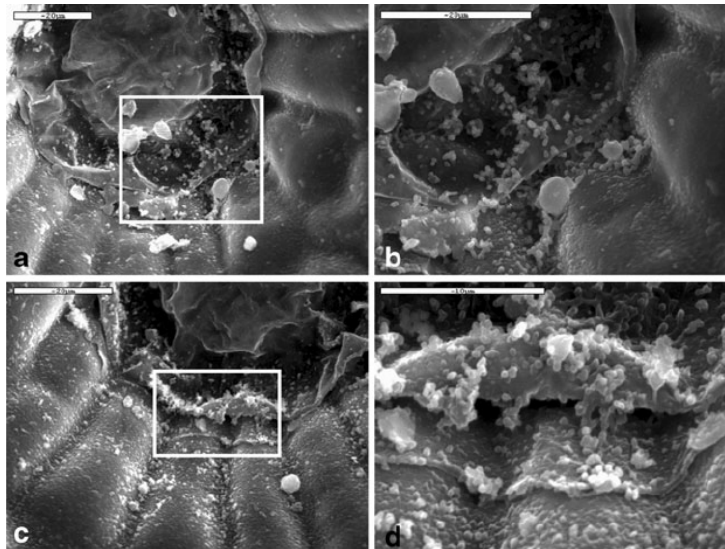


Figura 1. Formación de biofilm, tras 48 horas de incubación de *P. putida*, sacado de

15.

1.3 *Pseudomonas putida*:

El género *Pseudomonas* es muy complejo y a día de hoy presenta más de 250 especies ¹⁶. Este género fue publicado por Walter Migula en 1894 aunque desde que se describió por primera vez, ha sufrido distintos cambios. En 1973, la mejora de las técnicas genéticas permitió la separación bacteriana mediante su ARN ribosómico (16S), creando así los 5 grupos de proteobacterias, siendo *Pseudomonas* el grupo de las gamma proteobacterias (ARN-I) ^{16,17}.

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas, con capacidad de movimiento por el uso de uno o varios flagelos. Son aerobias con un tipo de respiración que tiene como último aceptor de los electrones el oxígeno, aunque en algunos casos puede utilizar el nitrato como un aceptor alternativo, pudiendo así vivir en ambientes anaerobios. La mayoría de las especies pueden crecer sólo en ambientes con un pH superior a 4'5. Otras especies son mayoritariamente catalasa positivos quimioorganotrofos que, al no requerir, por ende, factores de crecimiento orgánicos ello le permite adaptarse a una gran cantidad de hábitats como animales, plantas, suelos limpios o contaminados, aguas limpias y contaminadas y la rizosfera ^{18,19}.

Las *Pseudomonas* son capaces de habitar en una gran diversidad de nichos ecológicos debido a que poseen una gran cantidad de transportadores y enzimas, que

catabolizan diversas fuentes de carbono y, por otra parte, un numeroso grupo de reguladores genéticos que permiten esa flexibilidad ²⁰. Este género ha sido mal considerado por ser patógenos oportunistas tanto de humanos como de plantas, teniendo en estas últimas un gran efecto negativo en la producción y en la economía de diversas regiones del mundo ¹⁸.

Por la capacidad de vivir adecuadamente en una gran cantidad de hábitats distintos, unos requisitos alimenticios muy bajos y una gran versatilidad metabólica ¹⁹ la bacteria *P. putida*, en especial la cepa KT2440, ha sido extensivamente estudiada, que se muestra en la figura 2. Aun así, las condiciones que propician el crecimiento óptimo son una temperatura entre 25 y 30°C en un ambiente con fuentes rápidas de carbono y alta aireación ¹⁶.

Esta cepa ha sido completamente secuenciada, establecida para su modificación genética y clonación, presentando además tolerancia a solventes y estrés oxidativo ²⁰. A día de hoy se usa en estudios de biodegradación de contaminantes en parajes naturales, como el petróleo ²¹ y en el desarrollo de nuevos compuestos biológicos que buscan reducir la dependencia de los derivados del petróleo, como los polihidroxicanoatos (PHAs) ²², ramnolipidos, terpenoides, péptidos no ribosómicos ²³ y biocombustibles ²⁰.

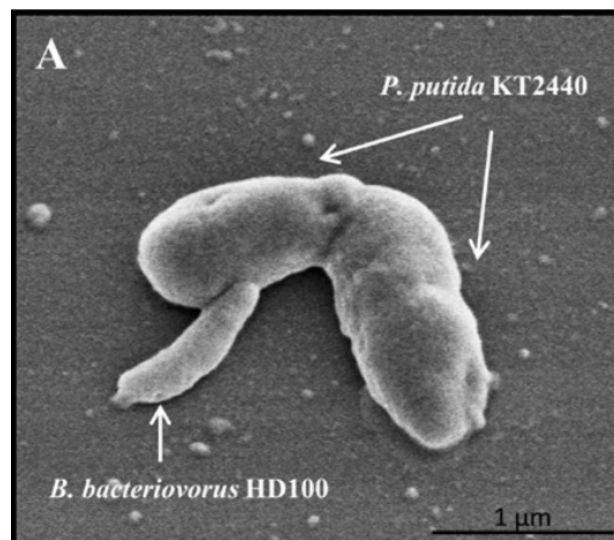


Figura 2. *P. putida* KT2440, de ²⁴.

Debido a las amplias propiedades y a su facilidad para ser usada en el laboratorio de forma experimental ¹⁶, es imperativo la creación de simulaciones cada vez más fiables que permitan tanto acelerar como facilitar el uso de estas bacterias en la investigación. Por las características que hemos expuesto previamente hemos elegido a *P. putida* KT2440 (Figura 2) como la especie que será modelada en este trabajo.

1.4 Precedentes de simulación:

La simulación molecular busca reproducir el comportamiento a tamaño microscópico de la materia por medio de técnicas de computación que siguen las leyes de la mecánica estadística. El objetivo final es predecir el comportamiento macroscópico de la materia, así como entender los fenómenos microscópicos que lo explican ²⁵.

En la década de 1950 nació la simulación molecular mediante la realización de simulaciones simples, como las simulaciones de condiciones de moléculas de contorno periódico y de un número limitado de partículas ²⁶. El objetivo principal era poder investigar moléculas o sistemas demasiado pequeños para ser estudiados en un laboratorio ²⁷. Mediante la mejora computacional de los ordenadores, así como los algoritmos y sistemas de análisis y procesamiento de datos se han desarrollado las dos técnicas más usadas en la actualidad, el método de Monte Carlo y la Dinámica Molecular. Esto también ha supuesto una apertura a otros campos de la ciencia que pueden usar estas técnicas para apoyar o incluso permitir nuevas investigaciones que supondría muchos problemas de ser realizados *in vivo* ^{28,29}.

La mejora continuada de los algoritmos, los avances de las metodologías estadísticas, la mejora de computación de los ordenadores son parte de las razones por las que el análisis de datos y su procesamiento han mejorado cuantiosamente. Esto permitió una gran evolución de la bioinformática y el desarrollo de nuevas técnicas y modelos de simulación, facilitando su uso y posibilitando el estudio de modelos más fiables, potentes y capaces de llevar los modelos atómicos a las distintas ramas científicas, tanto teóricas como experimentales. Dos campos muy favorecidos por la simulación molecular son la biomedicina, para pruebas de fármacos ³⁰, desarrollo tisular ³¹ o para la comprensión de cómo actúan las células eucariotas en enfermedades ³² y la microbiología, para la investigación de estructuras bacterianas ³³ así como para estudios poblacionales que buscan entender mecanismos propios de las bacterias, ^{8,34} como es el caso de este trabajo de fin de master que trata de entender las relaciones existentes entre los mecanismos Sizer y Adder, que mantienen el equilibrio homeostático del tamaño en *P. putida*.

En la década de los 80 se realizaron los primeros trabajos de modelización matemática en las que usaban modelos continuos, principalmente en una dimensión

espacial, para el estudio de biofilms. Este tipo de investigaciones buscan el estudio del espesor, la dinámica y de la distribución espacial de los biofilms por medio de modelos basados en una descripción continua de los modelos de conservación. Mas adelante apareció el modelo de agregación de difusión limitada (DLA) que permite modelar el patrón de crecimiento y que funciona liberando una partícula en un punto origen; tras esto se libera una segunda partícula en un punto lejano del origen y se le permite moverse aleatoriamente hasta llegar a un lugar cercano al punto de origen para después liberar otras partículas, una a una. Esto acaba creando un patrón de crecimiento ramificado aleatorio ³⁵. Posteriormente fueron desarrollados los modelos celulares automatizados, los cuales permitían reproducir comportamientos complejos que posibilitan la inclusión en éstos de la reproducción y movimiento bacteriano, la comunicación célula a célula e incluso la difusión de los nutrientes ³⁶. Ello, unido a un mayor conocimiento de las propiedades del biofilm, permitieron la aparición de modelos más complejos que unían la formación de teorías de dinámica de fluidos con la formación del biofilm.

Con un cambio de perspectiva, los nuevos estudios empezaron a centrarse más en cada una de las partículas que conformaban los sistemas buscando entenderlas como sujetos distintos y autónomos, naciendo la necesidad de un nuevo tipo de simulación que dio lugar a la aparición de la modelización basada en el individuo (Individual-based Modelling o Individual-based Models, IbM) ³⁷. [92] Este tipo de modelos permiten simular las acciones y las interacciones de cada elemento dentro de un entorno y estudiar las reacciones que tienen dichas acciones sobre otros individuos o el ambiente, pasando esto con todos los elementos del modelo a la vez. Esto permite el control de las distintas operaciones simultáneas que pueden realizar los individuos, de forma que se simulan las interacciones y acciones que se desarrollan o evolucionan entre ellos.

Los primeros trabajos con este modelo simulaban unas bacterias simples, simuladas como si fueran esferas, pero según se iba mejorando el modelo se pudieron variar sus tamaños, permitir su crecimiento y desencadenar su división al llegar a cierto tamaño o volumen. Todo esto mientras se toma en cuenta dónde se encuentra el sustrato para que crezca, la presión que ejerce una bacteria hacia la que tiene a su lado y la distancia que tiene que existir entre una y otra, así como la disposición relativa de una frente a la otra ³⁸.

Según ha ido avanzando en el uso de este tipo de modelos se han ido diversificando. Pese a que en un principio se utilizaba en modelos ecológicos, posteriormente empezó a ser utilizado en el área de la biología, para el estudio de tejidos complejos, embriogénesis o desarrollo tumoral entre otros usos ³². La posibilidad de realizar estas simulaciones permite a los investigadores hacer cualquier número de repeticiones necesarias de una forma más rápida y sin depender de encontrar a sujetos que cumplan los requisitos del estudio, factor que limita la realización y la significancia estadística de muchos estudios *in vivo*.

1.5 Objetivos:

Los objetivos de este Trabajo de Fin de Master son la modelización de un biofilm bacteriano bidimensional. Con el objetivo de poder investigar y comprobar cómo los distintos tipos de comportamiento en el crecimiento y división celular como son, Adder y Sizer, pueden inducir características propias en el crecimiento del biofilm. De confirmarse esto, nos proponemos buscar la detección de dichas características que nos permitan determinar el mecanismo homeostático que está presente en la creación de dichas características únicas.

Por otro lado, también es importante desarrollar un modelo teórico para los estudios *in vivo* dándole el peso adecuado a los distintos factores que interfieren en la reproducción celular. Por tanto, este trabajo ha utilizado modelos con características variantes, viscosidad, tasa de crecimiento, modelo de crecimiento (lineal y exponencial), con el objetivo de categorizar su importancia. También se busca comparar cómo la variación de estas características genera diferencias en los tamaños o en el tiempo de división.

2. Métodos:

2.1 Modelización de *P.putida*:

Este trabajo usa las primeras etapas de la vida y formación de un biofilm de la bacteria *Pseudomonas putida* en un entorno bidimensional. La *P. putida* posee una forma elongada que crece por alargamiento de su eje mayor, mientras que el eje menor se mantiene igual y, por esta razón, se han modelizado como partículas esferocilíndricas. Un esferocilindro es una figura formada por un cilindro que tiene en ambos extremos dos semiesferas con un diámetro igual al del cilindro. En este modelo el eje menor, o diámetro de las semiesferas, presenta longitud σ mientras que el eje mayor está formado por el cilindro de longitud L_0 más el radio de 2 semiesferas σ . Por tanto, la proporción de cada partícula en el inicio es de $L^*_0 = L_0 / \sigma + 1$, e irá creciendo por elongación polar con el tiempo a una velocidad, v_{gr} , que será seleccionada según las condiciones seleccionadas, mientras que el ancho de la partícula permanecerá constante. Aunque hay variaciones según la naturaleza del modelo, el tamaño máximo que tendrá la partícula antes de dividirse será $L_f = 2 * L_0$, entonces la partícula se dividirá transversalmente en dos bacterias hijas del mismo tamaño (L_0) y con la misma orientación que la partícula original. Los principales parámetros geométricos que definen a una bacteria a lo largo de su ciclo de alargamiento/división que se muestra en figura 3.

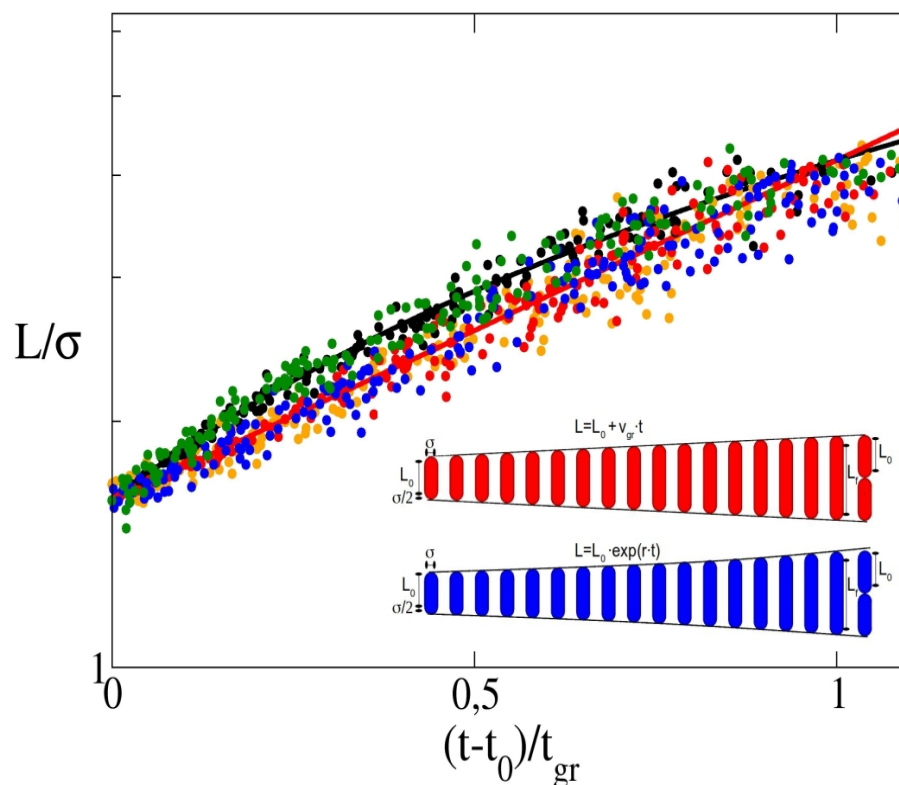


Figura 3. Nube de puntos de las formas de crecimiento, los puntos corresponden al tamaño de bacterias individuales en un momento del ciclo de vida para cada uno de los escenarios estudiados en este trabajo, (A1 [negro], A1V [rojo], A2S [verde], A2D [violeta], B1 [naranja] y B2 [azul]) que son explicados más abajo. Por otro lado, tenemos una representación gráfica del crecimiento lineal (rojo) y exponencial (azul).

