



República Bolivariana de Venezuela
Universidad de los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Instituto de Investigación
Sección Biotecnología



**DETERMINACION DE BIOSPECKLE EN COLONIAS DE
MICROORGANISMOS.**
(Trabajo especial de grado para optar por el título de Licenciada en
Bioanálisis)

Autor:

Zambrano D. Marjhorie J.

C.I. V° 20.288.894

Tutor:

Prof. Efrén Andrades

Mérida, Marzo del 2023.

Dedicatoria

Primeramente gracias a mi Dios Todopoderoso, a mi Santo Cristo de La Grita y a mi Santa Rita de Cassia por guiarme en el buen camino, a no desmayar en los momentos difíciles de la vida, a seguir adelante a pesar de las adversidades, a darme las fuerzas necesarias para luchar por mis sueños.

A mi familia por su gran apoyo, a mis padres Eloísa Duque y Luis Zambrano por estar siempre ahí dándome su apoyo, comprensión, cariño, amor, aconsejándome a seguir adelante a pesar de las dificultades, a mis hermanas por estar siempre presentes. En especial a mis hijos Luis Ángel, Angelymar y Mariangel porque son mi motor y mi fuerza, con su amor y alegría han sido para mí una de las razones para cumplir mis metas y son motivo inspirador para cumplir este sueño hecho realidad.

Pero a ti Profesora Cristina Grassi, le dedico este trabajo de investigación porque fuiste otra autora más en este trabajo, con tu ayuda, tu apoyo, tu dedicación para así juntas seguir en este proyecto. Fuiste mi cotutora quien estaba ahí a pesar de todo guiándome en cada línea de este trabajo. Y cada una de las personas que han estado presentes brindándome su amistad y apoyo incondicional para poder culminar esta etapa en mi vida.

Agradecimientos

Primeramente agradecida con Dios por permitirme estar en esta ilustre Universidad, por darme la bendición y la oportunidad de haber cumplido mis sueños y una meta más en mi vida.

A esta grandiosa institución como es la Universidad de los Andes por haberme dado las mejores enseñanzas de estudios y de vida, gracias a cada uno de mis profesores quienes me han formado y han aportado su enseñanza para poder ejecutar en mi vida profesional, excelencia y calidad.

Por supuesto a mi Tutor Efrén Andrades por impartirme esos conocimientos no solo en esta área de investigación, sino lecciones y aprendizajes de vida, y claro está a mi Profesora Cristina Grassi que lamentablemente no está con nosotros pero fuiste una mujer guerrera y luchadora, enseñándome que la vida sigue a pesar de las dificultades que se nos presenta en la vida. Al profesor Carlos Pérez por su colaboración.

Como no agradecer al Lic. Antonio Salas por ser ejemplo a seguir y excelente profesional en esta hermosa área de trabajo por brindarme su apoyo y conocimientos en el Hospital Dr. Carlos Roa Moreno de la ciudad de La Grita.

Índice de contenidos

| | Pág. |
|-------------------------------------|------|
| Dedicatoria | ii |
| Agradecimiento | iii |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | iv |
| ÍNDICE DE TABLAS | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vii |
| RESUMEN | xii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPITULO I. EL PROBLEMA | 3 |
| Planteamiento del Problema | 3 |
| Justificación | 4 |
| Objetivos | 5 |
| Objetivo General | 5 |
| Objetivos Específicos | 5 |
| Alcances y limitaciones | 5 |
| CAPITULO II. MARCO TEÓRICO | 7 |
| Trabajos previos | 7 |
| Antecedentes históricos | 12 |
| Antecedentes teóricos | 13 |
| Biospeckle o speckle dinámico | 13 |
| Láser | 14 |
| Microorganismos | 14 |
| Colonias de microorganismos | 14 |
| Agente etiológico | 15 |
| Definición de términos | 23 |
| Operacionalización de las variables | 25 |
| Sistema de hipótesis | 27 |
| CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO | 28 |

| | |
|---|-----------|
| Enfoque de la investigación | 28 |
| Tipo de investigación | 28 |
| Diseño de la investigación | 29 |
| Población y muestra | 30 |
| Sistema de variables | 30 |
| Instrumento de recolección de datos | 31 |
| Procedimiento o metodología | 31 |
| Diseño de análisis | 37 |
| CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 40 |
| Sección unidimensional | 40 |
| Sección bidimensional | 48 |
| Sección tridimensional | 51 |
| CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 54 |
| Conclusiones | 54 |
| Recomendaciones | 55 |
| BIBLIOHEMEROGRAFIA | 56 |
| ANEXOS | 60 |

Índice de tablas

| N° de tabla | Pág. |
|--|------|
| 1. Operacionalización de las variables | 25 |
| 2. Análisis del perfil del Agar MH y las colonias de <i>S. aureus</i> de los gráficos unidimensionales | 41 |
| 3. Análisis del perfil de las colonias de <i>C. Albicans</i> y de <i>C. tropicalis</i> de los gráficos unidimensionales. | 43 |
| 4. Análisis del perfil de las colonias de <i>E. coli</i> cepas DH y GY de los gráficos unidimensionales | 45 |

www.bdigital.ula.ve

Índice de figuras

| N° de figura | Pág. |
|---|------|
| 1. Perfil unidimensional del Agar Mueller Hinton | 40 |
| 1.1. Perfil horizontal en pixel Y29 del Agar Mueller Hinton | 40 |
| 1.2. Perfil vertical en pixel Y29 del Agar Mueller Hinton | 41 |
| 2. Representación de máximos y mínimos del perfil horizontal (H) y vertical (V) del Agar Mueller Hinton (AMH) y <i>S. aureus</i> (Sa). | 42 |
| 3. Representación de máximos y mínimos del perfil horizontal (H) y vertical (V) de las colonias de <i>C. albicans</i> (Ca) y <i>C. tropicalis</i> (Ct). | 44 |
| 4. Representación de máximos y mínimos del perfil horizontal (H) y vertical (V) de las colonias de <i>E. coli</i> cepas DH y GY. | 46 |
| 5. Perfil bidimensional del Agar Mueller Hinton | 48 |
| 5.1. Perfil bidimensional en grafico de barra | 48 |
| 5.2. Perfil bidimensional en grafico de línea | 48 |
| 6. Perfil bidimensional de la colonia <i>Staphylococcus aureus</i> 42119 | 49 |
| 6.1. Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de <i>Staphylococcus aureus</i> 42119 | 49 |
| 6.2. Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de <i>Staphylococcus aureus</i> 42119 | 49 |
| 7. Perfil bidimensional de la colonia <i>Staphylococcus aureus</i> 9401 | 50 |
| 7.1. Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de <i>Staphylococcus aureus</i> 9401 | 50 |
| 7.2. Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de <i>Staphylococcus aureus</i> 9401 | 50 |
| 8. Perfil tridimensional del Agar Mueller Hinton | 51 |
| 9. Perfil tridimensional de la colonia de <i>Staphylococcus aureus</i> 42119 | 52 |
| 10. Perfil tridimensional de la colonia de <i>Staphylococcus aureus</i> 9401 | 52 |
| 11. Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para el Agar Mueller Hinton | 60 |

| | |
|---|----|
| 12. Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para el <i>Staphylococcus aureus</i> 42119 | 61 |
| 13. Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para el <i>Staphylococcus aureus</i> 9401 | 62 |
| 14. Perfil unidimensional de la colonia de <i>Staphylococcus aureus</i> 42119 | 63 |
| 14.1. Perfil horizontal en pixel Y29 de <i>Staphylococcus aureus</i> 42119 | 63 |
| 14.2. Perfil vertical en pixel X29 de <i>Staphylococcus aureus</i> 42119 | 63 |
| 15. Perfil unidimensional de la colonia de <i>Staphylococcus aureus</i> 9401 | 64 |
| 15.1. Perfil horizontal en pixel Y29 de <i>Staphylococcus aureus</i> 9401 | 64 |
| 15.2. Perfil vertical en pixel X29 de <i>Staphylococcus aureus</i> 9401 | 64 |
| 16. Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para el <i>Candida albicans</i> 52033 | 65 |
| 17. Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para el <i>Candida albicans</i> 23585 | 66 |
| 18. Perfil unidimensional de la colonia de <i>Candida albicans</i> 52033 | 67 |
| 18.1. Perfil horizontal en pixel Y29 de <i>Candida albicans</i> 52033 | 67 |
| 18.2. Perfil vertical en pixel X29 de <i>Candida albicans</i> 52033 | 67 |
| 19. Perfil unidimensional de la colonia de <i>Candida albicans</i> 23585 | 68 |
| 19.1. Perfil horizontal en pixel Y29 de <i>Candida albicans</i> 23585 | 68 |
| 19.2. Perfil vertical en pixel X29 de <i>Candida albicans</i> 23585 | 68 |
| 20. Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para el <i>Candida tropicalis</i> 52906 | 69 |
| 21. Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para el <i>Candida tropicalis</i> 42128 | 70 |
| 22. Perfil unidimensional de la colonia de <i>Candida tropicalis</i> 52906 | 71 |
| 22.1. Perfil horizontal en pixel Y29 de <i>Candida tropicalis</i> 52906 | 71 |
| 22.2. Perfil vertical en pixel X29 de <i>Candida tropicalis</i> 52906 | 71 |
| 23. Perfil unidimensional de la colonia de <i>Candida tropicalis</i> 42128 | 72 |
| 23.1. Perfil horizontal en pixel Y29 de <i>Candida tropicalis</i> 42128 | 72 |
| 23.2. Perfil vertical en pixel X29 de <i>Candida tropicalis</i> 42128 | 72 |