El tamaño de *Pseudomonas* es variable y se encuentra entre los 0.5 μm y 3.0 μm de largo y los 0.5 μm y 1.8 μm de grosor, por tanto, se han tomado valores medios acordes ³⁹. Por tanto, como consecuencia de lo anterior, en este trabajo vamos a considerar como tamaño de referencia $L_0 = 1,6$. Consideramos que las bacterias interactúan unas con otras mediante el potencial esferocilindrico suave ^{40,41}:

$$U_{ij} = \begin{cases} 4\varepsilon \left[\left(\frac{1}{d_m^{**}} \right)^{12} - \left(\frac{1}{d_m^{**}} \right)^6 + \frac{1}{4} \right] & d_m^{**} \leq \sqrt[6]{2} \\ 0 & d_m^{**} > \sqrt[6]{2} \end{cases} \quad (1)$$

Donde j e i son dos bacterias genéricas y $d_m^{**} = d_m/\sigma$ es la mínima distancia posible entre ellas, siendo ε una medida de la intensidad de la interacción ⁴². Con esta interacción buscamos imitar la repulsión estérica entre las bacterias.

Estas bacterias al estar dentro del biofilm suelen carecer de flagelos y suponiendo que no tienen otros mecanismos de motilidad ligados a su superficie, aún podrían desplazarse de forma pasiva por contacto con otras bacterias o por difusión browniana. Para este estudio se ha elegido la técnica de Dinámica Browniana para modelar la difusión de partículas ⁴³, usando un parámetro difusional D_0 , que depende de la temperatura, la viscosidad media y la fuerza de adhesión entre la partícula y la superficie. Por tanto, la evolución del biofilm según pasa el tiempo está controlado por L_0 , v_{gr} y D_0 . Por otro lado, se ha definido “gamma”, (creado anteriormente por el grupo ⁴⁴), que es el parámetro usado para controlar el efecto de la difusión y del crecimiento. En la siguiente sección hablaremos de Γ con más detalle.

2.2 Condiciones de la simulación:

Para poder mejorar las estrategias básicas del modelo lbM para las primeras etapas del desarrollo de biofilms ^{31,45,46}, este trabajo tiene en consideración las condiciones que consideramos más importantes para el desarrollo del ciclo de vida

bacteriano. Estas condiciones son su forma, la tasa de crecimiento, su longitud y la tasa de difusión pasiva, así como otros parámetros fundamentales que hay que tener en cuenta para la simulación del crecimiento temprano de biofilms.

Debido que la simulación de vida, aun siendo esta la más sencilla de todas, es extremadamente compleja, hemos introducido una serie de restricciones:

1. La simulación progresa durante las fases iniciales del crecimiento de la bacteria, las fases 2 y 3.
2. La simulación representa un biofilm completamente sumergido en una fase líquida para poder permitir de esta forma que se dé el movimiento browniano.
3. Las microcolonias son clonales, no se tiene en cuenta el intercambio de partículas entre el biofilm y la fase líquida.
4. No se considera la motilidad activa ya sea en la fase líquida o en la superficie.
5. La tasa de crecimiento es constante puesto que la fase líquida contendrá siempre los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, las posibles diferencias tienen un origen estrictamente estocástico.
6. Cada modelo de las simulaciones tiene una viscosidad determinada que no se verá alterada dentro de esa simulación, tampoco se verán alteradas la temperatura o las fuerzas que unen a las bacterias a la superficie.
7. Ningún factor genético ejerce algún cambio en la organización de la colonia, todo está determinado por factores físicos.

Seguidamente se detallarán los aspectos generales de los modelos de simulación que más adelante serán definidos.

Como se ha comentado antes se ha definido el parámetro combinado (Γ) para integrar el efecto de crecimiento y difusión:

$$\Gamma = \frac{t_{dif}}{t_{gr}} \quad (2)$$

Donde

$$t_{dif} = 0.25\sigma^2 / (D^{\parallel} + D^{\perp}) \quad (3)$$

es la media de tiempo que requiere una partícula de tamaño constante L_0 para que se desplace una distancia de σ mediante la difusión browniana (tanto D^{\parallel} y D^{\perp} se definen más adelante) y

$$t_{gr} = (L_0 + \sigma)/v_{gr} \quad (4)$$

$$t_{gr} = \ln\left(\frac{L_f}{L_0}\right) = \frac{1}{r} \cdot \ln\left(\frac{2L_0 + \sigma}{L_0}\right) \quad (5)$$

Es el tiempo necesario para que la partícula alcance su tamaño máximo de L_f desde su tamaño inicial de L_0 con la velocidad de crecimiento máxima. La primera ecuación supone un crecimiento lineal de la bacteria, mientras que la segunda presenta un crecimiento de tipo exponencial donde r es la tasa de crecimiento exponencial. Por experimentos previos del grupo de investigación de Alejandro Cuetos, sabemos que este parámetro influye tanto en la forma como en la estructura interna de las agrupaciones bacterianas⁴⁴. En dichas investigaciones se comprobó cómo en un cultivo cerrado de colonias pequeñas, altamente organizadas, compactas y excéntricas, aparece cuando el crecimiento es mayor que la difusión, a unos valores altos de Γ . Mientras que por si la Γ tiene un valor bajo, siendo la difusión la que es mayor que el crecimiento, el crecimiento de la colonia es abierto, con unas colonias grandes y sueltas sin apenas organización interna.

En este Trabajo de fin de master se ha utilizado una Γ presente en el rango que se había estudiado ⁴⁴. Para obtener dicha Γ en las simulaciones se ha ido ajustando el valor de velocidad medio o tasa de crecimiento promedio lineal o exponencial, según el caso, mientras que el valor de viscosidad se mantenía constante, salvo en las simulaciones variantes del modelo sizer de crecimiento lineal. Se han ido tomando valores de Γ que van desde 0'01, donde las bacterias crecen a un ritmo más lento y se difunden más, hasta una Γ de valor 15, que tiene una velocidad de crecimiento mucho más alta, creando así colonias bacterianas mucho más compactas y siendo estas últimas más parecidas a los biofilms naturales, tal y como se comprobó en ⁴⁷ realizando estudios experimentales de cultivos bacterianos y fotografiando su crecimiento al microscopio.

Debido a que la motilidad está limitada por la falta de flagelo en el biofilm, la difusión se determina por la fuerza de la unión y la capacidad de las células para

difundirse en la fase líquida por el movimiento browniano. En consecuencia, el limitado movimiento de las partículas a lo largo del tiempo debido a la escasez de movilidad activa, ha sido simulado por medio de técnicas de Dinámica Browniana ⁴⁷ y no se han considerado las interacciones hidrodinámicas. Las ecuaciones de movimiento de la posición y orientación de una partícula *i* (definida por el vector posición $\mathbf{r}_i(t)$ y un vector unitario para la orientación $\hat{\mathbf{e}}_i(t)$) se definen a continuación.

$$r_i^{\parallel}(t + \Delta t) = r_i^{\parallel}(t) + \frac{D_{i\parallel}}{k_B T} \mathbf{F}_i^{\parallel} \Delta t + (2D_{i\parallel} \Delta t)^{\frac{1}{2}} R^{\parallel} \hat{u}_i(t) \quad (6)$$

$$r_i^{\perp}(t + \Delta t) = r_i^{\perp}(t) + \frac{D_{i\perp}}{k_B T} \mathbf{F}_i^{\perp} \Delta t + (2D_{i\perp} \Delta t)^{\frac{1}{2}} R^{\perp} \hat{v}_i(t) \quad (7)$$

$$\hat{u}_i(t + \Delta t) = \hat{u}_i(t) \frac{D_{i\theta}}{k_B T} \mathbf{T}_i(t) \cdot \hat{u}_i(t) \Delta t + (2D_{i\theta} \Delta t)^{1/2} R^{\theta} \hat{v}_i(t) \quad (8)$$

Donde, D_{\parallel} , D_{\perp} y D_{θ} son los coeficientes paralelos (en dirección al eje de la bacteria), de difusión rotacional y perpendiculares, propuesto por Bonet Avalos et al ⁴⁸. Estos coeficientes son proporcionales a D_0 , siendo $D_0 = D_0^{**} \cdot \sigma^2 / \tau$, siendo τ la unidad de tiempo propuesto por Shimizu ⁴⁹ y son dependientes del tamaño de las partículas, que son calculados para cada instante de tiempo, y del coeficiente de difusión D_0 . Por otra parte, R^{\parallel} , R^{\perp} y R^{θ} son números gaussianos aleatorios con valor medio nulo y varianza uno. \hat{u}_i es un vector unitario perpendicular a $\hat{\mathbf{e}}_i$. \mathbf{F}_i^{\parallel} y \mathbf{F}_i^{\perp} son el componente paralelo y perpendicular de la fuerza total sobre la partícula *i*. \mathbf{T}_i es el torque total que actúa sobre la partícula *i*.

2.3 Cinética del crecimiento:

El tema principal de este trabajo es el estudio del crecimiento del biofilm mediante simulaciones de distintos tipos de crecimiento y división bacteriana. Se han contemplado 6 grupos de simulaciones que presentan variaciones tanto en el tipo de crecimiento (lineal o exponencial) así como los dos tipos de división bacteriana previamente discutida, Adder y Sizer. Dentro de estos grupos se ha realizado también simulaciones a las distintas gammas preseleccionadas (dentro de los parámetros de estudios anteriores 0,01-15)

- El primer grupo de simulación es A1 y se caracteriza por un crecimiento lineal en el que la partícula crece como siendo v_{gr} , tomada de una distribución gaussiana con una dispersión relativa de 0,1, la velocidad de crecimiento/alargamiento que es dada a la simulación. Este grupo de simulaciones es representativo de un crecimiento Sizer el cual cuando $L_f = 2 \cdot L_0 + \sigma$ la bacteria se dividirá, de forma transversal, en 2 bacterias hijas con la misma orientación de la bacteria original (\hat{e}_i). Los centros de las nuevas bacterias estarán ubicados en $r_{1,2} = r_0 \pm (L_0 + \sigma) \hat{e}_i$. La elongación de las bacterias cambiará con la siguiente ecuación:

$$L(t + \Delta t) = L(t) + v_{gr} \cdot \Delta t \quad (8)$$

- El grupo A1 se modificó estudiando una versión variante (A1v) que sigue las mismas reglas, solo que el valor de D_0 no es 0,1 sino que varía de forma aleatoria en los distintos escenarios. También, la velocidad de crecimiento bacteriano se modifica de forma acorde para mantener el mismo valor de γ y comprobar así como el factor que verdaderamente modifica el crecimiento del biofilm es la γ del medio.
- Seguidamente el grupo A2 fue dividido en dos, el primero al que podemos denominar básico no presenta una dispersión (A2s) en la L_f , siendo igual que antes, pero tiene un crecimiento exponencial, cuando $L_f = 2 \cdot L_0 + \sigma$ entonces la bacteria se dividirá en 2 nuevas bacterias que cambiarán su centro como en el modelo de A1. Donde r_{crec}^i , tomada de una distribución gaussiana con una dispersión relativa de 0,1 es la tasa de crecimiento

$$L(t) = L(t_0) \cdot (r_{crec}^i)^{\Delta t} \quad (9)$$

- La siguiente es A2 con dispersión (A2c) en la L_f , la cual sería calculada como $L_f = 2 \cdot L_0 + \sigma$, tomada de una distribución gaussiana con una dispersión relativa de 0,1. Cada vez que la bacteria se divide el modelo

le da a cada nueva bacteria un valor de longitud máxima que una vez que se supera la bacteria se acaba dividiendo.

- Por otro lado, tenemos a los modelos Adder (B1), que como se ha mencionado en la introducción, para que la división celular se inicie estos tienen que crecer hasta alcanzar un cierto incremento que es seleccionado al dividirse la bacteria. Este caso se caracteriza por el crecimiento lineal, como previamente discutido. El cálculo de cada incremento se hace por la siguiente ecuación, siendo ε una dispersión gaussiana con una dispersión relativa de 0,1.

$$\Delta L^i = L_0 + \sigma \pm \varepsilon \quad (10)$$

- Por último, la simulación B2 se caracteriza por un crecimiento Adder, así como por un crecimiento bacteriano exponencial siendo por ende similar al escenario A2c explicado anteriormente.

Para el posterior análisis de los resultados numéricos han sido realizadas 80 repeticiones de cada uno de los escenarios propuestos, comenzando todos con una semilla distinta, que ha sido creada por generador de números aleatorios entre 0 y 999.999.999. Seguidamente se han promediado las 80 repeticiones con el objetivo de este trabajo es explorar que influencia tienen los diferentes escenarios previamente descritos para caracterizar estas propiedades de la estructura de las microcolonias han sido descritas una serie de características observables.

Por ejemplo, la estimación de la cantidad de biomasa en el biofilm, $bms(t)$, se calcula como:

$$bms(t) = \sum_{i=1}^{N(t)} L_i^*(t) \quad (11)$$

siendo $N(t)$ el número de células en un tiempo t . Debido a que $N(t)$ y la relación de tamaño de cada partícula, $L_i^*(t)$ varían con el tiempo, el $bms(t)$ también lo hace.