| | |
|---|----|
| 24. Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para la <i>Escherichia coli</i> DH 18172 | 73 |
| 25. Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para la <i>Escherichia coli</i> DH 46393 | 74 |
| 26. Perfil unidimensional de la colonia de <i>Escherichia coli</i> DH 18172 | 75 |
| 26.1. Perfil horizontal en pixel Y29 de <i>Escherichia coli</i> DH 18172 | 75 |
| 26.2. Perfil vertical en pixel X29 de <i>Escherichia coli</i> DH 18172 | 75 |
| 27. Perfil unidimensional de la colonia de <i>Escherichia coli</i> DH 46393 | 76 |
| 27.1. Perfil horizontal en pixel Y29 de <i>Escherichia coli</i> DH 46393 | 76 |
| 27.2. Perfil vertical en pixel X29 de <i>Escherichia coli</i> DH 46393 | 76 |
| 28. Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para la <i>Escherichia coli</i> GY 98663 | 77 |
| 29. Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para la <i>Escherichia coli</i> GY 34943 | 78 |
| 30. Perfil unidimensional de la colonia de <i>Escherichia coli</i> GY 9863 | 79 |
| 30.1. Perfil horizontal en pixel Y29 de <i>Escherichia coli</i> GY 9863 | 79 |
| 30.2. Perfil vertical en pixel X29 de <i>Escherichia coli</i> GY 9863 | 79 |
| 31. Perfil unidimensional de la colonia de <i>Escherichia coli</i> GY 34943 | 80 |
| 31.1. Perfil horizontal en pixel Y29 de <i>Escherichia coli</i> GY 34943 | 80 |
| 31.2. Perfil vertical en pixel X29 de <i>Escherichia coli</i> GY 34943 | 80 |
| 32. Perfil bidimensional de la colonia <i>Candida albicans</i> 52033 | 81 |
| 32.1. Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de <i>Candida albicans</i> 52033 | 81 |
| 32.2. Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de <i>Candida albicans</i> 52033 | 81 |
| 33. Perfil bidimensional de la colonia <i>Candida albicans</i> 23585 | 82 |
| 33.1. Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de <i>Candida albicans</i> 23585 | 82 |
| 33.2. Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de <i>Candida albicans</i> 23585 | 82 |

| | |
|---|----|
| 34. Perfil bidimensional de la colonia <i>Candida tropicalis</i> 52906 | 83 |
| 34.1. Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de <i>Candida tropicalis</i> 52906 | 83 |
| 34.2. Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de <i>Candida tropicalis</i> 52906 | 83 |
| 35. Perfil bidimensional de la colonia <i>Candida tropicalis</i> 42128 | 84 |
| 35.1. Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de <i>Candida tropicalis</i> 42128 | 84 |
| 35.2. Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de <i>Candida tropicalis</i> 42128 | 84 |
| 36. Perfil bidimensional de la colonia <i>Escherichia coli</i> DH 18172 | 85 |
| 36.1 Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de <i>Escherichia coli</i> DH 18172 | 85 |
| 36.2. Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de <i>Escherichia coli</i> DH 18172 | 85 |
| 37. Perfil bidimensional de la colonia <i>Escherichia coli</i> DH 46393 | 86 |
| 37.1. Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de <i>Escherichia coli</i> DH 46393 | 86 |
| 37.2. Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de <i>Escherichia coli</i> DH 46393 | 86 |
| 38. Perfil bidimensional de la colonia <i>Escherichia coli</i> GY 9863 | 87 |
| 38.1. Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de <i>Escherichia coli</i> GY 9863 | 87 |
| 38.2. Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de <i>Escherichia coli</i> GY 9863 | 87 |
| 39. Perfil bidimensional de la colonia <i>Escherichia coli</i> GY 34943 | 88 |
| 39.1. Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de <i>Escherichia coli</i> GY 34943 | 88 |
| 39.2. Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de <i>Escherichia coli</i> GY 34943 | 88 |

| | |
|---|----|
| 40. Perfil tridimensional de la colonia de <i>Candida albicans</i> 52033 | 89 |
| 41. Perfil tridimensional de la colonia de <i>Candida albicans</i> 23585 | 89 |
| 42. Perfil tridimensional de la colonia de <i>Candida tropicalis</i> 52906 | 90 |
| 43. Perfil tridimensional de la colonia de <i>Candida tropicalis</i> 42128 | 90 |
| 44. Perfil tridimensional de la colonia de <i>Escherichia coli</i> DH 18172 | 91 |
| 45. Perfil tridimensional de la colonia de <i>Escherichia coli</i> DH 46393 | 91 |
| 46. Perfil tridimensional de la colonia de <i>Escherichia coli</i> GY 9863 | 92 |
| 47. Perfil tridimensional de la colonia de <i>Escherichia coli</i> GY 34943 | 92 |

www.bdigital.ula.ve



Universidad de los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Instituto de Investigación
Sección Biotecnología



DETERMINACION DE BIOSPECKLE EN COLONIAS DE MICROORGANISMOS.

Autor: Zambrano D. Marjhorie J.
C.I: V-20.288.894
Tutor: Prof. Efrén Andrades

Resumen

El objetivo de este trabajo es demostrar la regularidad y confiabilidad en el crecimiento de las colonias de ciertos microorganismos, usando el biospequelometro láser. Este prototipo fue construido sobre una mesa anti vibratoria con materiales y accesorios de bajo costo y ensayado utilizando diferentes microorganismos cultivados en Agar Mueller Hinton. Se instalaron tres láseres (azul, verde y rojo), así como dos cámaras web y una cámara CCD. En este trabajo solo se utilizó el láser verde en vídeos de 5 a 30 segundos. Se tomaron videos o fotografías de luz reflejada. El procesamiento de video o foto se realizó con el Método de Diferencias Temporales (ImageJ) o Diferencias Generalizadas (ImageDP). Teniendo estos fotogramas en el programa de Excel, se obtuvieron gráficas para así proceder a hacer sus respectivos cálculos matemáticos en la sección unidimensional, obteniendo los resultados esperados para este trabajo. Resultando que en la sección unidimensional se observa el comportamiento de las colonias demostrando ser un excelente método para ver la variabilidad, confiabilidad y regularidad de las colonias teniendo como criterio de inclusión un margen de error de un 10%, siendo los otros métodos más complejos y más variables, pero no es materia de este trabajo de investigación.

Palabras claves: Prototipo, Biospequelometro, sección unidimensional, regularidad, confiabilidad.

Introducción

La evaluación de microorganismos es un tema de gran interés en microbiología, biotecnología, sistemas de salud e industria alimentaria. Una identificación rápida y precisa de los patógenos es crucial para prevenir la contaminación de los productos del comercio y el consumo de la vida cotidiana y para desarrollar protocolos de atención sanitaria preventiva (Ramírez, E. et al. 2017)

A medida que transcurre el tiempo se hace necesario la utilización y optimización de nuevas técnicas de mayor sensibilidad y más rápida para la detección de posibles actividades microbianas usando nuevos sistemas como es en el caso del "Biospeckle"

El patrón de "Speckle" es un patrón de interferencia originado por una luz coherente reflejada o dispersada desde distintas partes de una superficie iluminada. Como resultado emergen ondas que se interfieren y dan origen al aspecto que se semeja agua hirviendo (Díaz k. y Gallego K., 2013)

El método de análisis de contraste de Speckle Laser es uno de los más utilizados en la detección de movimiento de fluidos en secuencia de imágenes. (Briers & Webster 1996)

Cabe mencionar que speckle dinámico o interferometría de moteado, consiste en el análisis de patrones de intensidad producidos por la interferencia mutua entre frentes de ondas coherentes que son sujetas a diferencias de fase o fluctuaciones de intensidad. Este trabajo de investigación busca demostrar ciertos parámetros de regularidad que puede presentar las colonias de varios microorganismos empleando técnicas modernas como la del biospeckle laser.

Para ello se va a realizar un respectivo análisis de la actividad en patrones de speckle dinámico, empleando un prototipo de biospeckle que cuenta con un láser; que permite la determinación de los parámetros que

puedan presentarse en las colonias de ciertos microorganismos. Cabe señalar que se procesaron videos que fueron tomados por otros autores llevado a cabo en una anterior investigación, lo cual permitió realizar el procesamiento de todos los fotogramas que fueron seleccionados sin ningún tipo de vibración, se graficaron y finalmente se procederá a una confrontación del espectro de la molécula con los resultados obtenidos.