Para determinar la forma de la microcolonia ha sido calculada el elipsoide que mejor que ajusta a la distribución de las partículas. Para esto, los componentes del tensor de la inercia (13) ha sido calculado.

$$I_{\alpha,\beta} = \frac{1}{N(t)} \left(\delta_{\alpha,\beta} \left(\sum_{k=\alpha,\beta} r_i^k \right) - r_i^\alpha r_i^\beta \right) \quad (12)$$

Aquí α y β indican las coordenadas x e y, $\delta_{\alpha,\beta}$ es la delta de Kronecker y r_i^α es la coordenada correspondiente del vector desde el centro de masa de la microcolonia hasta la posición de la bacteria i. Diagonalizando este tensor es posible calcular los dos semiejes, $a > b$, de la elipse que mejor se ajusta a la distribución de la bacteria en el biofilm ⁵⁰. Con esto es posible definir el parámetro de la excentricidad con el fin de medir cuanto la forma de la microcolonia se desvía de una forma circular:

$$ecc^2(t) = 1 - \frac{b^2}{a^2} \quad (13)$$

Con esta definición, $ecc^2(t)$ tiende a 0 cuando las microcolonias tienen una forma circular, se mide en unidades de $\rho\sigma^2$. Para medir la compactación de la microcolonia se ha calculado la densidad, definida como $\rho(t) = N(t)/A_e$, siendo A_e el área de la elipse que que es creada al hacer la diagonal del tensor de inercia previamente descritos se mide unidades de $1/\sigma^2$. Finalmente, para medir la correlación direccional de las partículas en la microcolonia, se ha calculado el parámetro de orden nemático, $S_2(t)$. Este parámetro se calcula con el procedimiento estándar de hacer la diagonal al tensor sistemático con la orientación vectorial de todas las partículas ⁴⁷. Para explorar la correlación entre la forma y la estructura se ha definido el parámetro de $corr1(t)$, calculado:

$$corr1(t) = (\hat{v} \cdot \hat{n})^2 \quad (14)$$

Donde \hat{n} es el vector nemático director que resulta del cálculo del parámetro de orden nemático y \hat{v} es el vector unitario en la dirección del mayor de los semiejes de

la elipse descrita anteriormente. $corr1(t)$ informa de la correlación entre las orientaciones preferidas de las bacterias respecto a al semieje mayor de la elipse que se ajusta al biofilm. También, se definió el parámetro que mide la correlación entre la orientación original de la bacteria $\hat{u}_1(0)$ y \hat{v} como:

$$corr2(t) = (\hat{v} \cdot \hat{u}_1(0))^2 \quad (15)$$

Este parámetro es útil para monitorear como la microcolonia según va evolucionando retiene el recuerdo de su condición inicial.

Estos parámetros definidos son todos dependientes del tiempo y cambian según el transcurso del desarrollo de la microcolonia. Adicionalmente hemos calculado otros observables que nos dan detalles del interior de la microcolonia a cada instante de tiempo, en contraste con la información global que nos indican estos parámetros ya definidos. Por ejemplo, a unos valores dados de biomasa, se ha determinado la distribución de las elongaciones de las bacterias en el biofilm para un valor de la biomasa dado, $P_{bms}(L/\sigma)$. La comparación de la distribución de la distribución entre las funciones de los distintos escenarios será útil para comprobar como el mecanismo homeostático contribuye a conservar la distribución de tamaños. Como fue estudiado en ⁴⁴ y en ⁵¹, la información relevante sobre la estructura interna de la microcolonia podía ser obtenida por el perfil de cobertura. $g(r_{cm})$ está definida como la fracción de superficie cubierta por las bacterias a una distancia r_{cm} desde el centro de masa. Para poder calcular esta función se ha generado un gran número de puntos aleatorios a una distancia $r+dr$ del centro de masa, la evaluación de $g(r_{cm})$ es la fracción de estos puntos que caen dentro del área ocupada por la bacteria. Finalmente, fue calculada la distribución de la orientación entre 2 partículas $g_2(r) = \langle P_2(\hat{u}_i \cdot \hat{u}_j) \rangle$, definida como el promedio para cada distancia entre partículas del segundo polinomio de Legendre del producto escalar de los vectores que definen la orientación de las células i y j .

Esta función informa sobre la dependencia de la distancia respecto a la orientación relativa media entre las partículas, que es útil para evaluar los tamaños de los posibles dominios nemáticos.

3. Resultados:

Aquí se aplican los distintos escenarios descritos en la sección previa, se ha intentado modelar una bacteria de características similares a *P. putida*. De acuerdo con la elongación de las partículas $L_0=1,6\sigma$ y $L_0^*=2,6$ fueron escogidas como valores de referencia. Como en [19] todas las simulaciones se han iniciado con una única bacteria con una longitud de tamaño de L_0 . En la figura 4 se muestra a modo ilustrativo la evolución de las colonias a distintos valores de Γ a través de distintas configuraciones. Para estos ejemplos, se ha escogido el escenario A1, produciendo los otros escenarios configuraciones con aspecto similar.

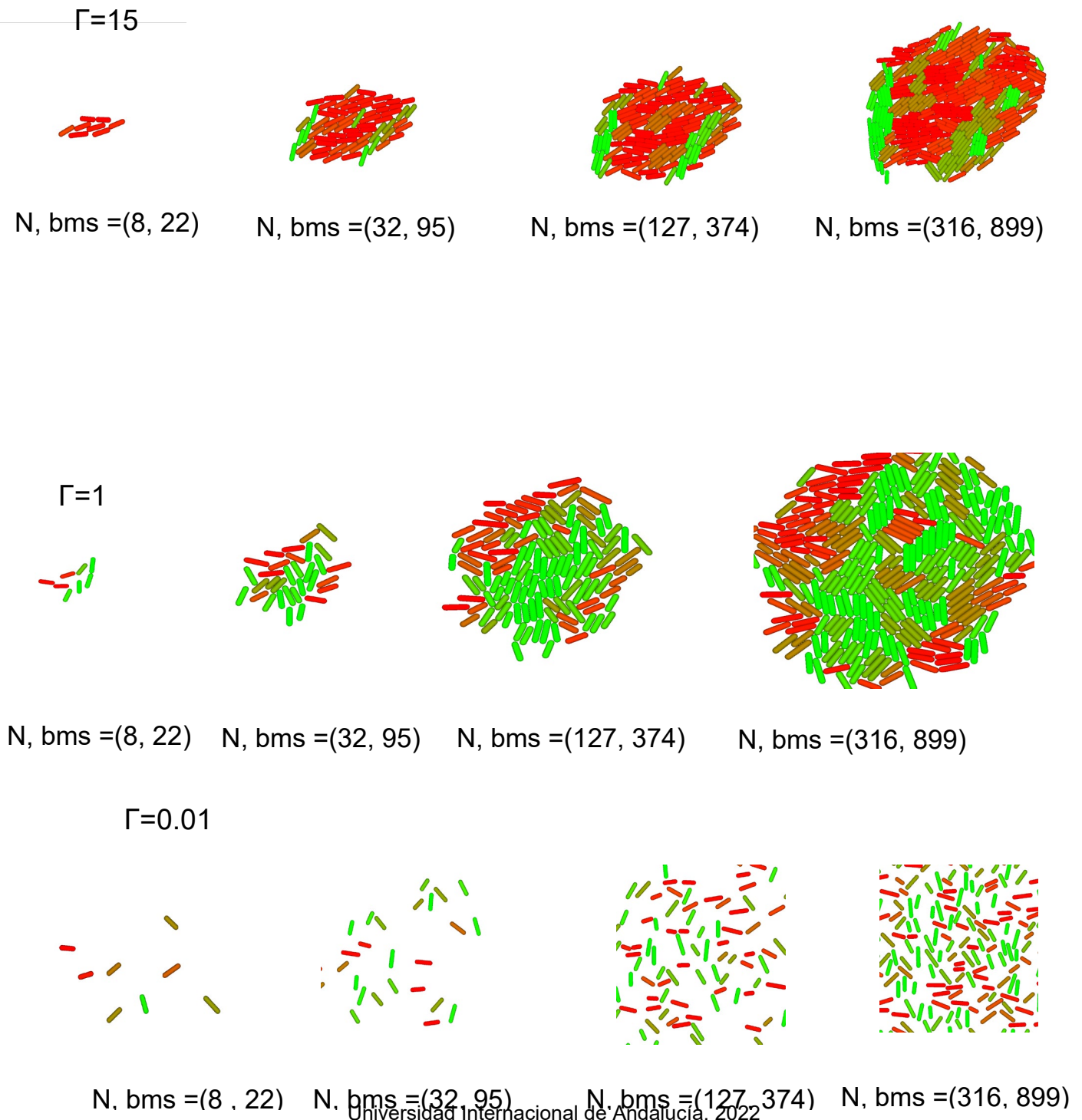


Figura 4. Aquí se presentan una representación de la evolución de las colonias con distintas Γ , todas en el escenario A1, como se ha explicado anteriormente, las Γ bajas ($\Gamma = 0,01$ la fila inferior y $\Gamma = 1$ la fila intermedia) presentan una gran difusión, por tanto, las bacterias tienen una mayor separación unas con otras. Por otro lado, las Γ altas ($\Gamma = 15$ la fila superior) crean colonias más compactas. El número de partículas y la biomasa de cada imagen se indican en la figura.

Escenario	D_0	$V_{gr} \Gamma_m$	Γ
A1	0,1	0,0007	0,01
	0,1	0,007	0,1
	0,1	0,07	1
	0,1	0,35	5
	0,1	1,05	15
A1V	0,0285	0,00021	0,01
	1	0,07	0,1
	1	0,7	1
	0,166	0,6	5
	0,2	2,1	15
A2 sin distribución	0,1	0,000265	0,01
	0,1	0,00265	0,1
	0,1	0,0265	1

	0,1	0,13	5
	0,1	0,39	15
A2 con distribución	0,1	0,000265	0,01
	0,1	0,00265	0,1
	0,1	0,0265	1
	0,1	0,13	5
	0,1	0,39	15
B1	0,1	0,0007	0,01
	0,1	0,007	0,1
	0,1	0,07	1
	0,1	0,35	5
	0,1	1,05	15
B2	0,1	0,000265	0,01
	0,1	0,00265	0,1
	0,1	0,0265	1
	0,1	0,13	5
	0,1	0,39	15

Tabla 1. Aquí se exponen los valores de D_0 (σ^2/τ), Γ y v_{gr} (σ/τ) r_m ($1/\tau$) de los distintos escenarios usados en este trabajo. Cada uno de estos escenarios cuenta con unas 80 repeticiones.

En ⁴⁴ se discute como la morfología y la estructura de la colonia tiene una relación de dependencia con la difusión de la bacteria y su elongación en el tiempo. Esta relación se resume definiendo el parámetro Γ , ya definido anteriormente (3). Según qué escenario, A1, A1V y B1 presentan la t_{gr} de (4) mientras que los escenarios A2s, A2c y B2 presentan la t_{gr} definida en (5). La Γ es por lo tanto dependiente del parámetro de D_0 como de v_{gr} o r_m , para los crecimiento lineales y exponenciales respectivamente. En la tabla 1 son presentados todos los valores de D_0 , v_{gr} y r_m según el escenario junto a su Γ resultante.

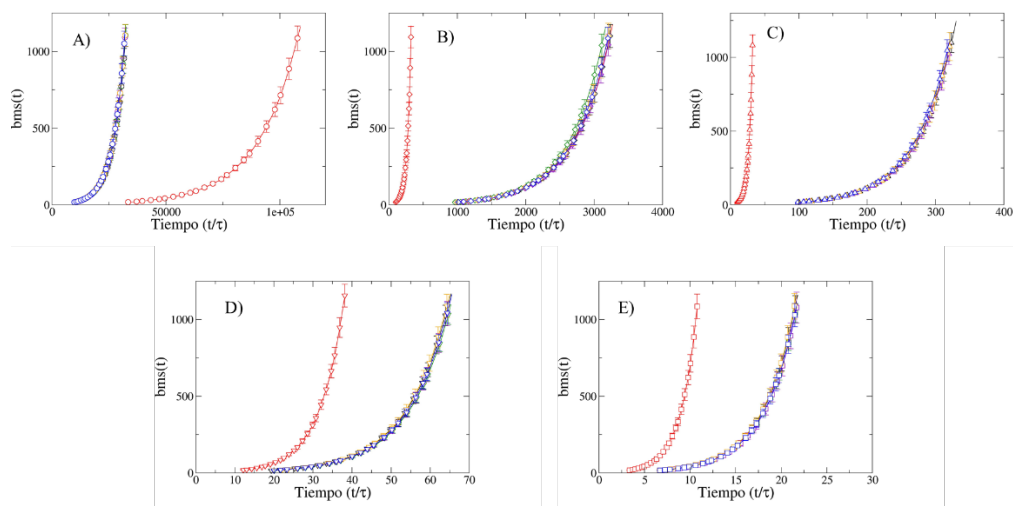


Figura 5. Aquí se muestra la biomasa (eje Y) frente al tiempo (eje X), A) representa todos los escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2= azul) con una Γ de 0,01. B) representa la Γ 0,1, C) representa $\Gamma=1$, D) representa $\Gamma=5$ y E) representa $\Gamma=15$. Estas gráficas están ampliadas en el Anexo1.

La figura 5 muestra la dependencia de la biomasa con el tiempo en la evolución de la microcolonia para todos los casos de la tabla 1. Como un primer resultado es interesante verificar que, sin importar el tipo de crecimiento bacteriano, lineal o exponencial, el crecimiento de la biomasa sigue el patrón de la ley exponencial. También es relevante que los casos donde D_0 y Γ , y por tanto t_{gr} , coinciden sin importar cual sea el escenario de crecimiento y división bacteriana la evolución de la biomasa en el tiempo se une en una única curva. Casos con la misma Γ pero distintos valores de D_0 , curva roja, tiene una evolución distinta de $bms(t)$. Esto es una señal adicional de que tras unas pocas generaciones la biomasa crece a un ritmo exponencial con un crecimiento constante de $k=\ln(2)/t_{gr}$.

En estas gráficas que relacionan la biomasa de las distintas simulaciones, con los distintos valores de Γ , con el tiempo de la simulación. Van desde el 0,01 hasta el 15 se aprecia como a una mayor Γ , y por lo tanto a una mayor v_{gr} o r_m (en el caso de las simulaciones de crecimiento exponencial), el tiempo relativo del aumento de la biomasa es menor para llegar hasta el límite de la simulación que se alcanza cuando se llega a un número de partículas de 350.

En ⁴⁴ mostraba como la estructura y las propiedades morfológicas de las microcolonias simuladas solo dependen de Γ sin importar de los valores de D_0 , pero no de demostró de forma sistemática. Aquí, sin embargo, confirmamos esa teoría puesto que en las figuras (6-13) se muestra como a un valor de la biomasa en la

microcolonia dado, las propiedades estructurales y morfológicas calculadas son independientes del valor de D_0 , una vez que el valor de Γ se aplica.

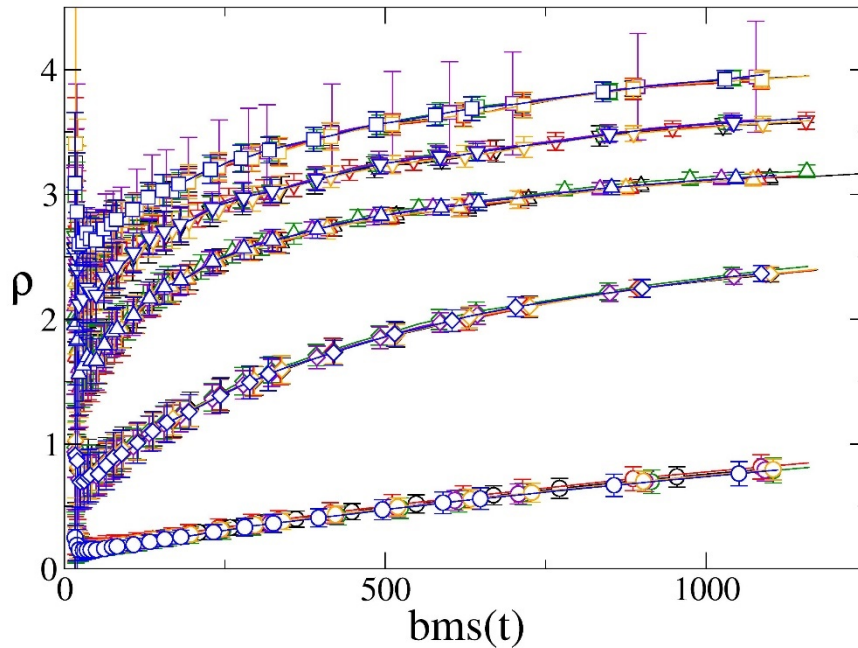


Figura 6. Se representa la densidad, en unidades de $1/\sigma^2$, frente a la biomasa, los colores que representan los diferentes escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2=azul). Por otro lado, los símbolos significan, cuadrado $\Gamma=15$, triángulo hacia abajo $\Gamma=5$, triángulo hacia arriba $\Gamma=1$, diamante $\Gamma=0,1$ y círculo $\Gamma=0,01$.

En esta gráfica se compara la densidad de cada colonia frente a su biomasa, la densidad se calcula con el número de partículas entre la superficie es posible ver como los distintos escenarios colapsan en la misma curva según los valores de Γ . Esto es debido a que a una Γ inferior hay un menor crecimiento bacteriano y una mayor dispersión en los valores de $\Gamma=0,01$ las bacterias ocupan un mayor espacio, pero con una concentración de microcolonias muy baja presentando así una menor densidad. Mientras que Γ va aumentando se puede ver cómo, al disminuir la dispersión, el valor de la densidad va aumentando.

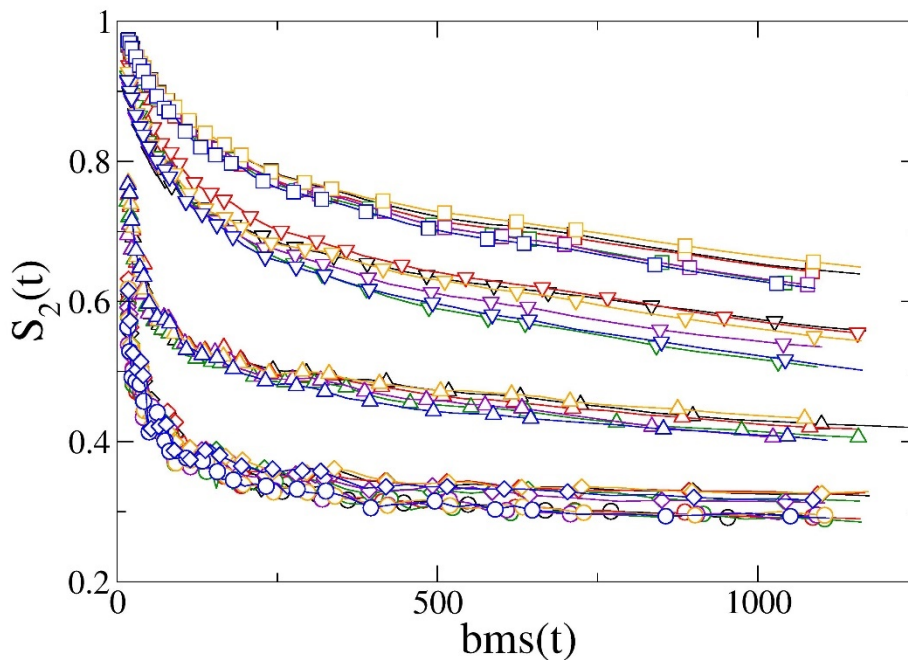


Figura 7. Se representa al parámetro de orden nemático frente a la biomasa, los colores que representan los diferentes escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2=azul). Por otro lado, los símbolos significan, cuadrado $\Gamma=15$, triángulo hacia abajo $\Gamma=5$, triángulo hacia arriba $\Gamma=1$, diamante $\Gamma=0,1$ y círculo $\Gamma=0,01$.

Seguidamente la gráfica en la que se muestra la dependencia del orden nemático con la biomasa. Es apreciable como a valores bajos de Γ tenemos un comportamiento no monótono, siendo difícil de separar de una forma consistente los valores de $\Gamma=0,01$ y $0,1$. Por otro lado, a mayores valores de Γ , $S_2(t)$ crece, indicando una mayor correlación orientacional de entre las partículas que va disminuyendo según crecen las colonias debido a que se percibe una reducción del orden nemático. Aquí vuelve a pasar como anteriormente, y se observa como los distintos escenarios con un valor igual de Γ tienen los mismos valores, siendo estas curvas más dependientes de Γ que de los mecanismos propios de cada escenario.

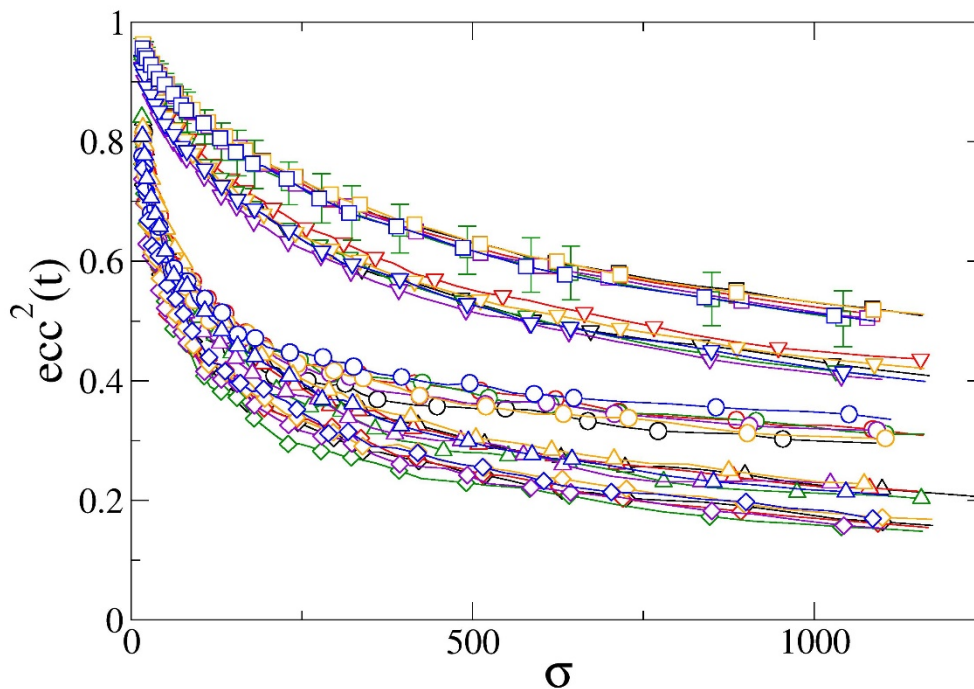


Figura 8. Se representa la $ecc^2(t)$, en unidades de $\rho\sigma^2$, frente a la biomasa, los colores que representan los diferentes escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2=azul). Por otro lado, los símbolos significan, cuadrado $\Gamma=15$, triangulo hacia abajo $\Gamma=5$, triangulo hacia arriba $\Gamma=1$, diamante $\Gamma=0,1$ y circulo $\Gamma=0,01$.

La excentricidad de la elipse indica con un valor entre 0 y 1 cuan cerca está la elipse de la colonia en ser un círculo perfecto, si el valor es 0, o con una forma más elíptica si es de valor 1. Empiezan todas las simulaciones con un valor alto debido a la forma de la primera partícula presente, el esferocilindro, En valores de Γ alto al tener una forma más bacterias en una misma dirección, como se ha visto en la figura 8, al reproducirse aumentarán los polos dificultando la formación de una esfera. Esta gráfica tampoco es monótona puesto que no es el valor menor de Γ quien se acerca más a la forma circular sino el segundo menor valor ($\Gamma=0,1$), relegando al menor valor de Γ a una forma más elíptica posiblemente debido a la gran difusión de sus partículas. Aún así, se observa como los distintos mecanismos de crecimiento no crean diferencias en los valores de las curvas siendo estas más dependientes de Γ , ya que a valores iguales de Γ se observan valores iguales o aproximados de la $ecc^2(t)$

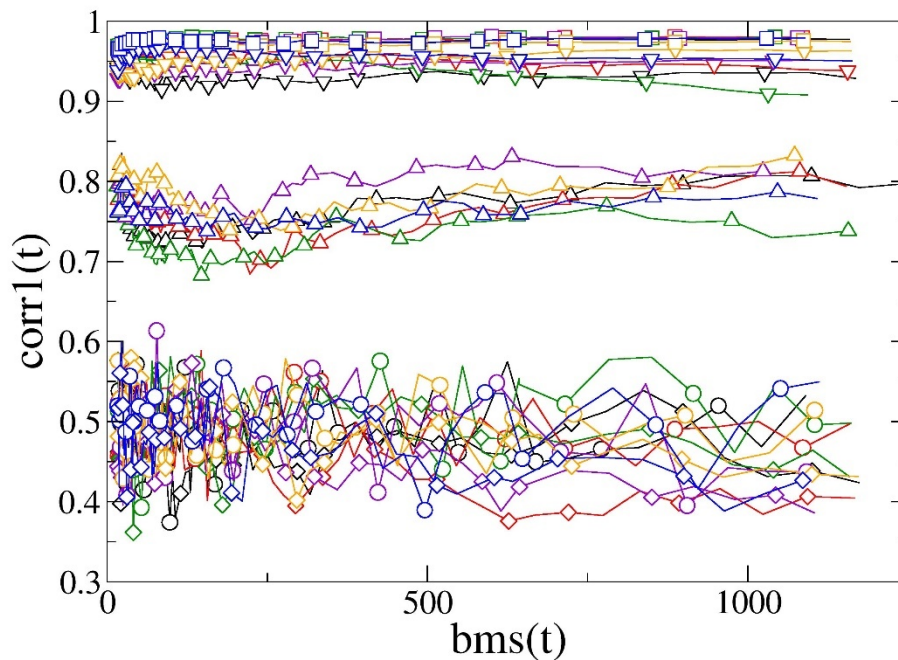


Figura 9. Se representa la $corr1(t)$ frente a la biomasa, los colores que representan los diferentes escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2= azul). Por otro lado, los símbolos significan, cuadrado $\Gamma=15$, triangulo hacia abajo $\Gamma=5$, triangulo hacia arriba $\Gamma=1$, diamante $\Gamma=0,1$ y circulo $\Gamma=0,01$.

En la figura 9 encontramos $corr1(t)$ frente a la biomasa. Debido a que es un valor dependiente del orden nemático, se puede apreciar como también se crea una ruptura de la monotonía en los valores bajos de Γ . Esto también se debe a la gran difusión de las bacterias puesto que al haber tanta dispersión es más aleatorio la disposición de estas respecto al semieje mayor de la elipse formada. Por otro lado, cuando Γ es más alta y la dispersión es menor y el orden nemático mayor hay una mayor ordenación de las bacterias, como se aprecia en figura 4 y por tanto una mayor disposición a que sigan la orientación del semieje mayor de la elipse. Se vuelve a observar cómo los mismos valores de Γ tienen los mismos valores de $corr1(t)$, independientemente del escenario.

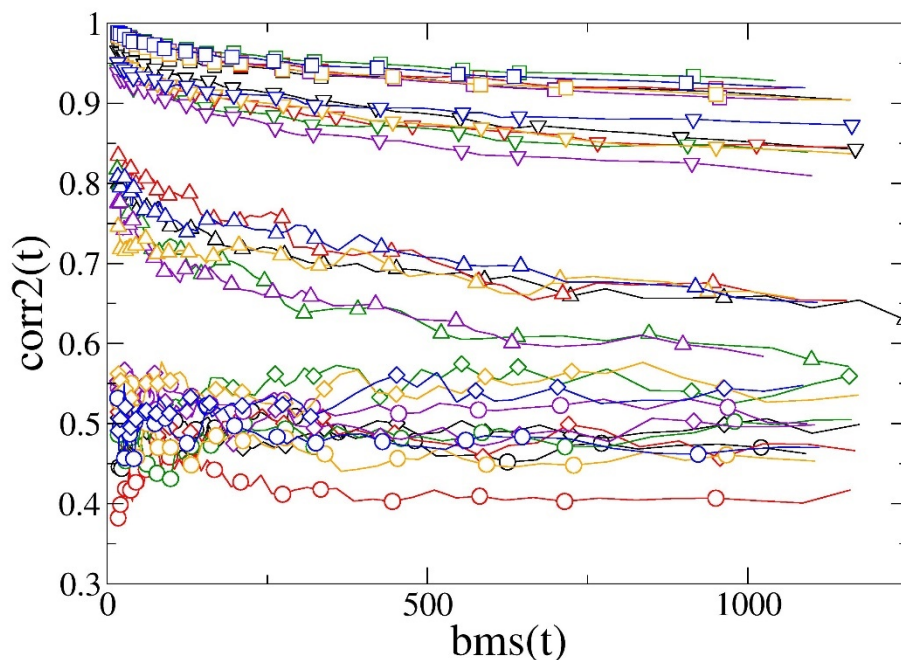


Figura 10. Se representa la $corr2$, el parámetro que usamos para comparar la colonia en el momento t frente a su condición inicial, frente a la biomasa, los colores que representan los diferentes escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2= azul). Por otro lado, los símbolos significan, cuadrado $\Gamma=15$, triángulo hacia abajo $\Gamma=5$, triángulo hacia arriba $\Gamma=1$, diamante $\Gamma=0,1$ y círculo $\Gamma=0,01$.

La $corr2(t)$ muestra como la microcolonia mantiene o no una orientación parecida a aquella que tenía la primera bacteria de cada simulación. Vuelve a pasar que a valores bajos de Γ , la difusión de partículas es tan alto que sus valores se vuelven más aleatorios debido a la gran difusión de sus bacterias, complicando así poder ser englobados efectivamente por la elipse. Según se va aumentando la Γ las colonias tienden a mantenerse más compactas siguiendo también la misma orientación, o una orientación parecida, pero con pocas variaciones, más según va creciendo la colonia. Por tanto, los valores más altos de Γ muestran un valor cercano al 1 que sería mantener exactamente la misma orientación que esa primera bacteria de cada simulación. De nuevo, se ve como para un valor de Γ dado los valores obtenidos son independientes del escenario.

Los siguientes resultados ya no dan datos de la evolución global de las simulaciones, sino que buscan estudiar las propiedades de la colonia en momentos fijos del desarrollo de esta. Para garantizar que los momentos presentan una madurez igual en todos los escenarios se han elegido los momentos que presentaban una biomasa, igual o aproximada, a 30 y a 676.