El estudio realizado se estructura de la siguiente manera: Capítulo I (El problema) integrado por el planteamiento de problema, justificación, objetivos (general y específicos), alcance y limitaciones de la investigación. Capítulo II (Marco teórico): constituido por trabajos previos, antecedentes históricos, antecedentes teóricos, definición de términos, Operacionalización de las variables y sistema de hipótesis. Capítulo III (Marco metodológico): formado por enfoque, tipo y diseño de investigación, población, muestra, sistema de variable, técnicas e instrumentos de recolección de datos, procedimiento o metodología diseño de análisis. Capítulo IV (Resultados y discusiones). Capítulo V (Conclusiones y recomendaciones). Bibliografía y anexos.

En este trabajo de investigación hay que determinar los parámetros de regularidad que puede presentar las colonias de varios microorganismos empleando técnicas modernas como la del biospeckle laser usando el biospecklemetro.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Las bacterias son responsables de millones de muertes de personas a nivel mundial, siendo las causantes de algunas enfermedades más importantes así como muchas otras de menor gravedad. Es más frecuente que un microorganismo dado, origine la aparición de numerosas manifestaciones clínicas de enfermedad, a que varios produzcan una misma enfermedad. (Díaz, K. y Gallego K. 2013)

Para dar respuestas a estas enfermedades se debe indicar una terapia adecuada en base a la sensibilidad a los antibióticos para así lograr identificar en forma rápida y correcta el agente causal de la infección. Las herramientas más empleadas para su diagnóstico, siguen siendo la observación directa, con o sin tinción y las técnicas de cultivo. Considerando que estos últimos suelen demorar algunos días, se está estudiando la posibilidad de poder implementar el sistema “Biospeckle”.

Se debe mencionar que el biospeckle es un fenómeno de granularidad óptica debido a interferencia aleatoria entre ondas provenientes de un objeto iluminado con luz láser (coherente) y cuya rugosidad es comparable a la longitud de onda. Cuando la superficie que lo origina varía con el tiempo, el resultado es una imagen llamada “speckle dinámico” o “biospeckle”

El análisis de las imágenes de Biospeckle de la superficie de líquidos de bajo volumen se ha desarrollado utilizando los pozos de placas VDRL para ensayos de efectos microbiológicos y farmacológicos [Grassi et al 2016, Grassi et al 2019]. Además, el crecimiento de colonias bacterianas ha sido evaluado por estos métodos [RamírezMiquet et al 2017].

Por tal motivo se ha demostrado que el speckle es una de las técnicas que en la actualidad está dando muy buenos resultados, ya que aporta información relevante de los componentes presentes en diversos microorganismos, por lo tanto es necesario que para comprender el fenómeno de speckle es conveniente analizar a la luz desde el punto de vista ondulatorio.

Por consiguiente se plantea la siguiente interrogante:

¿Existe regularidad y confiabilidad en el crecimiento de las colonias de ciertos microorganismos, usando el biospequelometro láser para nuevos trabajos de investigación?

www.bdigital.ula.ve

Justificación

Se debe señalar que este prototipo de estudio realizado por la Profesora Cristina Grassi, es un dispositivo tecnológico en el que con tan solo, con accesorios y piezas de bajo costo se puede tener un análisis y detección de microorganismos más eficaces, teniendo como resultados una confiabilidad en el uso de este prototipo y en el continuo uso de ese equipo a los estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

- ✓ Determinar la regularidad de las colonias de microorganismo usando el biospequelometro laser.

Objetivos específicos

- ✓ Obtener la matriz y explicar los perfiles unidimensionales de las colonias.
- ✓ Evaluar los valores de máximos y mínimos; y diferencia de ambos de cada colonia.
- ✓ Comparar tabla de los valores de diferencia de máximos y mínimos, ecuación polinomial y relación porcentual del perfil unidimensional.
- ✓ Evaluar criterios de inclusión y exclusión porcentuales.
- ✓ Explicar los perfiles bidimensional y tridimensional.

Alcance y limitaciones

Alcance

Desde el punto de vista bacteriológico, los microorganismos como las bacterias y los hongos poseen componentes esenciales que han demostrado

tener cierto grado de actividad cuando son expuestos a exposición de luz emitida por un láser; por los que son generalmente óptimas para realizar extensos y atractivos experimentos.

Cabe la posibilidad de aprovechar las estructuras de estos microorganismos para observar sus respuestas a diversos parámetros estudiados en este experimento.

Limitaciones

Experimentalmente en cualquier experimento va haber algo que limita el desarrollo del trabajo ya que por tal motivo se escapa del control del investigador, pudiéndose encontrar variables extrañas en el experimento que sea difícil controlar los efectos que se puedan producir en el desarrollo del mismo.

Para desarrollar el trabajo, se ha supuesto que la técnica de speckle láser podría descubrir la actividad bacteriana en diversos microorganismos que han sido procesados con anterioridad para que no exista ningún tipo de interferencia.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Si bien es cierto que hay investigaciones donde se probaron una técnica óptica de imágenes de speckle láser sin contacto para la identificación temprana de unidades formadoras de colonias bacterianas, la finalidad del trabajo es comparar el método de imágenes de speckle láser para la evaluación temprana de la actividad microbiana con la inspección visual estándar bajo iluminación de luz blanca (Balmages, I. et al. 2021)

Es por ello que (Ramírez, E. et al 2017) informaron sobre el procesamiento de biospeckle de la actividad biológica utilizando un esquema de visualización basado en la tecnología de información de imágenes digitales, obteniendo como resultados que se ha encontrado adecuada para monitorear la motilidad y los cambios morfológicos en la población bacteriana a lo largo del tiempo y para detectar y distinguir una acción farmacológica a corto plazo sobre los parásitos.

En la sección de Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, se ha implementado la técnica de biospeckle en diversos trabajos.

(García, L., 2011) estandarizo el uso de speckle dinámico para detectar la presencia de parásitos, para ello realizo el ensayo en una placa de V.D.R.L y efectuó grabaciones de cada pozo realizando videos de 60 segundos. Esos videos se procesaron con un programa diseñado, elaborado y ejecutado de

(Andrade, F., 2011) usando el método de Diferencias Temporales. Los resultados indican que los parásitos en presencia de los diversos fármacos ensayados alcanzan un valor de Media arrojado por el programa de (Andrade, F., 2011), mayor que en ausencia de fármacos, estimulándose el patrón de speckle bajo estas condiciones, asimismo, esta relación es dependiente de la concentración de fármaco. Finalmente, demostró que esta técnica puede sustituir los ensayos in vitro e in vivo, ya que es más rápida y se evita la contaminación de medio.

Simultáneamente (Lobo, L., 2011), corroboró este planteamiento, utilizando el biospeckle para medir la actividad de diversos fármacos sobre *T. cruzi*, de esta manera se puede hacer una predicción rápida del efecto a corto plazo de los fármacos sobre los parásitos, produciéndose un efecto instantáneo cuando se emplea Tofranil y Triptanol. En este trabajo no solo se utilizaron nuevas propuestas de fármacos (antidepresivos tricíclicos) como trypanocidas, sino también se evaluó el valor predictivo del biospeckle al comparar los resultados con experiencias desarrolladas in vitro e in vivo.

(Belandria, O., 2011), diseño experiencias de biospeckle tomando en cuenta los resultados de otros investigadores, (García, L., 2011) y (Lobo, L., 2011), pero aplicadas a *E. coli*. El diseño consistió en evaluar tanto el efecto de la concentración de antibiótico sobre la bacteria, como el tiempo de acción del mismo, tratando de encontrar tanto la concentración óptima como el tiempo mínimo para la detección de Biospeckle.

Para ello desarrollo el Biospeckle con medio de cultivo, medio más bacterias, medio más bacterias más antibióticos y medio más antibióticos, inicialmente se observó que la presencia de bacterias aumenta el patrón de speckle, además se decidió esperar un tiempo prudencial de 15 minutos, y así evitar los efectos por movimiento, mezcla y difusión. Los resultados demuestran que el biospeckle es más eficiente con respecto a tiempos que técnicas tradicionales como macro dilución y difusión en agar, por tanto

representa un método que tiene un valor predictivo para obtener concentración mínima inhibitoria de un antibiótico (Belandria, O., 2011).

En estos tres trabajos, los videos se procesaron por el Programa de (Andrade, F., 2011), por el cual fue diseñado por el método de las diferencias temporales tomadas de (Pomarico, J., et al 2004). Este Programa hace la resta de las matrices de fotogramas consecutivos, y luego calcula la media de cada matriz de diferencia, obteniendo un solo valor de Intensidad Media Final. Este método tiene la particularidad de "normalizar" y disminuir las diferencias. En los trabajos sucesivos se ha cambiado el análisis hacia un sistema de auto correlación comparado cada matriz con una matriz constante y tomando el cambio que ocurre en función del tiempo o pendiente, lo que ha mejorado las diferencias entre videos. Este método ha sido denominado por nosotros como comparación de base contante.

En un estudio similar, realizado por (Díaz, K. y Gallego. K., 2013), se utilizó biospeckle para medir el efecto de ciprofloxacina sobre *E. coli*, los resultados permite inferir que se puede distinguir materia viva de materia muerta, además se encontró con una posible correlación entre la pendiente de la tendencia lineal, la concentración bacteriana y la concentración del antibiótico, tendiendo a ser mayor la pendiente cuando aumenta la concentración de bacterias, mientras que disminuye cuando aumenta el antibiótico. En este trabajo los videos también se procesaron manualmente por el método de comparación con base constante.