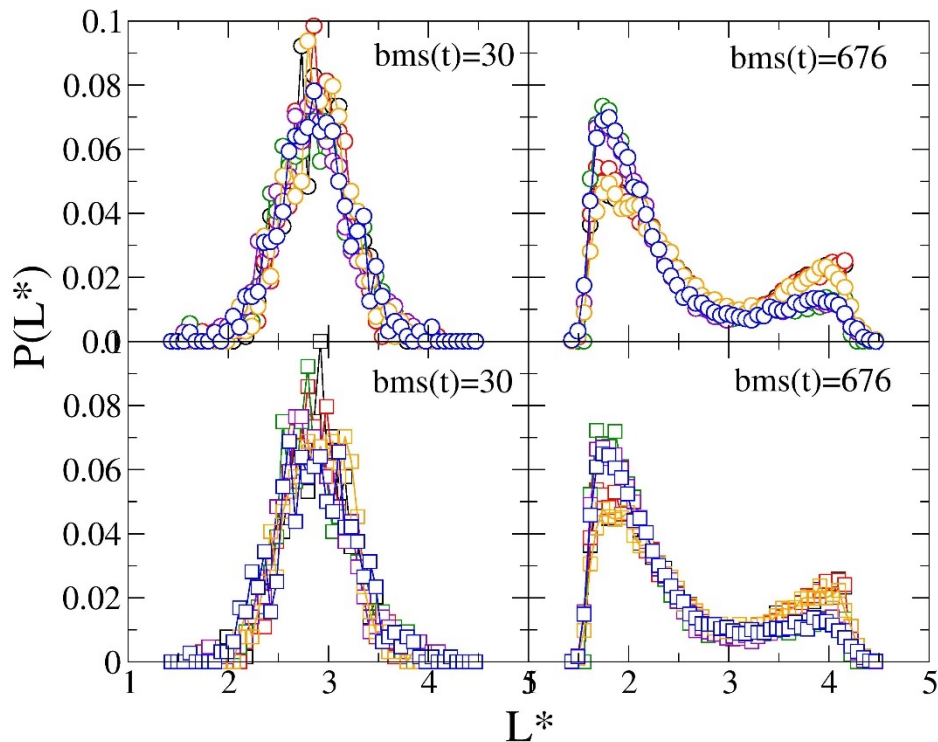


Figura 11. Se representa la probabilidad del tamaño que puede tener cada partícula frente al tamaño de estas. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 30, columna de la izquierda o 676, columna de la derecha, los colores que representan los diferentes escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2= azul). Por otro lado, los símbolos significan, círculo $\Gamma=0,01$ (fila superior) y cuadrado $\Gamma=15$ (fila inferior).

En la Figura 11 se observa las distintas distribuciones de los tamaños de las bacterias según la biomasa y la Γ . Los tamaños de las partículas a una biomasa de 30 un siguen una distribución de campana de gauss pudiendo deberse a la variación de los tamaños celulares introducidas por la propia simulación y que esta ha tenido poco tiempo para evolucionar. Por contraste, cuando las simulaciones están en sus últimas etapas ($bms(t)=676$) podemos apreciar que la mayoría de los tamaños se concentran en los extremos indicando que las bacterias están recién divididas o a punto de hacerlo. En estos tamaños la disoncrinización de las bacterias en la colonia es más evidente. Por último, se aprecia como la distribución de tamaños es independiente del escenario escogido, a un valor de Γ dado.

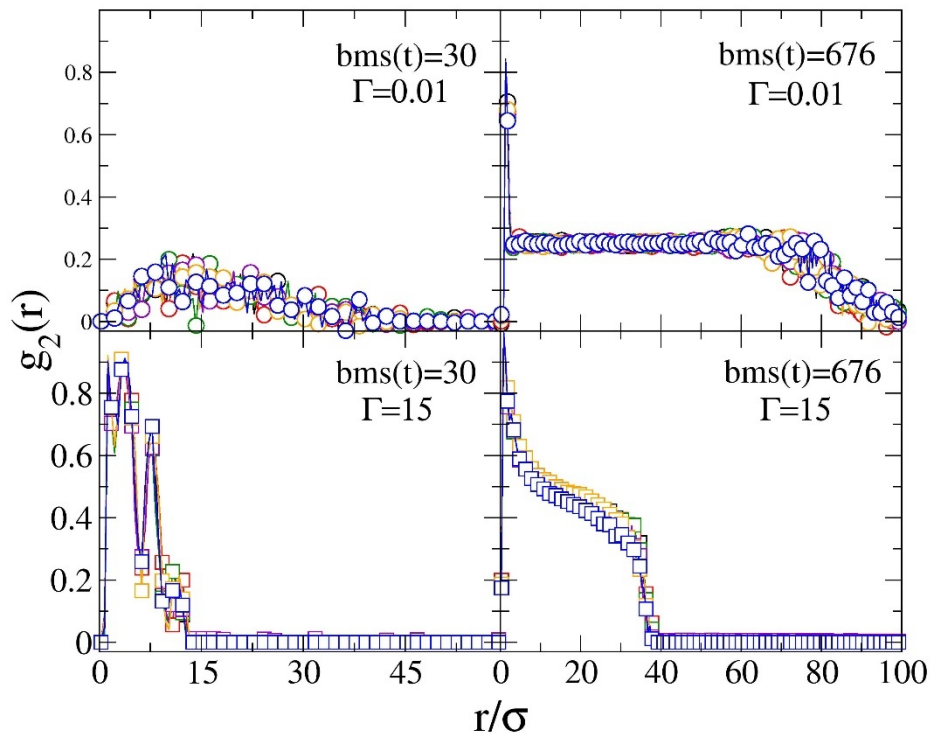


Figura 12. Se representa $g_2(r)$, la correlación orientacional de la colonia y como va cambiando según aumenta la distancia. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 30, columna de la izquierda o 676, columna de la derecha, los colores que representan los diferentes escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2= azul). Por otro lado, los símbolos significan, círculo $\Gamma=0,01$ (fila superior) y cuadrado $\Gamma=15$ (fila inferior).

Esta gráfica presenta la orientación de dominios nemáticos y la distancia de estos hasta el centro de masas de la elipse. A $\Gamma=0,01$ no hay correlaciones orientacionales, esto se comprueba en el bajo valor de $g_2(r)$ a todas las distancias, por el contrario, a $bms(t)= 676$ aparece una correlación a distancias muy cortas debido a que, por el aumento de número de bacterias, estas, empiezan a tener vecinos cercanos. La situación a $\Gamma=15$ es distinta, incluso a valores bajos de $bms(t)$ se observa una correlación orientacional de las partículas hasta una distancia de $r= 10\sigma$ a valores altos de $bms(t)$ esta correlación alcanza prácticamente todo el biofilm.

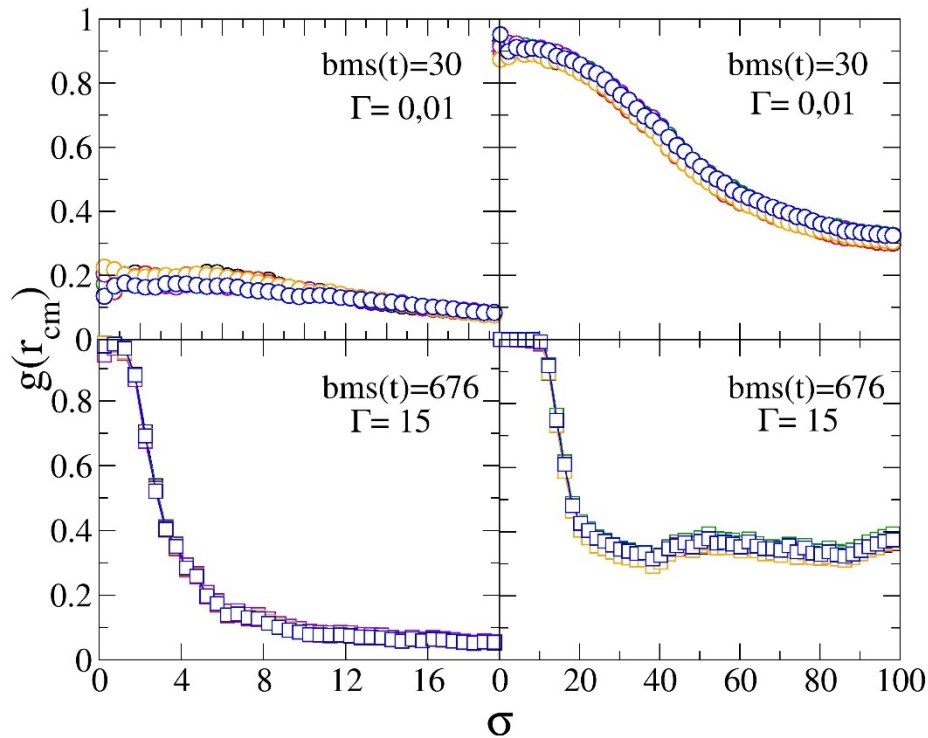


Figura 13. Se representa la superficie de la colonia que está cubierta por las bacterias según a que distancia estén estas del centro de la colonia. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 30 columna de la izquierda o 676, columna de la derecha, los colores que representan los diferentes escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2= azul). Por otro lado, los símbolos significan, cuadrado $\Gamma=15$ y círculo $\Gamma=0,01$

Por último, $g(r_{cm})$ o cubrimiento, explica cuanta de la superficie de la colonia está cubierta por bacterias. A valores bajos de $bms(t)$ y $\Gamma=0,01$ vemos como el encubrimiento es muy bajo, esto es debido a la alta difusión de las bacterias, por lo que están muy separadas unas de otras, dispersas por toda la superficie. La situación cambia en momentos más tardíos de la vida del biofilm, así a $bms(t)=676$ el centro de la colonia está apreciablemente cubierto por bacterias, debido a la reproducción de estas. En ⁴⁴, se denominó a estos microorganismos crecimiento abierto. A valores altos de Γ la situación es completamente distinta, en la Figura 13 como el centro de la colonia el cubrimiento es completo ($g(r_{cm})=1$) esta zona completamente cubierta se hace más grande al aumentar la $bms(t)$, desde aquí se produce una caída brusca coincidiendo con el borde de la colonia, en ⁴⁴, esto se denominó crecimiento cerrado. En la Figura 4 se puede apreciar visualmente esta fenomenología. Como el resto de magnitudes discutidas en este trabajo se presenta el mismo comportamiento, de todos los escenarios, cuando Γ es la misma.

Efectivamente se puede comprobar como en las simulaciones de A1 y B1 ecc^2 (Figura 8), ρ (Figura 6), S_2 (Figura 7), con un valor dado de biomasa son

independientes del valor de D_0 a una Γ concreta. Esta estructura solo depende de Γ y no de los valores particulares de D_0 y t_{gr} , también se confirma que en los distintos escenarios colapsan en única curva en los observable $g_2(r)$ y $g(r_m)$ en las figuras 12 y 13 para cada situación.

Por tanto, la observación de las figuras de 5 a 13 nos permiten comprobar como la idea propuesta en ⁴⁴, que las características morfológicas y estructurales solo dependen de Γ y no de los mecanismos de crecimiento o reproductivos. Seguidamente discutiremos el comportamiento de los observables en única curva para unos valores dados de $bms(t)$ y Γ .

4. Conclusión

Tras la observación y el estudio de las figuras (5-10), donde podemos observar las características de los diferentes escenarios a lo largo del tiempo de vida de las simulaciones y en las figuras (11-13) donde podemos ver características en los momentos iniciales y finales de cada escenario. Es claramente apreciable como los distintos mecanismos, Adder o Sizer, los distintos tipos de crecimiento, lineal o exponencial, o la ratio de crecimiento v_{gr} no suponen cambios en la estructura ni en la morfología de la colonia siempre que se mantenga un mismo valor de Γ . Sin embargo, en dichos escenarios cada vez que la Γ se modifica la morfología y estructura de las colonias cambia como se puede ver en la figura 4, siendo estos cambios comparables a los que sufren los otros escenarios cuando tienen el mismo valor de Γ .

Como se puede ver en la figura 4, la estructura de la colonia es muy dependiente de los valores de Γ , a valores bajos la colonia se encuentra extremadamente dispersa mientras que a valores altos esta está extremadamente compactada. Esto crea grupos de bacterias en la misma orientación, aunque, una mayoría de ellas en la orientación de la bacteria original, esta mayoría va disminuyendo según la colonia crece como se puede ver en la figura 12. Igualmente, esta estructura es únicamente dependiente de Γ y no a los distintos mecanismos de crecimiento o modelos de crecimiento, lineal o exponencial.

Este trabajo mediante las figuras 4 a las 10 muestra y comprueba las propiedades de la colonia, tanto morfológicas como estructurales, que se encontraron en el trabajo ⁴⁴, probando así la eficacia del parámetro Γ .

Por último, queda claro que independientemente del mecanismo de crecimiento o del tipo de este que siga cada bacteria de forma individual, ya sea por crecimiento lineal o exponencial, como se puede ver en la figura 3, el conjunto de la colonia crece de forma exponencial.