Recientemente se han desarrollado dos trabajos el de (Méndez, R., 2015) y (Abche, S., 2015) que han conducido al avance de procesamiento de imágenes. (Méndez, R., 2015), examino las ecuaciones y los algoritmos utilizados en el procesamiento y propuso nuevo método basados en los conceptos de flujo óptico, que denominamos flujo óptico IDAVB. (Abche, S., 2015), tomo esa propuesta y reprocesó los videos obtenidos por (Belandria, O., 2011) y tomando en consideración el modo de acción de los antibióticos

utilizados, contribuyo a constatar que ese nuevo procesamiento es más adecuado.

Todos los trabajos anteriores se llevaron a cabo con un ensamble manual de láser, cámara y porta muestras, que se armaba en un cuarto oscuro. A partir del año 2012 se comenzó a elaborar un prototipo de Biospeckle en el contexto del Proyecto de Innovación del Poder Popular para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, intitulado: "Producto y proceso para medir el efecto de antibióticos sobre microorganismos en un tiempo corto y utilizando Biospeckle" Proyecto No. 2012001862.

(Briceño, M. y Ángel, A. 2013), utilizando el Prototipo de Biospeckle en sus primeras etapas de fabricación, también aplicaron Biospeckle en el estudio de bacterias, para ello emplearon métodos de atenuación de láser con el objetivo de detectar la presencia de la misma, usando láser rojo, verde y azul con vidrios o filtros como atenuadores. Los resultados indican que el vidrio es buen atenuador cuando las bacterias están muy diluidas, sin embargo ocurre saturación de la imagen y afecta la cámara, por lo que recomienda usar filtros.

Así mismo demostraron que empleando el láser verde se detecta solo efecto antibiótico cuando se usa vidrio como atenuador, mientras que si se usa un filtro se detectan solo bacterias. En el caso del láser azul se obtienen resultados similares aunque es mucho más versátil para detectar bacterias concentradas y diluidas en presencia y ausencia de antibióticos si se atenúa con filtro. En este trabajo los videos se procesaron manualmente por el momento de comparación con base constante (Briceño, M. y Ángel, A. 2013).

(Moreno. N., 2015), reunió las experiencias anteriores para mejorar los datos de biospeckle. Para ellos se ha evaluado el efecto del antibiótico Ampicilina -Sulbactam sobre *E. coli*, por Biospeckle, usando láser verde en el prototipo construido y se han evaluado variables que inciden sobre este sistema, tales como cámara, resolución, aumento, etapa del crecimiento, presencia de antibiótico, etc. El procesamiento de videos se ha realizado por

el método de comparación con base constante y por el método óptico IDABV. En ese contexto se ha logrado poner a punto una metodología de "Antibiograma de Biospeckle" y se ha evaluado la presencia de sistemas articulados para aumentar la diferencia entre muestras vivas y aquellas afectadas por el antibiótico.

Todo este sistema de detección de microorganismo por Biospeckle se aplicó a muestras de orina de pacientes que clínicamente tenían infección urinaria y sus muestras se analizaron por VITEK y por Biospeckle, en el Biospequelometro (Muñoz, O., 2015). Los resultados obtenidos en la comparación de coincidencia paciente por paciente, Vitek-biospeckle, es de 75%, concluyendo que el biospeckle es capaz de detectar actividad biológica en muestras de orina y que pudiera llegar a ser una prueba complementaria el análisis microbiológico tradicional, tal como cultivo, antibiograma y VITEK, ya que en un tiempo muy corto, podría dar una indicación al médico para iniciar el tratamiento, que luego se confirmaría por los métodos tradicionales.

(Griffin, K., 2015), aplico el análisis de imágenes por IDABV a videos que tomaron la imagen de la placa completa, por lo que se diseñó un sistema de recorte de los pozos para poder hacer el análisis de imágenes de los pozos individuales. Esta metodología tiene la ventaja de asegurar condiciones equivalentes para todas las muestras. En este caso se pudo determinar la actividad de celebrex y EDTA pero dipirona no arrojó actividad, a pesar de haber demostrado actividad por ensayos in vitro e in vivo.

(Arrieche, A., 2016), aplico el análisis de imágenes por IDABV a ensayos realizados en medio líquido pero en viales de cultivos y cuyos videos se tomaron de cuatro viales de manera simultánea. En este trabajo se aplicaron los métodos de IDABV, la separación de imágenes dentro de un video y el efecto de dipirona (que en ese caso dio los resultados esperados), encontrándose que el sistema arrojó resultados adecuados y que este enfoque podría ser utilizado.

(Contreras R. 2016), determino la actividad del *Trypanosoma cruzi* en presencia de fármacos usando la técnica de biospeckle laser usando dos modalidades de procesamientos de imágenes. Se observaron 35 videos en experiencias previamente realizadas, los cuales se corresponde a dos tiempos (t0- t15); tomados a cada pozo con su respectiva droga en una placa de VDRL. Como resultaron sugirieron las siguientes drogas (Dipirona, Alopurinol, Alendronato + ketazol, Alendronato y Alendronato + Alopurinol) por ser el más potente para matar el parasito a los 15 min. Para el caso de (0) min mínimo solo 13 drogas generaron un efecto instantáneo cuando entran en contacto con el parasito

Aunque otros autores tales como (Ramírez, E., Martí, L., y Contreras, O., 2011), También desarrollaron Biospeckle sobre bacterias, nuestro trabajo ha resultado ser novedoso y original por usar bacterias en medios líquidos y evaluar el efecto de antibióticos y lograr detectar pequeños cambios en la actividad bacteriana en tiempo corto.

www.bdigital.ula.ve

Antecedentes históricos

En la década del 60, específicamente el 16 de mayo de 1960; Theodore Maiman, jefe de los Laboratorios de Investigación Hughes, consiguió fabricar el primer láser operativo. El logro de este laser puso fin a una carrera que había ocupado a investigadores y laboratorios durante varios años. Por otra parte según la versión de los Laboratorios Bell, el acontecimiento clave se remonta a 1958.

Sin embargo en aquel entonces (Gould G., 1.957) estudiante de doctorado de la Universidad de Columbia en Nueva York, ya había desarrollado sus propias ideas para la fabricación de un láser. Su trabajo data de 1957, como demuestra el registro notarial que hizo de sus apuntes,

donde acuñaba el término "láser" como termino esencial de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation.

En un principio Gould no solicitó la patente, convencido de que antes debía fabricar un modelo experimental. Cuando lo hizo, en 1959, la Oficina de Patentes estadounidense ya se hallaba deliberando sobre la solicitud de los Laboratorios Bell. Habrían de transcurrir veinte años de amargas disputas hasta que Gould lograra la adjudicación de varias licencias relacionadas con el invento, (Gould G., 1.957).

Una revisión completa del campo complejo de la estadística de "Speckle" es el aportado por Goodman (1984), donde especifica que el "Speckle" es un fenómeno aleatorio y puede describirse únicamente en forma estadística.

Por lo tanto, es importante destacar que el método de análisis de contraste de Speckle láser propuesto por Briers & Webster (1996), es uno de los más utilizados en la detección de movimientos de fluidos en secuencias de imágenes.

Desde entonces, se han vuelto indispensables en los laboratorios que emplean métodos espectrofotométricos; actualmente pueden encontrarse en miles de aplicaciones, en campos muy variados, como la electrónica de consumo, la tecnología de la información, la investigación científica, la medicina, la industria y el sector militar.(Podesta M. 2002).

Antecedentes teóricos

Biospeckle o speckle dinámico

Es una técnica basada en el empleo de un láser (HeNe), que interactúa a través de un medio biológico, determinando los cambios en las propiedades ópticas del medio mediante un índice de refracción, atenuación, polarización;

los cuales presentan valores temporales de irradiación. (González J. y col., 2.011).

Láser

Es un instrumento que utiliza un efecto de la mecánica cuántica, la emisión inducida o estimulada, para generar un haz de luz coherente tanto espacial como temporalmente. La coherencia espacial se corresponde con la capacidad de un haz para permanecer con un pequeño tamaño al transmitirse por el vacío en largas distancias y la coherencia temporal se relaciona con la capacidad para concentrar la emisión en un rango espectral muy estrecho. (Maiman T., 1.960).

www.bdigital.ula.ve

Microorganismos

Los microbios, también llamados microorganismos, son seres vivos diminutos que individualmente son demasiados pequeños para ser observados a simple vista. El grupo incluye las bacterias, los hongos, las levaduras, los mohos, los protozoarios y las algas microscópicas. También incluye los virus. (Tortora, G. y col. 2007)

Colonia de microorganismo

Son clones de células suficientemente numerosos como para que sea visible en un medio sólido. Prácticamente todos los microorganismos (bacterias,

hongos, protozoarios y algas) pueden crecer formando colonias. (Tortora, G. y col. 2007).