5. Bibliografía

La hago mañana, hay problemas y tengo que rehacer las citas

1. Umen, J. G. The elusive sizer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 435–441 (2005).
2. Taheri-Araghi, S. *et al.* Cell-size control and homeostasis in bacteria. *Curr. Biol.* **25**, 385–391 (2015).
3. Jun, S. & Taheri-Araghi, S. Cell-size maintenance: Universal strategy revealed. *Trends Microbiol.* **23**, 4–6 (2015).
4. Shantanam, S. A G1 sizer coordinates growth and division in the mouse epidermis. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2018).
5. Sauls, J. T., Li, D. & Jun, S. Adder and a coarse-grained approach to cell size homeostasis in bacteria. *Curr. Opin. Cell Biol.* **38**, 38–44 (2016).
6. Facchetti, G., Chang, F. & Howard, M. Controlling cell size through sizer mechanisms. *Curr. Opin. Syst. Biol.* **5**, 86–92 (2017).
7. Si, F. *et al.* Mechanistic Origin of Cell-Size Control and Homeostasis in Bacteria. *Curr. Biol.* **29**, 1760-1770.e7 (2019).
8. Willis, L., Jönsson, H. & Huang, K. C. Limits and Constraints on Mechanisms of Cell-Cycle Regulation Imposed by Cell Size-Homeostasis Measurements. *Cell Rep.* **32**, (2020).
9. Pandey, P. P., Singh, H., Jain, S. & Jain, S. Exponential trajectories, cell size fluctuations, and the adder property in bacteria follow from simple chemical dynamics and division control. *Phys. Rev. E* **101**, 1–26 (2020).
10. Teimouri, H., Mukherjee, R. & Kolomeisky, A. B. Stochastic Mechanisms of Cell-Size Regulation in Bacteria. *J. Phys. Chem. Lett.* **11**, 8777–8782 (2020).
11. Koch, G. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Chimia (Aarau).* **71**, 643 (2017).
12. Klausen, M., Gjermansen, M., Kreft, J. U. & Tolker-Nielsen, T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: Examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **261**, 1–11 (2006).
13. Fazli, M. *et al.* Minireview Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. (2014) doi:10.1111/1462-2920.12448.
14. Tolker-nielsen, T. I. M. Biofilm Development. 1–12 (2015) doi:10.1128/microbiolspec.
15. Karamanoli, K. *et al.* Are Leaf Glandular Trichomes of Oregano Hospitable Habitats for Bacterial Growth? *J. Chem. Ecol.* **38**, 476–485 (2012).
16. Kivisaar, M. Narrative of a versatile and adept species *Pseudomonas putida*. *J. Med. Microbiol.* **69**, 324–338 (2020).
17. Nikel, P. I. & de Lorenzo, V. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metabolic Engineering* vol. 50 142–155 (2018).
18. Palleroni, N. J. & Moore, E. R. B. Taxonomy of *Pseudomonads*: Experimental Approaches. *Pseudomonas I*, 3–44 (2004).
19. Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, D. C., Nikel, P. I. & Wittmann, C. Industrial biotechnology of

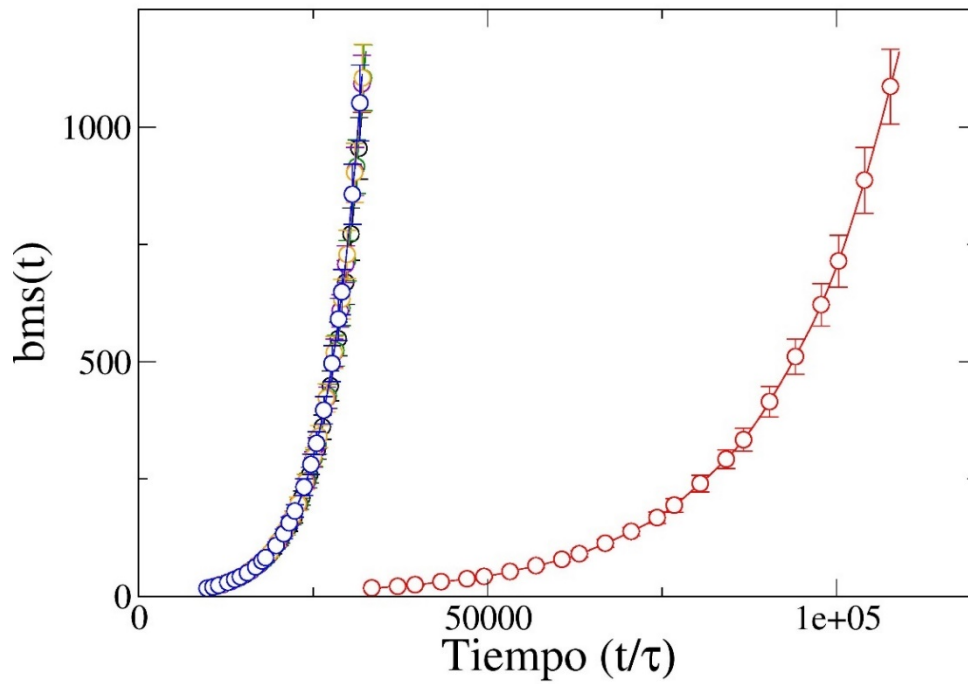
- Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**, 7745–7766 (2020).
20. Nikel, P. I., Chavarría, M., Danchin, A. & de Lorenzo, V. From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a Synthetic Biology chassis for hosting harsh biochemical reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **34**, 20–29 (2016).
 21. Sivasankar, P. & Suresh Kumar, G. Influence of pH on dynamics of microbial enhanced oil recovery processes using biosurfactant producing *Pseudomonas putida*: Mathematical modelling and numerical simulation. *Bioresour. Technol.* **224**, 498–508 (2017).
 22. Mezzina, M. P. *et al.* Engineering Native and Synthetic Pathways in *Pseudomonas putida* for the Production of Tailored Polyhydroxyalkanoates. (2020) doi:10.1002/biot.202000165.
 23. Loeschcke, A. & Thies, S. Engineering of natural product biosynthesis in *Pseudomonas putida*. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 65 213–224 (2020).
 24. Prieto, A. *et al.* A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **18**, 341–357 (2016).
 25. Michael P. Allen, D. J. T. Computer Simulation of Liquids. [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=WFExDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Computer+Simulation+of+Liquids+Allen,+M.+P.+%26+Tildesley,+D.+J.+\(1989\).&ots=VGPN50MB9W&sig=6zEds3_CnsrCyPDWbNmB24Zxe3I#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=WFExDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Computer+Simulation+of+Liquids+Allen,+M.+P.+%26+Tildesley,+D.+J.+(1989).&ots=VGPN50MB9W&sig=6zEds3_CnsrCyPDWbNmB24Zxe3I#v=onepage&q&f=false).
 26. Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H. & Teller, E. Equation of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.* **21**, 1087–1092 (1953).
 27. Alfaro Pérez, J. D. Métodos De Simulación Molecular: Una Revisión De Las Herramientas Más Actuales. *Rev. Ing.* **24**, 117–127 (2014).
 28. Zhou, R. Replica exchange molecular dynamics method for protein folding simulation. *Methods Mol. Biol.* **350**, 205–223 (2007).
 29. Freddolino, P. L., Harrison, C. B., Liu, Y. & Schulten, K. Challenges in protein-folding simulations. *Nat. Phys.* **6**, 751–758 (2010).
 30. S, T. *et al.* Development and evaluation of an integrated virtual screening strategy by combining molecular docking and pharmacophore searching based on multiple protein structures. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 2743–2756 (2013).
 31. Van Liedekerke, P., Palm, M. M., Jagiella, N. & Drasdo, D. *Simulating tissue mechanics with agent-based models: concepts, perspectives and some novel results. Computational Particle Mechanics* vol. 2 (Springer International Publishing, 2015).
 32. Katarzyna A. Rejniak & Anderson, A. R. A. Hybrid Models of Tumor Growth. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
 33. McGuffee, S. R. & Elcock, A. H. Diffusion, Crowding & Protein Stability in a Dynamic Molecular Model of the Bacterial Cytoplasm. *PLOS Comput. Biol.* **6**, e1000694 (2010).
 34. Xia, M., Greenman, C. D. & Chou, T. O. M. Combining sizer, timer, and adder mechanisms in pde models of cell populations. 1–23 (2019).
 35. Wang, Q. & Zhang, T. Review of mathematical models for biofilms. *Solid State Commun.* **150**, 1009–1022 (2010).
 36. Wimpenny, J. W. T. & Colasanti, R. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**, 1–16 (1997).

37. Picerno, V. *et al.* One year in review: The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **33**, 551–558 (2015).
38. Piciooreanu, C., Kreft, J. U. & Van Loosdrecht, M. C. M. Particle-based multidimensional multispecies biofilm model. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3024–3040 (2004).
39. Obeso, J. I., Gómez-botrán, J. L., Olivera, E. R. & Luengo, J. M. The phasin PhaF controls bacterial shape and size in a network-forming strain of *Pseudomonas putida*. *J. Biotechnol.* **199**, 17–20 (2015).
40. EARL, D. J., ILNYTSKYI, J. & WILSON, M. R. Computer simulations of soft repulsive spherocylinders. *Mol. Phys.* **99**, 1719–1726 (2001).
41. Taylor, P., Cuetos, A. & Martínez-haya, B. Molecular Physics : An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics Liquid crystal phase diagram of soft repulsive rods and its mapping on the hard repulsive reference fluid. 37–41 (2015) doi:10.1080/00268976.2014.996191.
42. Vega, C. & Lago, S. A fast algorithm to evaluate the shortest distance between rods. **18**, 55–59 (1994).
43. Lowen, H. Brownian dynamics of hard spherocylinders. **50**, (1994).
44. Acemel, R. D., Govantes, F. & Cuetos, A. Computer simulation study of early bacterial biofilm development. *Sci. Rep.* **8**, 1–9 (2018).
45. Wang, P. *et al.* Robust growth of *Escherichia coli* Ping. **20**, 1099–1103 (2011).
46. Kreft, J., Piciooreanu, C., Wimpenny, J. W. T. & Loosdrecht, M. C. M. Van. Individual-based modelling of biofilms. 2897–2912 (2001).
47. Allen, M. P., Avenue, T., Bs, B. & Evans, G. T. *HARD CONVEX BODY FLUIDS*. vol. LXXXVI.
48. Bonet Avalos, J., Rubí, J. M., Bedeaux, D. & van der Zwan, G. Friction coefficients of axisymmetric particles in suspension. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* **211**, 193–217 (1994).
49. Shimizu, H. Effect of Molecular Shape on Nuclear Magnetic Relaxation. **765**, (1970).
50. Karnesky, R. A., Sudbrack, C. K. & Seidman, D. N. Best-fit ellipsoids of atom-probe tomographic data to study coalescence of γ' (L12) precipitates in Ni–Al–Cr. *Scr. Mater.* **57**, 353–356 (2007).
51. Lobo-Cabrera, F. J., Patti, A., Govantes, F. & Cuetos, A. Polymer-induced microcolony compaction in early biofilms: A computer simulation study. *Phys. Rev. E* **103**, 1–10 (2021).

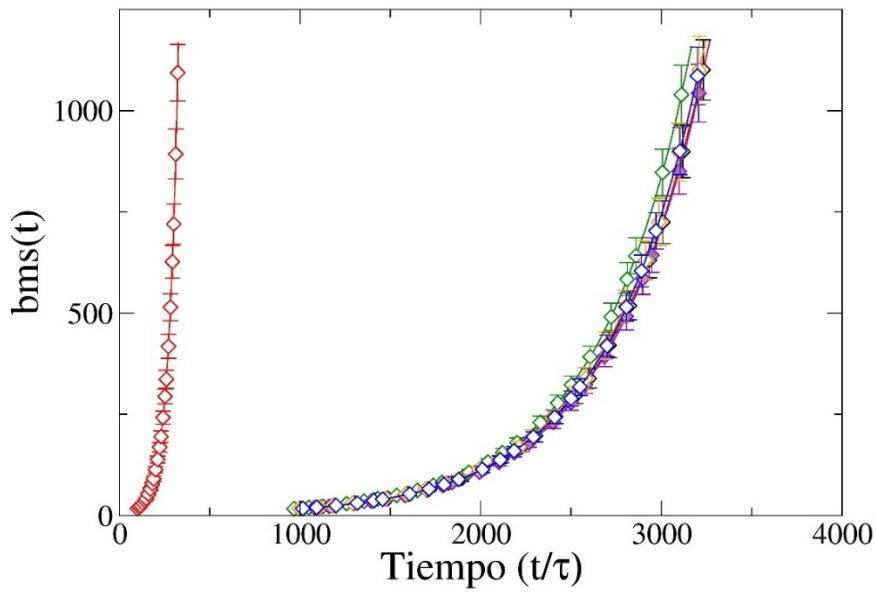
6. Anexo

A continuación, presentamos algunas de las gráficas mostradas en el texto con una mayor resolución.

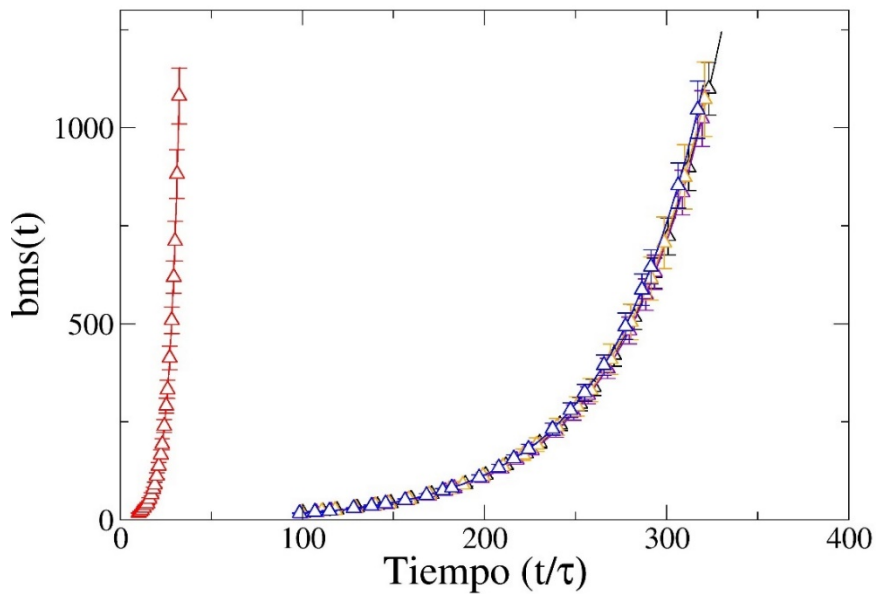
Figura 5:



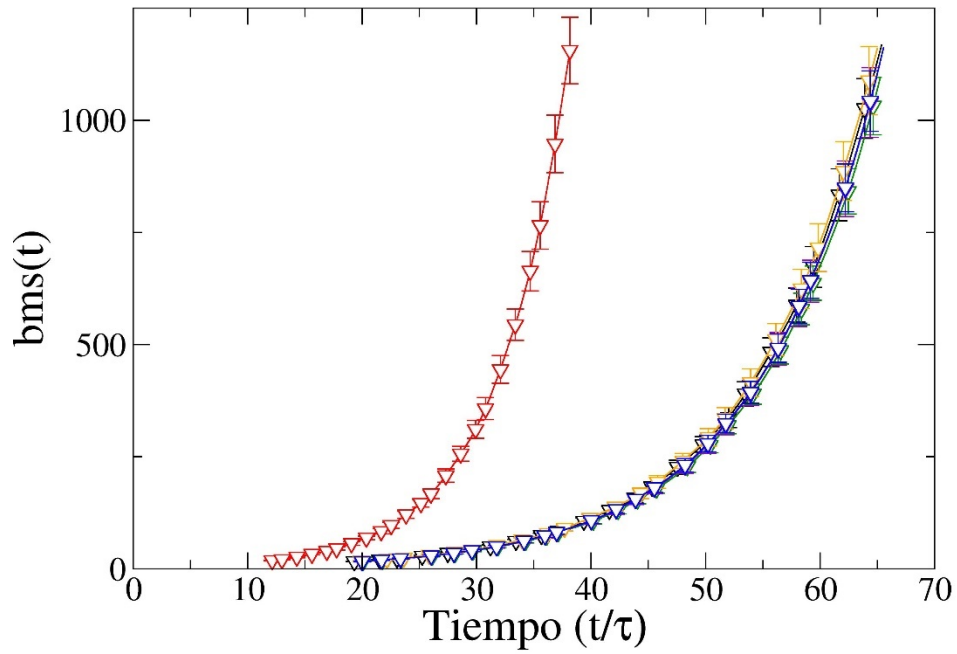
Se muestra la biomasa frente al tiempo, es esta gráfica se muestran los distintos escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2=azul), todos con una $\Gamma = 0,01$