Agente Etiológico

Según (Reyes A., 2.011):

Escherichia coli

Clasificación taxonómica

- **Reino:** *Bacteria*
- **Filo:** *Proteobacteria*
- **Clase:** *Gammaproteobacteria*
- **Orden:** *Enterobacteriales*
- **Familia:** *Enterobacteriaceae*
- **Género:** *Escherichia*
- **Especie:** *E. coli (E. freundii)*

Características morfológicas y nutricionales

Son Bacilo Gram negativo. No forma esporas. Móviles. Miden 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo. Catalasa positiva. Oxidasa negativos. Reducen nitratos a nitritos. Producen vitamina B y K. Fermenta glucosa y lactosa con producción de gas. Es anaerobio facultativo

Características coloniales

Las colonias de *E. coli* en agar E.M.B. (eosina y azul de metileno), tienen 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro, y tienen brillo verde metálico cuando se observan con luz. En agar MacConkey las colonias son rojas con halo turbio.

Estructura antigénica

- Antígeno capsular (antígeno “K”)
- Antígeno somático (antígeno “O”)
- Antígeno flagelar (antígeno “H”)
- Antígenos menores como proteínas de membrana externa y fimbrias.

Epidemiología Cuadro Clínico

- Se presenta como una enfermedad de niños menores de 2 años.
- Afecta la mucosa intestinal.
- Pérdida de disacaridasas.
- Produce diarrea secretora y se puede asociar con fiebre y si no se controla conduce a deshidratación y finalmente la muerte.
 - *E. coli* enteroinvasiva (EIEC):
- Presenta una distribución mundial.

- Se ha repostado como causa frecuente de diarrea en Brasil, USA, y Europa.
- Afectan la mucosa del colon.
- Evacuaciones de poca cantidad acompañadas de moco y sangre, dolor abdominal tipo cólico y fiebre.
 - *E. coli* enterohemorrágica (EHEC):
- Se da en países de clima templado como USA, Canadá, Inglaterra, Argentina y Japón.
- Los serotipos involucrados más comúnmente son: O26, O111, O121, O145 y O157.
- Colitis hemorrágica:
 - Diarrea de inicio brusco con dolor abdominal.
 - Las evacuaciones líquidas se acompañan de una descarga hemorrágica.
- Síndrome urémico hemolítico.
 - *E. coli* enteroagregativa (EAEC):
- Se ha caracterizado por cuadros de diarrea persistente (dura más de 14 días) en niños, de diversas regiones geográficas, principalmente de países en desarrollo.
- Diarrea secretora acuosa con moco y sangre, con fiebre en bajo grado.
 - *E. coli* enterotoxigénica (ETEC):
- Las cepas ETEC son una causa frecuente de diarrea en lactantes de países en desarrollo, así como la causa más común de diarrea en individuos de países industrializados que viajan a zonas menos desarrolladas del mundo.
- Presenta de 8 a 12 evacuaciones al día por un periodo de 4 a 5 días.

- Las cepas de ETEC son una causa importante de diarrea en niños menores de 5 años de edad y la causa más frecuencia de diarrea del viajero.

Según (Braun B., et al. 2.011):

Cándida Albicans

Clasificación taxonómica

- **Reino:** *Fungi*
- **Clase:** *Saccharomycetes*
- **Orden:** *Saccharomycetales*
- **Familia:** *Saccharomycetaceae*
- **Género:** *Cándida*
- **Especie:** *C. Albicans*

Definición

La *Cándida Albicans* es un hongo diploide asexual (forma de levadura). Además es un saprófito de la familia f de los *Saccharomycetaceae*. Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Desempeña un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación.

Patologías conocidas

La *Cándida Albicans* puede asumir patogenicidad provocando la candidiasis; en ese caso se presenta como una afección vaginal (vaginitis), de la cavidad oral (miquet), del intestino o de la piel.

En un paciente inmunosuprimido o convaleciente, que haya recibido un tratamiento antibiótico de larga duración; la *Cándida* se multiplica en modo anómalo y, atraviesa el intestino, para entrar al torrente sanguíneo, donde libera sus propias toxinas provocando la candidemia. Este fenómeno da lugar a algunos síntomas abdominales como: mala digestión, gases e hinchazón, molestias intestinales (estreñimiento o diarrea), intolerancia alimentaria, irritabilidad, insomnio, pérdida de la memoria, dolores de cabeza y depresión.

La candidiasis induce también una disminución de la absorción de las sustancias nutritivas por lo que se podría producir un estado de malnutrición en los pacientes inmunosuprimidos.

www.bdigital.ula.ve

Tratamientos

Según la extensión de la infección y el estado general del paciente se decide un tratamiento tópico o sistémico. Si es tópicamente se puede emplear clotrimazol al 1%, miconazol, ketoconazol, sertocanazol, terbinafina o naftilina. Los tratamientos sistémicos más frecuentemente empleados son itraconazol o fluconazol. El pronóstico es bueno siendo curativos tanto los tratamientos tópicos como sistémicos. Pero si los factores predisponentes de estas micosis no se corrigen es posible otra nueva infección.

Así mismo (Krone C., et al. 2.001), estableció:

Candida tropicalis

Clasificación taxonómica

- **Reino:** *Fungi*
- **Filo:** *Deuteromycota*
- **Subfilo:** *Deuteromycotina*
- **Clase:** *Deuteromycetes*
- **Subclase:** *Blastomycetidae*
- **Familia:** *Cryptococcaceae*
- **Género:** *Cándida*

Definición

Este tipo de *Cándida* es un género de hongos unicelulares también llamados levaduras. La especie de *Cándida* más significativa por su importancia clínica es *Candida albicans*. Las infecciones causadas por hongos se denominan micosis. Las micosis causadas por *Cándida albicans* o por otras especies de *Cándida* se denominan (candidiasis) en humanos y en otros animales, especialmente en pacientes con inmunosupresión o pacientes descompensados.

Clínica

El crecimiento de *Cándida tropicales* in vitro, aparece como colonias grandes, redondas, blanco o crema en "placas de Petri" con su respectivo agar. Por lo general Las candidiasis son las infecciones por hongos más frecuentes en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Según (Munrray 2009)

Staphylococcus aureus

Clasificación taxonómica

- **Reino:** *Bacteria*
- **Filo:** *Firmicutes*
- **Subfilo:** *Deuteromycotina*
- **Clase:** *Bacilli*
- **Subclase:** *Bacillales*
- **Familia:** *Staphylococcaceae*
- **Género:** *Staphylococcus*
- **Especie:** *Staphylococcus aureus*

Fisiología

Son bacterias gram positivos dispuestos en racimos. Son bacterias aerobios y anaerobios facultativos. Crecen a una temperatura de 18°C a 40°C. Tienen actividad metabólica fermentativa y crecen en medios con

cloruro de sodio al 10%. No forman esporas son inmóviles. Catalasa y coagulasa positiva. Se caracteriza porque sus colonias son pigmento de color amarillo.

Factores de virulencia

Componente de la estructura de la pared

- Capsula: Inhibe la quimiotaxis y la fagocitosis; inhibe la proliferación de las células mononucleares; facilita adherencia a cuerpos extraños.
- Péptidoglucano: Proporciona estabilidad osmótica; estimula la producción de pirógenos endógenos; inhibe la fagocitosis.
- Ácido teicóico: Regula la concentración catiónica de la membrana celular.
- Proteína A: Inhibe la eliminación mediada por anticuerpos a unirse a los receptores Fc de IgG1, IgG2, e IgG4.
- Membrana citoplasmática: regula el transporte hacia el interior y el exterior de la célula; barrera osmótica.

Toxinas y enzimas

- Citotoxinas (α , β , y leucocidina)
- Toxinas exfoliativas (ETA, ETB)
- Enterotoxinas (A-E, G-I)
- Síndrome del shock tóxico – toxina-1.
- Enzimas: Coagulasa. Catalasa. Hialuronidasa. Fibrinolisisina. Lipasas. Nucleasas. Penicilasas

Procesos patológicos

- Invasivo: infecciones de la piel, osteomielitis, neumonía y bacteriemia.
- Toxigénico: enteritis y síndrome de piel escaldada.
- Inmunitario: síndrome de shock tóxico.

Definición de términos

- **Agar:** Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas, utilizada como medio de cultivo, en farmacia, en bacteriología y en ciertas industrias. (Abrahams P. y col 2003).
- **Antimicótico:** Dicho de un medicamento, de una sustancia, de un procedimiento, etc.: Que se utilizan para combatir las infecciones por hongos. U. t. c. (Raffensperger, E. y col 2002).
- **Concentración:** Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen. Su unidad en el Sistema Internacional es el *mol por metro cúbico* (mol/m^3). (Raffensperger, E. y col 2002).
- **Cultivo:** Se define como un método para la multiplicación de microorganismos, tales como bacterias, hongos y parásitos, en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado. (Abrahams P. y col 2003).
- **Espectros:** Es una imagen o representación que puede presentarse e fenómenos o investigaciones científicas, o bien asociada a un escenario sobrenatural o imaginario. (Abrahams P. y col 2003).
- **Espectrofotometría:** Es la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe o transmite un sistema químico en función de la

longitud de onda; es el método de análisis óptico más usado en investigaciones químicas y bioquímicas. (Abrahams P. y col 2003).

- **Método:** Modo de decir o hacer con orden. Procedimiento que se sigue en las ciencias para hallar la verdad y enseñarla. (Abrahams P. y col 2003).
- **Microbiólogo:** Persona que profesa la microbiología o tiene en ella especiales conocimientos. (Raffensperger, E. y col 2002).
- **Neurotóxico:** Se dice de las sustancias que inhiben o alteran gravemente las funciones del sistema nervioso. (Abrahams P. y col 2003).
- **Patógeno:** Que origina y desarrolla una enfermedad. (Raffensperger, E. y col 2002).
- **Píxeles:** Son los puntos de color (siendo la escala de grises una gama de color monocromática). Las imágenes se forma como una sucesión de píxeles. La sucesión marca la coherencia de la información presentada, siendo su conjunto una matriz coherente de información para el uso digital. (Abrahams P. y col 2003).
- **Prototipo:** Es un ejemplar o primer molde en que se fabrica una figura u otra cosa. (Raffensperger, E. y col 2002).
- **Susceptibilidad:** Cualidad de susceptible. (Raffensperger, E. y col 2002).
- **Toxicidad:** Grado de efectividad de una sustancia tóxica. (Raffensperger, E. y col 2002).
- **Tóxico:** Pertenciente o relativo a un veneno o toxina. U. t. c. s. m. (Raffensperger, E. y col 2002).
- **Variación:** Acción y efecto de variar. Cada uno de los subconjuntos del mismo número de elementos de un conjunto dado, que difieren entre sí por algún elemento o por el orden de estos. (Abrahams P. y col 2003).

Tabla 1

Operacionalización de las variables

| Objetivos | Variable | Dimensiones | Indicador |
|--|---|---|--|
| <p>Obtener la matriz y aplicar los perfiles unidimensionales de las colonias</p> | <p>Diseñar la matriz y los gráficos unidimensional (1D) de cada una de las colonias</p> | <p>Matriz Gráficos</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Diseñar la matriz 60x60 • Seleccionar datos de fila horizontal y columna vertical de la matriz. • Gráficos de dispersión. |
| <p>Evaluar los valores de máximos y mínimos; y diferencia de ambos de cada colonia</p> | <p>Procesar datos de los valores de máximos y mínimos; y diferencia de ambos, junto con el perfil unidimensional de cada colonia.</p> | <p>Valores de máximos y mínimos; y diferencia de ambos.</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Seleccionar el valor máximo y mínimo de cada eje (horizontal vertical) • Sacar la diferencia de máximo y mínimos para ser graficados. |
| | | | <ul style="list-style-type: none"> • Recolectar datos de máximos y |

| | | | |
|--|---|---|--|
| <p>Comparar tabla de los valores de diferencia de máximos y mínimos, ecuación polinomial y relación porcentual del perfil unidimensional</p> | <p>Comparar valores repetitivos de la tabla para cada gráfico, según sea de la misma colonia e igual o distintos ejes</p> | <p>Tabla de análisis de los gráficos unidimensionales</p> | <p>mínimos y diferencia de ambos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Calcular el coeficiente de X6 e Intercepto Y; por medio de la ecuación polinomial. • Observar las repeticiones de los parámetros anteriormente dichas. • Sacar la relación porcentual de cada repetición horizontal con el vertical de cada colonia o ambos horizontales y ambos verticales de dos colonias. |
|--|---|---|--|

| | | | |
|--|--|--------------------------------|---|
| <p>Evaluar criterios de inclusión y exclusión porcentuales</p> | <p>Examinar resultados porcentuales para ser aceptados o rechazados.</p> | <p>Resultados porcentuales</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Examinar las repeticiones y evaluar los resultados con un margen de 10% de diferencia para ser incluidos o excluidos |
| <p>Explicar los perfiles bidimensional y tridimensional</p> | <p>Diseñar los gráficos bidimensional (2D) y tridimensional (3D) de cada una de las colonias</p> | <p>Gráficos</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Seleccionar los datos para la elaboración de los perfiles bidimensional y tridimensional. • Gráficos de barra y de línea. • Gráficos de superficie. |

Sistema de hipótesis

Se puede decir que usando el biospequelometro láser demuestra mayor regularidad y confiabilidad, aplicando métodos para su procesamiento de imágenes e interpretando sus resultados matemáticos.

CAPITULO III

Marco metodológico

Enfoque de la investigación

(Hernández S. y col, 2003) Señalan que el modelo mixto constituye el mayor nivel de integración entre los enfoques cualitativo y cuantitativo, donde ambos se combinan durante todo el proceso de investigación; el cual oscila entre los esquemas de pensamiento inductivo y deductivo, además de que por parte del investigador necesita un enorme dinamismo en el proceso.

Por consiguiente la investigación, presenta un enfoque de tipo mixto, debido a que se estudiarán variables para detectar la posible actividad que puedan presentar los microorganismos de forma cualitativa y cuantitativa para así poder medir y cuantificar los parámetros de las colonias y visualizar mejor el fenómeno del objeto de estudio.

Tipo de investigación

(Arias F. 2016). Define que una investigación explicativa se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto. En este sentido los estudios explicativos pueden ocuparse tanto de la determinación de las causas, como de los efectos,

mediante la prueba de hipótesis. Sus resultados y conclusiones constituyen el nivel más profundo de conocimientos.

De este modo la investigación es de tipo explicativa; debido a lo expuesto anteriormente, ya que cumple con todas las normativas requeridas es por eso que el estudio de estas variables se ha abordado anteriormente; la diferencia de esta investigación es que van a utilizar parámetros matemáticos para observar la regularidad y confiabilidad de las colonias.

Diseño de la investigación

(Arias F. 2016). Las investigaciones experimental es un proceso que consiste en someter a un objeto o grupo de individuos, a determinadas condiciones, estímulos o tratamientos (variable independiente) para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente).

En efecto el diseño de la investigación es experimental siendo un experimento puro por lo que deben controlar todos los factores que pudiera alterar el proceso, debido a que las variables se manipulan intencionalmente; lo que se hace es determinar los fenómenos en una situación controlada, para que posteriormente sean estudiados con claridad y así lograr el objeto de estudio.

Es por esta razón que el estudio que se llevara a cabo es a través de un diseño transeccional o transversal, es decir, que los datos se recolectan en un solo momento y en un tiempo único; en donde su único propósito es describir variables y analizar su incidencia en un momento dado, es por esta razón que involucra una investigación de tipo exploratoria.

Población y muestra

Población

(Arias F. 2016). La población o en términos más precisos población objetivo, es un conjunto finito o infinito de elementos con características comunes para las cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación. Ésta queda delimitada por el problema y por los objetivos del estudio.

En este trabajo de investigación la población son los microorganismos a estudiar.

Muestra

(Arias F. 2016). La muestra es un subconjunto representativo y finito que se extrae de la población accesible.

- ✓ *Candida albicans*
- ✓ *Candida tropicalis*
- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Escherichia coli* cepa DH
- ✓ *Escherichia coli* cepa GY

Sistema de variables

Las variables según su naturaleza es cuantitativa discreta, ya que se va a utilizar ciertos microorganismos para su estudio en la investigación; pero a su vez son cualitativas debido a que se va emplear la técnica de biospeckle

dinámico para observar la posible actividad que ellos puedan presentar al realizar las pruebas preliminares.

Tipo de variables:

Variable dependiente: regularidad y confiabilidad de las colonias.

Variable independiente: resultados porcentuales para cuantificar los parámetros de la colonia.

Instrumento de recolección de datos

En este trabajo de investigación se tomó como instrumento de recolección de datos los fotogramas obtenidos del biospequelometro, descrito anteriormente por otros autores.

Procedimiento o metodología

Protocolo de trabajo

Denominación (Speckle)

Este speckle presenta las siguientes características: laser de 1mw, distancia 49 cm, lentes 6 cm, distancia focal 42 cm, cámara webcam 25 fps.

Diseño del experimento

En este experimento se utilizaron capsulas de Petri con Agar Muller Hinton (AMH), su preparación fue la siguiente:

1. Suspender 37 g del polvo en 1 litro de agua purificada.
2. Dejar embeber de 10 a 15 minutos.
3. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para disolución total.
4. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
5. Enfriar a 45°-50°C y distribuir en placas de Petri estériles, en volumen apropiado para que el espesor sea de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).

Luego se sembrando en cada capsula de Petri las muestras correspondiente que en este caso seria los cinco microorganismos anteriormente dichos en la sección de Población y Muestras, dejando una capsula con el agar para su posterior análisis, estos microorganismos se cultivaron a 37° C en un máximo de 24 horas. El control de la densidad óptica y su equivalencia con el recuento de microorganismos (UFC/mL) se realizó con frecuencia mediante diluciones seriadas de 1/10 y se empleó en Mueller Hinton Agar. Se utilizó una cámara Neubauer para el recuento de levaduras y para la medición de las dimensiones de las células en un microscopio invertido Nikon TMS.