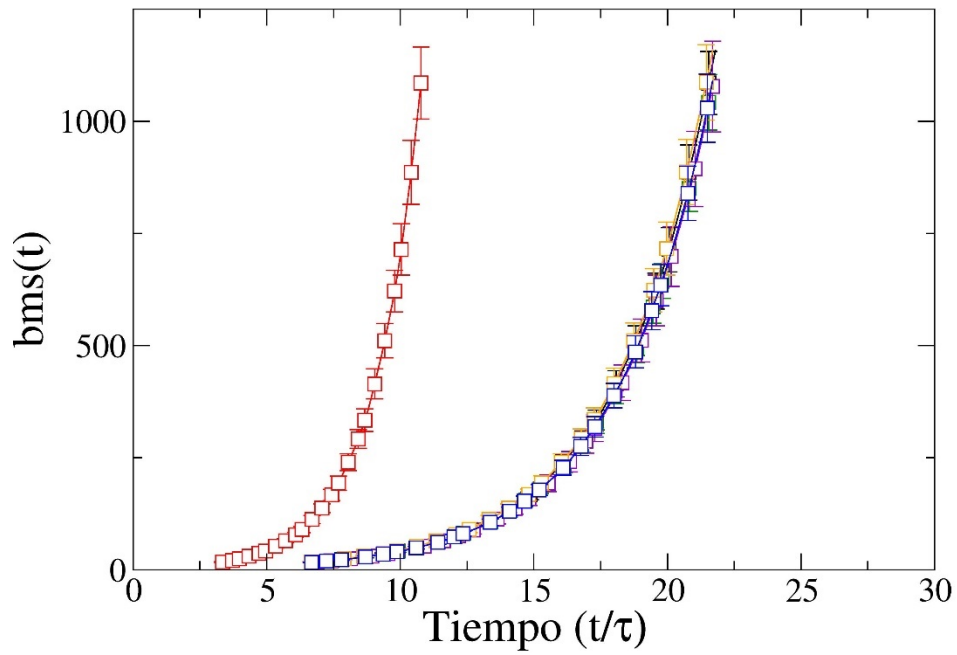
Se muestra la biomasa frente al tiempo, es esta gráfica se muestran los distintos escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2=azul), todos con una $\Gamma = 0,1$



Se muestra la biomasa frente al tiempo, es esta gráfica se muestran los distintos escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2=azul), todos con una $\Gamma = 1$

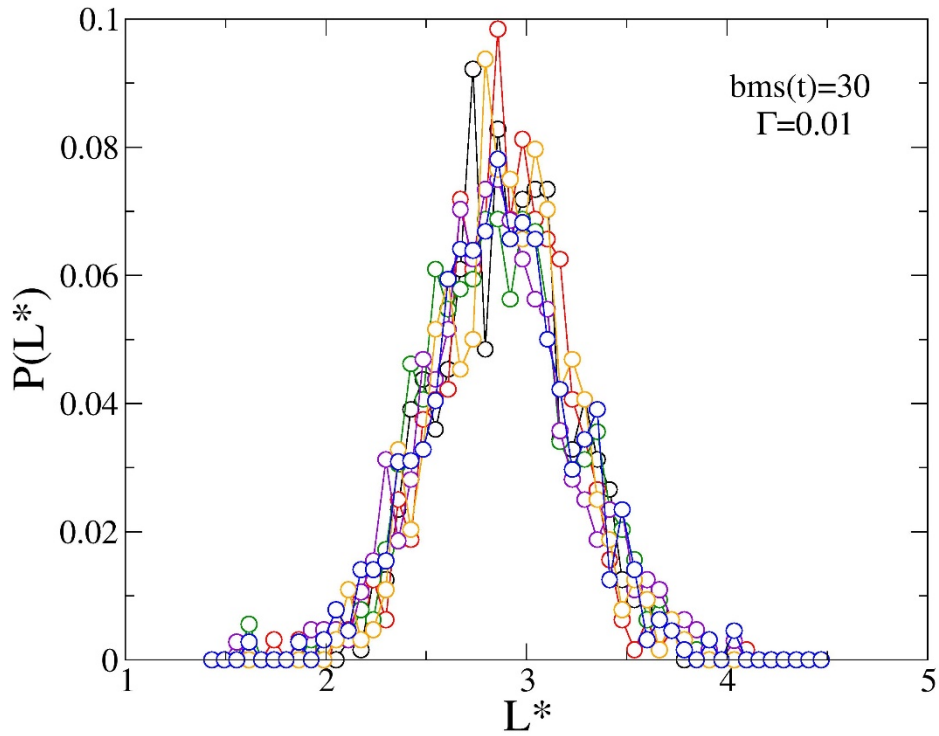


Se muestra la biomasa frente al tiempo, es esta gráfica se muestran los distintos escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2=azul), todos con una $\Gamma = 5$

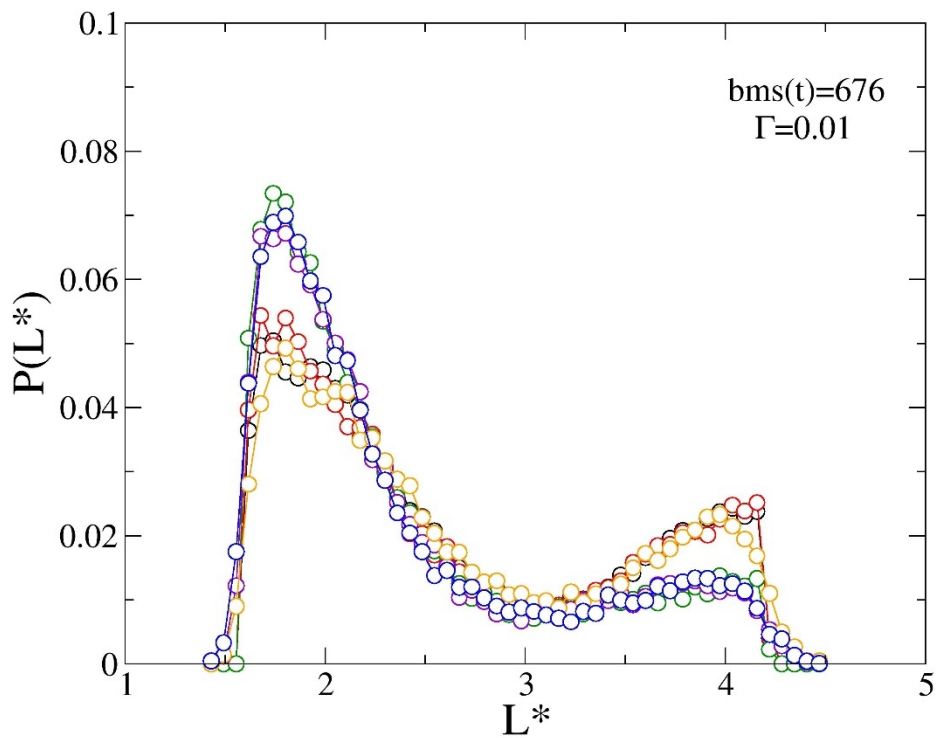


Se muestra la biomasa frente al tiempo, es esta gráfica se muestran los distintos escenarios (A1=negro, A1V=rojo, A2s=verde, A2c=violeta, B1=naranja, B2=azul), todos con una $\Gamma = 15$

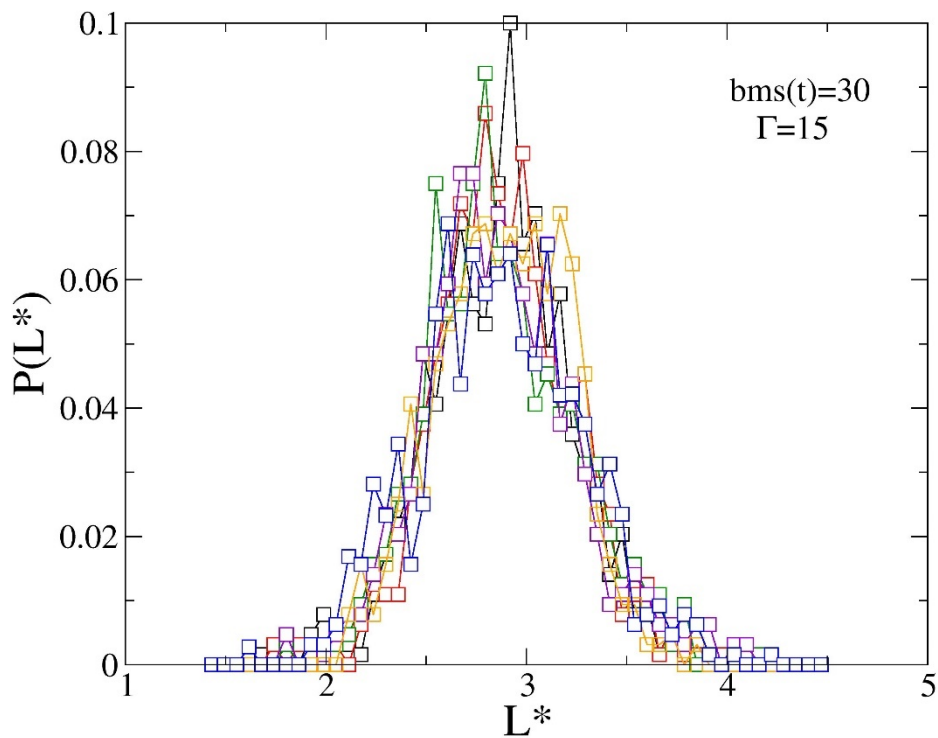
Figura 11:



Se representa la probabilidad del tamaño que puede tener cada partícula frente al tamaño de estas. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 30 y con una $\Gamma = 0,01$.

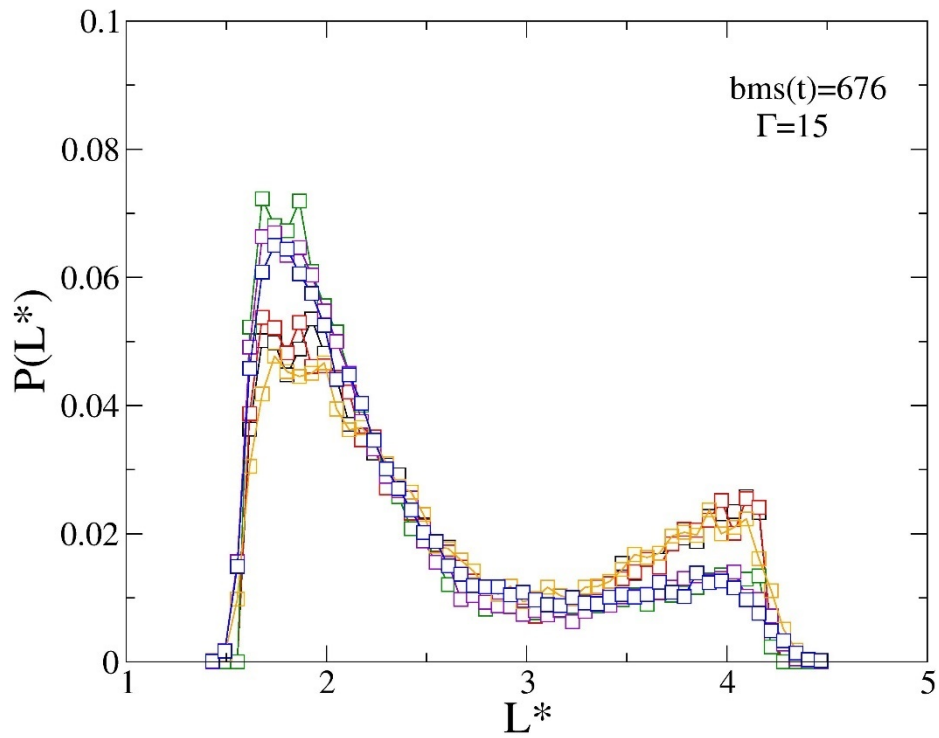


Se representa la probabilidad del tamaño que puede tener cada partícula frente al tamaño de estas. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 676 y con una $\Gamma = 0,01$.



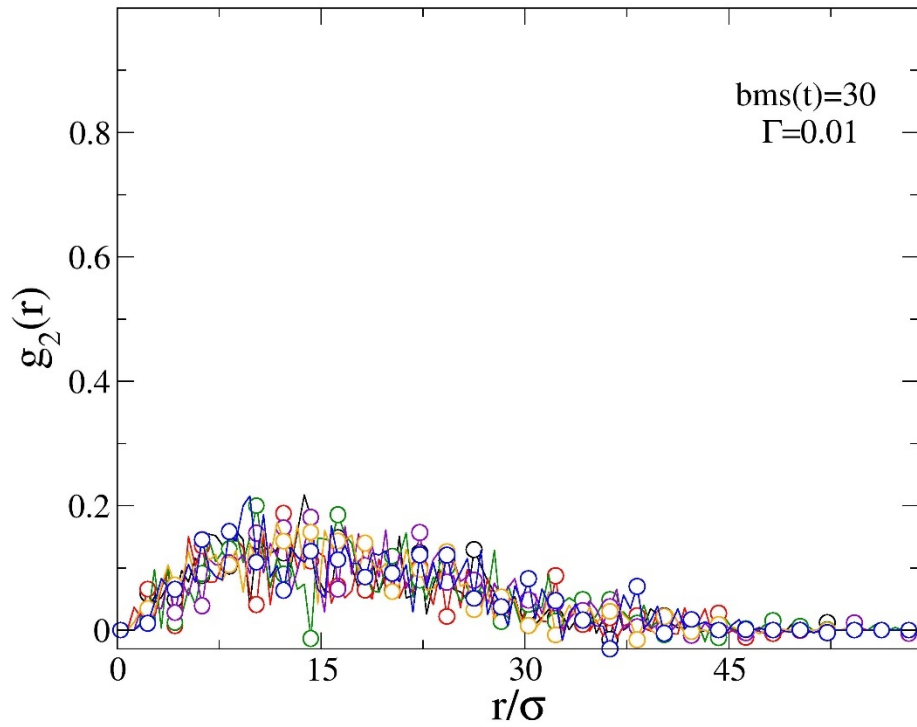
Se representa la probabilidad del tamaño que puede tener cada partícula frente al tamaño de estas. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 30 y con una $\Gamma = 15$.

Se representa la probabilidad del tamaño que puede tener cada partícula frente al tamaño de estas. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 30 y con una $\Gamma = 0,01$.