Prototipo de biospequelometro

El prototipo fue construido dentro de una caja de acero inoxidable que estaba forrada en el interior con espumoso, un material aislante negro mate, suave y acústico. La caja se coloca sobre una mesa anti vibratoria, especialmente diseñada para este propósito. Tres punteros láser, azul, verde y rojo,

potencia de salida máxima $<5\text{mW}$ fueron dispuestos dentro de la caja de acero inoxidable. El láser azul tiene una longitud de onda de 405nm , el láser verde tiene una longitud de onda de 532nm y el láser rojo tiene una longitud de onda de 650nm . Cada láser fue modificado eliminando la batería y conectándola a un adaptador AC/DC con una entrada $110\text{V AC}/60\text{Hz}$ y una salida $6\text{V DC } 300\text{mA}$. También se adaptó un interruptor a cada láser para que pudieran encenderse y apagarse desde el exterior de la caja de acero inoxidable. El prototipo tiene tres cámaras. Cada cámara Microsoft Lifecam 1080 y 720p se fijó en 30cm con un ángulo de 60° en la placa VDRL. Más tarde, se agregó un sensor CMOS USB CCD 5MP (cámara I-Home) que se fijó perpendicular a 5 cm de la muestra. La muestra se introduce en una placa VDRL que se mueve libremente dentro y fuera. Las cámaras se conectaron a una computadora que soporta el software de la cámara y se utilizaron alternativamente. Tanto la computadora como los láseres están conectados a un UPS AVTEK Modelo BK-600 VA-PF=0.5 $115\text{V AC}/60\text{Hz } 300\text{w}$ para supresión de sobretensiones y regulación de voltaje. En este trabajo solo se utilizó el láser verde en videos de 5 a 30 segundos. Los videos fueron tomados con la cámara como se especifica en el modo Blanco y Negro. Los videos fueron procesados por Diferencias Temporales con ImageJ y por Diferencias Generalizadas con ImageDP [Grassi et al 2016]. Para el Método de Diferencias Temporales, se utilizaron dos enfoques para calcular la Intensidad: Imagen de Referencia Constante (CRI) e Imagen de Referencia Variable (VRI). Se selecciona un conjunto de fotogramas consecutivos, generalmente once. CRI es una imagen formada por la suma de las diferencias de cada fotograma con respecto al primero. VRI es una imagen formada por la suma de las diferencias de cada fotograma respecto al anterior. En ambos casos se forma una nueva imagen. El método de Intensidad de las Diferencias Temporales es el promedio de cada una de las imágenes finales formadas. (Grassi C. et al 2022)

Teniendo los fotogramas, se procedió a tomar un sector con el siguiente protocolo utilizado:

1. File>open
2. Edit>selection>specify width 60 height 60 xcoordinate 783 ycoordinate 672
3. Image>crop
4. Image>transform>image to results>edit>copy

Finalmente son copiados estos valores en el programa de Excel y así proceder a los análisis matemáticos correspondientes y desarrollo del mismo experimento.

Programas utilizados y secuencia de pasos

Como se describió anteriormente, luego de haber transformado los valores a Excel, se utilizó una matriz de 60 x 60 pixel. Esta matriz está formada por 60 datos (pixel) en el eje horizontal (filas) que están enumeradas desde Y0 hasta Y59 y 60 datos (pixel) en eje vertical (columnas) con una enumeración desde X1 hasta X60. Para cada microorganismo se tomaron 2 videos con su respectiva identificación y 1 video para el agar teniendo como resultados 11 matrices.

Sección unidimensional (1D)

Primeramente se tomó la matriz (60 x 60) del Agar Mueller Hinton como base de nuestro experimento para luego proceder a realizar la realización de las ecuaciones horizontal y vertical, seleccionando y tomando como punto de referencia las coordenadas en Y29 hasta el último número de la fila en el

caso del eje horizontal; y X29 hasta el último número de la columna siendo este en eje vertical. Se aplicó la herramienta de insertar>grafico>dispersión para así obtener el perfil que deseamos a analizar. En este grafico primeramente vamos a observar cómo es la dispersión de los puntos, así como el valor o punto máximo y mínimo de la curva que se observa en la gráfica para luego sacar la diferencia de ambos valores.

Ejemplo:

Agar Mueller Hinton (AMH) Y29 Horizontal Agar Mueller Hinton (AMH) Y29 Vertical

Val máximo – val mínimo = Diferencia Val máximo – val mínimo = Diferencia

$$186 - 144 = 42$$

$$188 - 165 = 23$$

Estos mismos cálculos se hicieron para todos los microorganismos presentes en este experimento. Posteriormente se elaboró otro gráfico mostrando estos valores de diferencia junto con los valores de máximos y mínimos de cada una de las colonias, queriendo probar que con la relación matemática hay una regularidad de las colonias.

En este mismo orden, con los perfiles se calculó la ecuación en tendencia polinomial, seleccionando el grafico>agregar elemento de grafico>línea de tendencia> más opciones>polinomial y así se obtuvieron los valores del Intercepto en Y, el coeficiente de X6 siendo este el valor de mayor potencia, para poder hacer una comparación matemática de varias colonias en diferentes microorganismos en referencia al Agar Mueller Hinton (AMH)

Con estos datos (máximos mínimos, diferencia, coeficiente X6 y el Intercepto Y) se elaboró una tabla con todos los pasos anteriormente dichos, observando que si hay repeticiones con un rango de diferencia de 20 unidades por lo que se compara el valor horizontal con el vertical de cada colonia o ambos horizontales y ambos verticales de dos colonias, así como también de diferentes colonias del mismo microorganismo, acotando que los valores de máximos son los que mayormente tiene más repeticiones

parecidas entre ellos. Para tener un mejor resultado, es decir más confiabilidad y menos variabilidad se saca la relación porcentual de cada una de estas repeticiones.

Ejemplo:

Agar Mueller Hinton (AMH) Máximos

$$\text{Max V} - \text{Max H} = 188 - 186 = 2 / \text{Val mayor} \times 100$$

$$= 2/188 = 0,01063 \times 100 = 1,06\%$$

Estos cálculos matemáticos se hicieron para cada una de las repeticiones de la tabla y para cada una de las columnas en comparación con la numeración de las filas. Tomando en cuenta que para tener criterios de inclusión y exclusión en estos datos porcentuales se debe tener un margen de error de un 10% para ser aceptados o rechazados, ya que al dar un valor superior a éste no son valores exactos para cuantificar los parámetros de las colonias.

Sección bidimensional (2D)

En esta etapa del experimento con los mismos datos de la matriz de Excel de cada colonia, se procede a tomar los datos del eje horizontal desde Y30 hasta Y59 y del eje vertical desde X0 hasta X59, para luego realizar las gráficas en barra y en línea correspondiente con esta etapa. Se aplicó la herramienta de insertar>grafico>barra y luego el mismo procedimiento pero grafico de línea. Este mismo procedimiento se hizo para cada una de las colonias de estudio en este experimento. En esta etapa con estos gráficos vamos a observar su continuidad en los gráficos de barra y discontinuidad en los gráficos de línea ya que se observa líneas una encima de otras.

Sección tridimensional (3D)

En ésta última etapa del experimento igual como en las etapas anteriores los datos se tomaron de la matriz en Excel pero se seleccionaron todos los datos, es decir, 60 horizontal x 60 vertical. Se aplicó la herramienta de insertar>grafico>superficie, este proceso se hizo de la misma manera para cada colonia. Y así obtener el grafico en tercera dimensión para poder decidir si hay continuidad y discontinuidad entre las colonias.

Diseño de análisis

(Hernández S. y col, 2003). Señalan que la estadística descriptiva es describir los datos, los valores o las puntuaciones obtenidas para cada variable; la cual consiste en la primera tarea.

Evidentemente en este trabajo de investigación, el tipo de estadística empleada es la de tipo descriptiva para cada variable; para ello se plantearon incógnitas, entre ellas tenemos: ¿Cómo describir los datos obtenidos a partir de la muestra seleccionada?, esto se logra al describir la distribución de las puntuaciones o frecuencias de cada variable.

En este trabajo de investigación se empleó una distribución de frecuencia en el que consiste en un conjunto de puntuaciones respecto a una variable ordenada en sus respectivas categorías y generalmente se presenta como una tabla; también empleándose otros elementos de la distribución de frecuencias, agregando frecuencias relativas siendo los porcentajes de casos en cada categoría

Las distribuciones de frecuencia también se pueden graficar como polígonos de frecuencia, estos polígonos relacionan las puntuaciones con

sus respectivas frecuencias, por lo tanto es propio de un nivel de medición por intervalos o razón.

(Hernández S. y col, 2003). El análisis mediante pruebas estadísticas en las hipótesis planteadas, consiste en un análisis estadístico inferencial. En este caso se analizan las hipótesis a la luz de pruebas estadísticas que es necesario explicarlas detalladamente.

Por consiguiente, en este trabajo de investigación también se empleó una estadística de tipo inferencial; es decir de la muestra a la población.