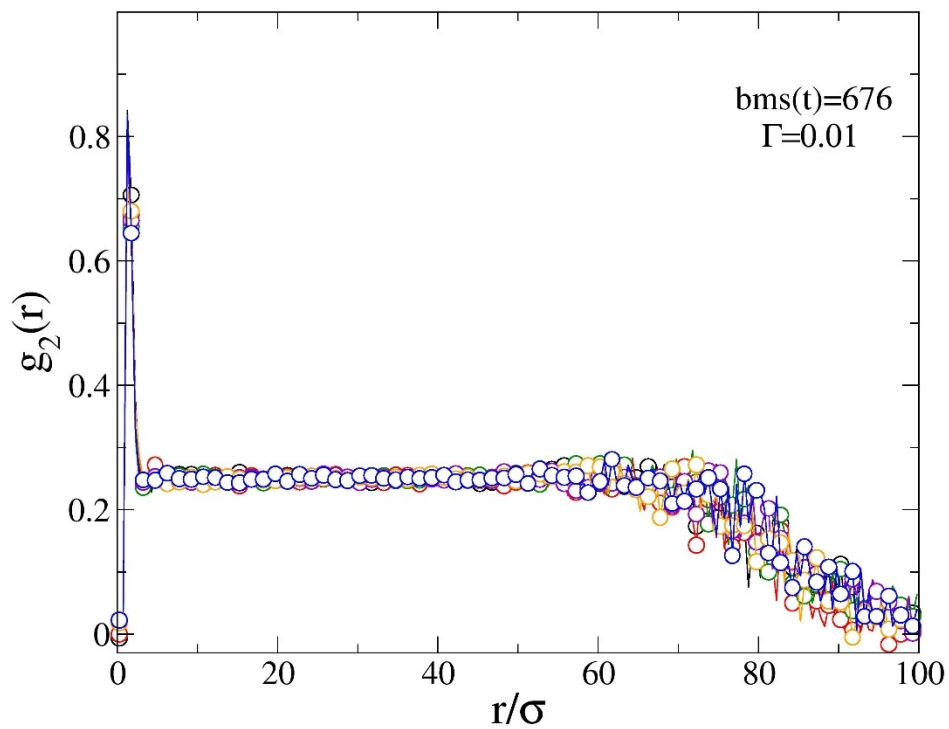


Se representa la probabilidad del tamaño que puede tener cada partícula frente al tamaño de estas. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 676 y con una $\Gamma = 15$

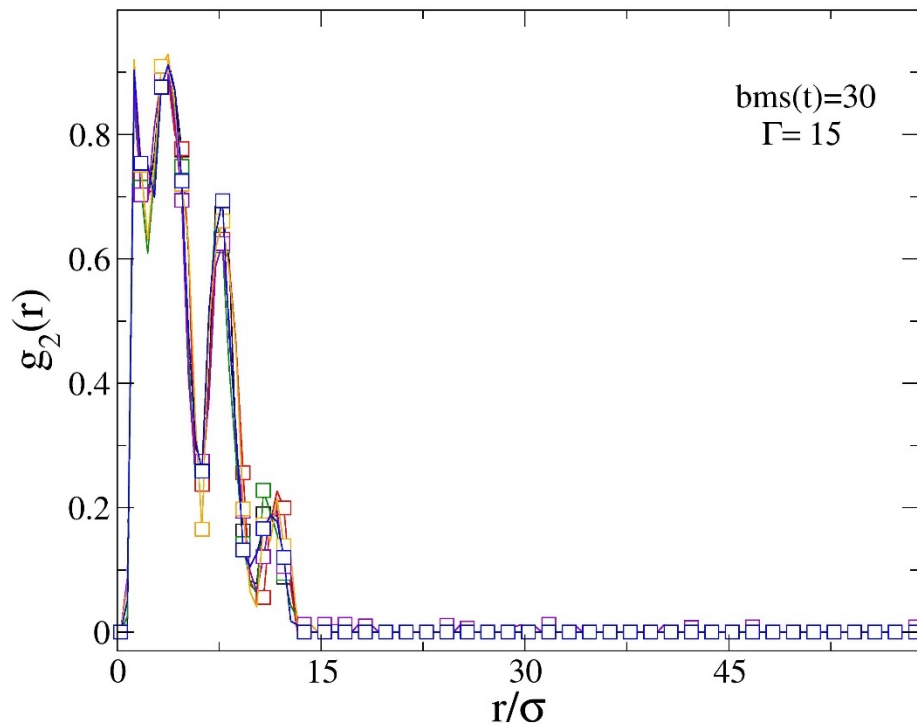
Figura 12



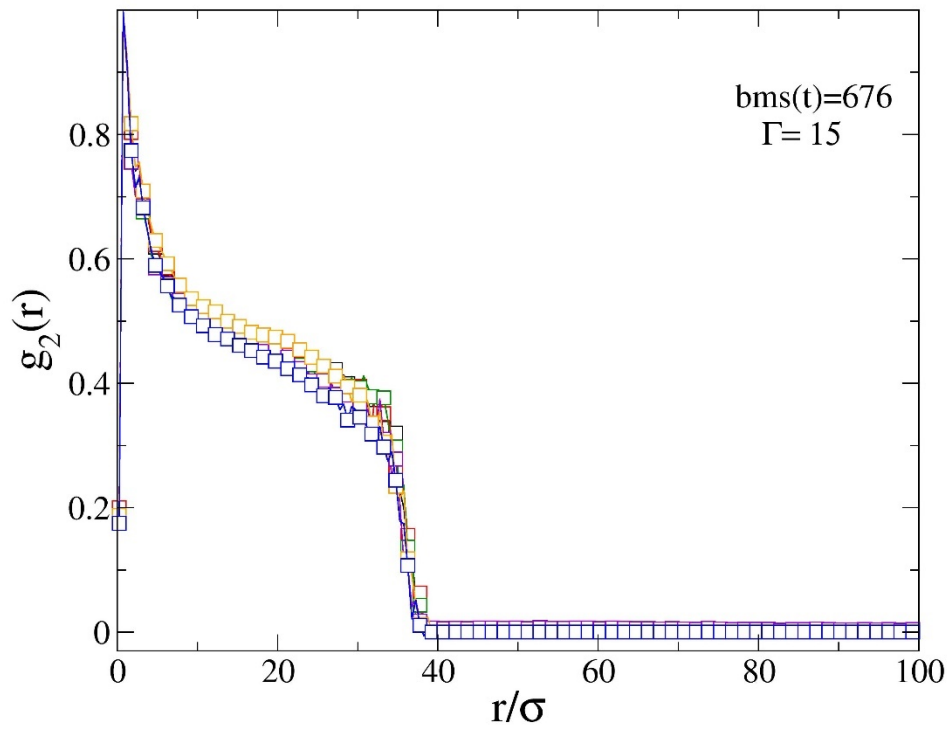
Se representa $g_2(r)$, la correlación orientacional de la colonia y como va cambiando según aumenta la distancia. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 30 y $\Gamma=0,01$



Se representa $g_2(r)$, la correlación orientacional de la colonia y como va cambiando según aumenta la distancia. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 676 y $\Gamma = 0,01$

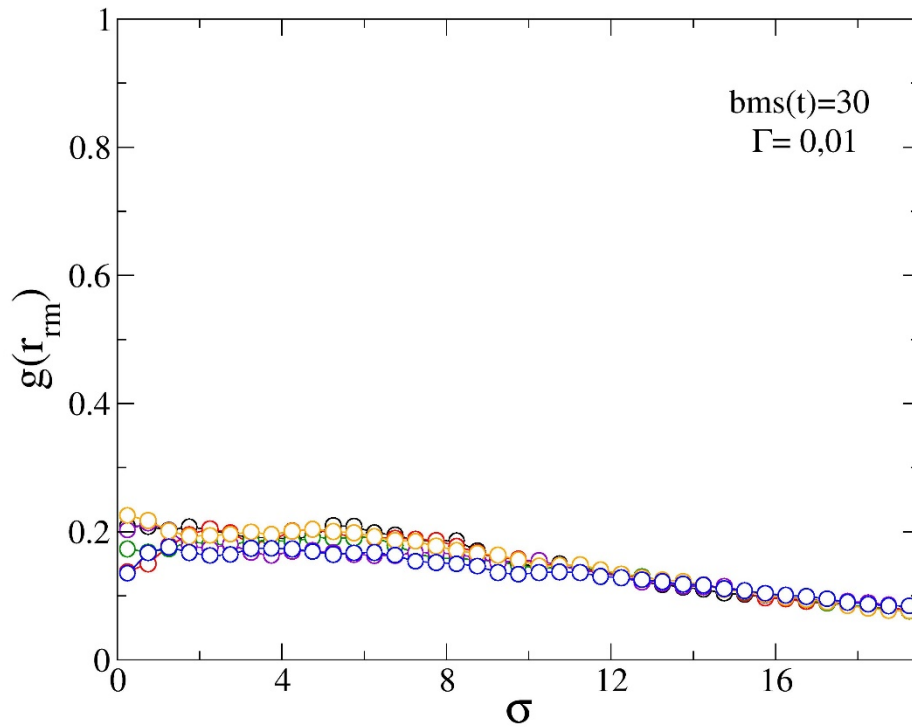


Se representa $g_2(r)$, la correlación orientacional de la colonia y como va cambiando según aumenta la distancia. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 30 y $\Gamma = 15$



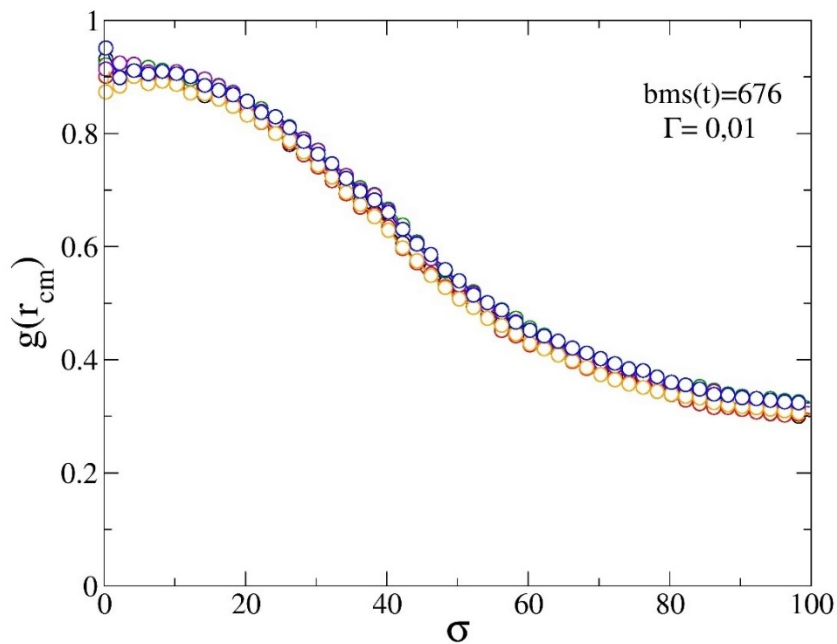
Se representa $g_2(r)$, la correlación orientacional de la colonia y como va cambiando según aumenta la distancia. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 676 y $\Gamma = 15$

Figura 13.

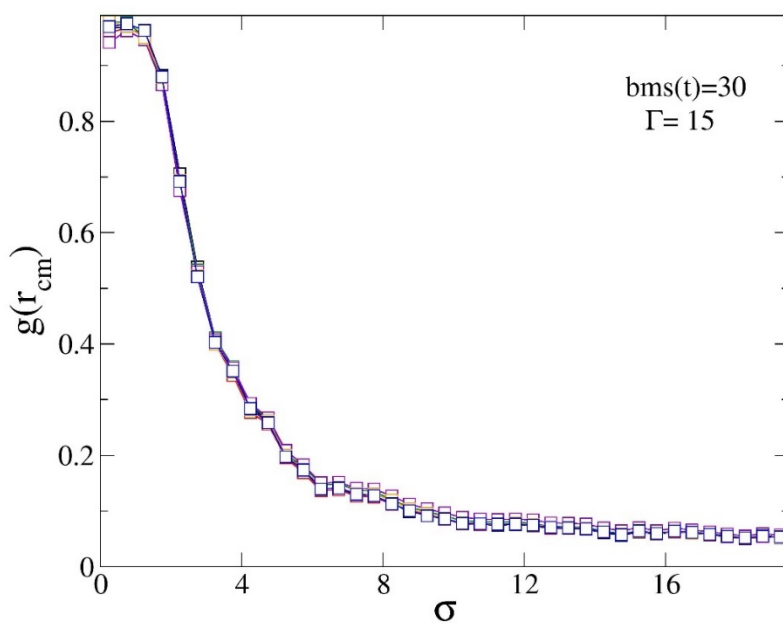


Se representa la superficie de la colonia que está cubierta por las bacterias según a que distancia estén estas del centro de la colonia. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 30 y $\Gamma=0,01$

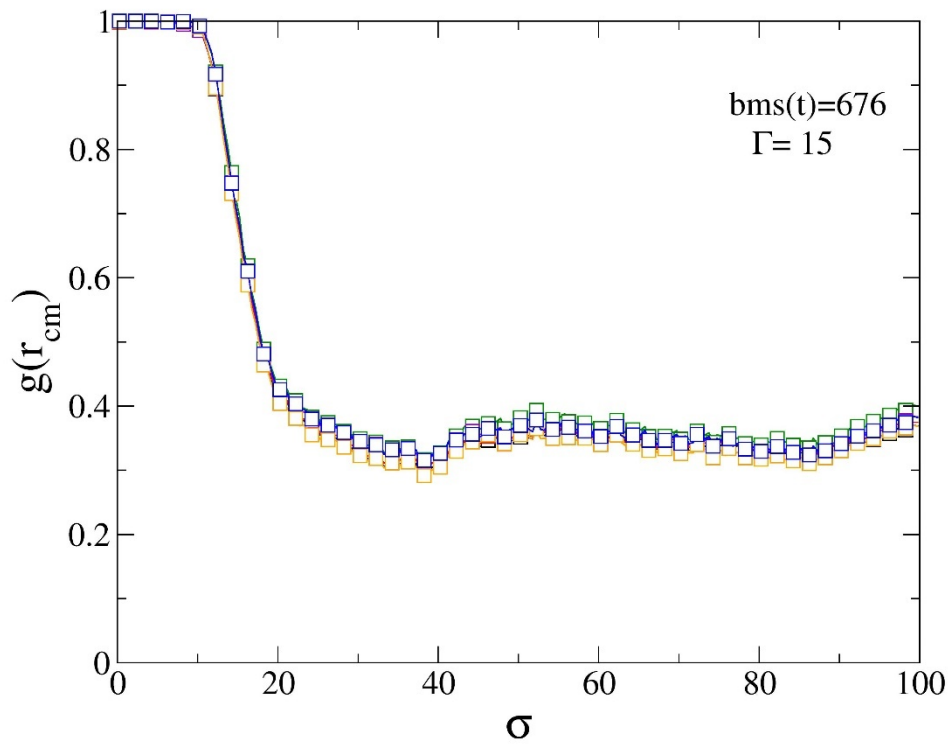
Se representa la superficie de la colonia que está cubierta por las bacterias según a que distancia estén estas del centro de la colonia. Estas gráficas son tomadas en un



instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 676 y $\Gamma=0,01$



Se representa la superficie de la colonia que está cubierta por las bacterias según a que distancia estén estas del centro de la colonia. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 30 y $\Gamma=15$



Se representa la superficie de la colonia que está cubierta por las bacterias según a que distancia estén estas del centro de la colonia. Estas gráficas son tomadas en un instante t del tiempo que es cuando la biomasa es 676 y $\Gamma=15$