Con frecuencia, el propósito de la investigación va más allá de describir las distribuciones de las variables: se pretende probar la hipótesis y generalizar los resultados obtenidos en la muestra a la población o universo. Los datos casi siempre se recolectan de una muestra sus resultados estadísticos se denominan “estadígrafos”, la media o la desviación estándar de la distribución de una muestra so estadígrafos.

La interferencia de los parámetros depende de que hayamos elegido una muestra probabilística con un tamaño que asegure un nivel de significancia o significación adecuado.

Por tal motivo, una prueba de hipótesis de la estadística inferencial consiste en una proposición respecto a uno o varios parámetros, y lo que el investigador hace a través de la prueba e hipótesis es determinar si la hipótesis poblacional es congruente con los datos obtenidos en la muestra. Por lo tanto, una hipótesis se refiere como un valor aceptable del parámetro, si es consistente con los datos. Si no lo es, se rechaza (pero los datos no se descartan).

Para poder entender lo que es la prueba de hipótesis en la estadística inferencial, en esta investigación se trabajó con los siguientes parámetros: recolección de los datos en la muestra, luego se calculó los estadígrafos, después se hizo la interferencia de los parámetros mediante técnicas

estadísticas apropiadas para determinar regularidad en las colonias en presencia de microorganismo usando la técnica de biospeckle láser.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Sección unidimensional

Figura 1 Perfil unidimensional del Agar Mueller Hinton

Figura 1.1. Perfil horizontal en pixel Y29 del Agar Mueller Hinton

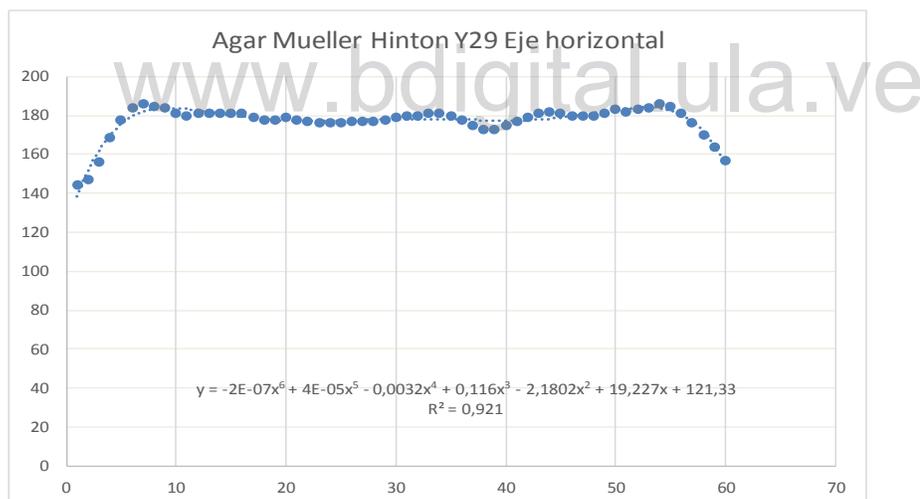


Figura 1.2. Perfil vertical en pixel X29 del Agar Mueller Hinton

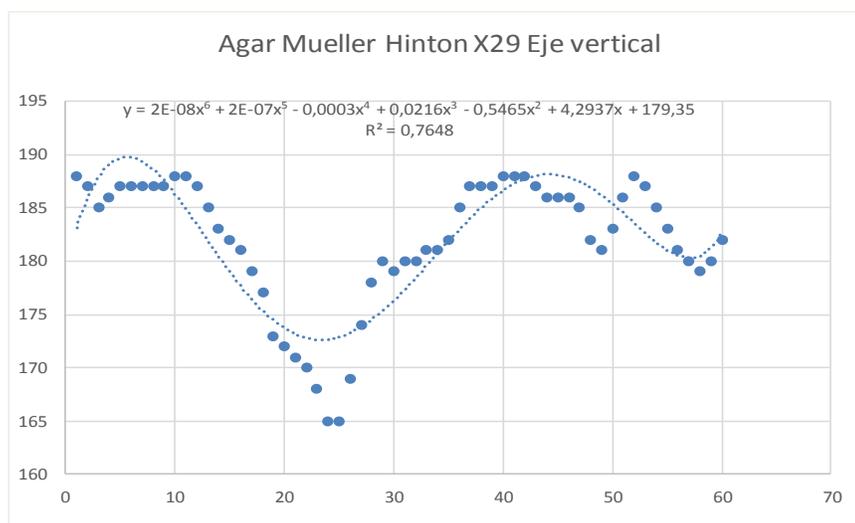


Tabla 2.

Análisis del perfil (Figuras 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b) del Agar MH y las colonias de *S. aureus* de los gráficos unidimensionales desde el punto de vista de Máximos – Mínimos, diferencias, coeficientes de X6 y el Intercepto en Y

| Cepa | Número asignado | Máximo | Mínimo | Diferencia | X6 Val abs (10 ⁻⁸ X6) | Y Intercepto |
|-----------------------------------|-----------------|--------|--------|------------|--|-----------------|
| Número asignado → | (Figura) ↓ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Agar MH L. verde Horizontal | 1 (1a) | #186 | 144 | 42 | -2E-07 20 | 121,33 |
| Agar MH L. verde Vertical | 2 (1b) | #188 | 165 | 23 | 2E-08 X6 2 | 179,35 |
| S a L. verde 42119 | 3 (2a) | #208 | 104 | 104 | 1E-07 X6 10 | 255,62 |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|--------|------|----|-----|------------------|--------|
| Horizontal | | | | | | |
| S a L. verde 42119 Vertical | 4 (2b) | #209 | 51 | 158 | -8E-07 X6 80 | 160,02 |
| S a L. verde 9401 Horizontal | 5 (3a) | 182 | 74 | 108 | 3E-07 X6 30 | 121,64 |
| S a L. verde 9401 Vertical | 6 (3b) | 210 | 73 | 137 | 6E-07 X6 60 | 183,02 |

Se reporta la diferencia en términos porcentuales (%) respecto al valor mayor en cada caso. Se compara el valor horizontal con el vertical de cada colonia o ambos horizontales y ambos verticales de dos colonias, para cada una de las columnas de la 1 a la 5. Para la comparación se utiliza la numeración de las filas, por ejemplo: 1 con 2; 3 con 4; 5 con 6; 3 con 5; 4 con 6. En las siguientes tablas se hace de la misma manera. Se reporta solamente los resultados que son menores o iguales al 10%. **Resultados de la comparación en la columna 1: Fila 1 con 2: 1.06%; 3 con 4: 0, 48%; 4 con 6: 0,48%. Resultados de la comparación en la columna 2: Fila 5 con 6: 1,35%. Resultados de la comparación en la columna 3: Fila 3 con 5: 3,7%.**

Figura 2. Representación de máximos y mínimos del perfil horizontal (H) y vertical (V) del Agar Mueller Hinton (AMH) y *Staphylococcus aureus* (Sa)

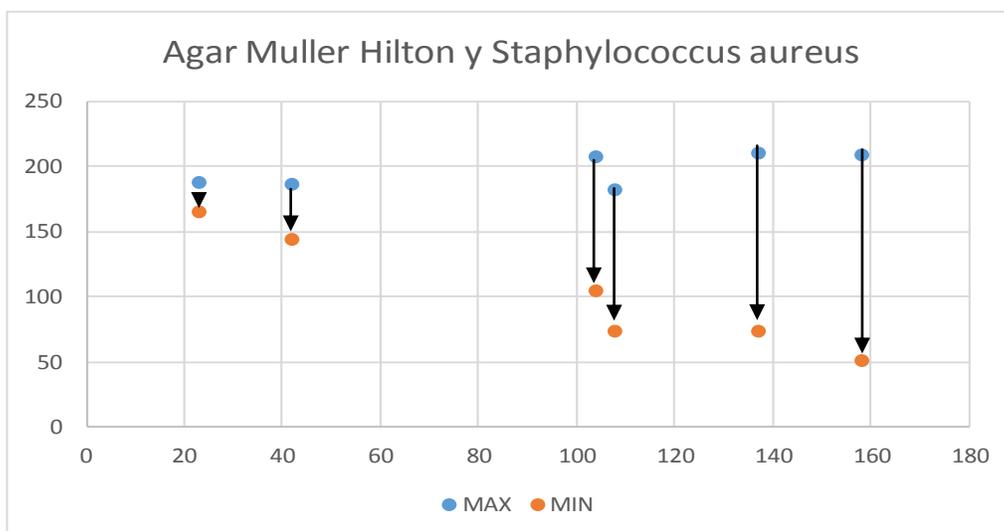


Figura 2. Representación de máximos y mínimos del perfil horizontal (H) y vertical (V) del Agar Mueller Hilton (AMH) *Staphylococcus aureus* (Sa) Azules: Máximos; Rojos: Mínimos; Flechas: Diferencias. De izquierda a derecha: 1. AMH (V); 2. AMH (H); 3. Sa 42119 (H); 4. Sa 9401 (H); 5. Sa 9401 (V) 6. Sa 42119 (V).

Tabla 3.

Análisis del perfil (Figuras 4a, 4b, 5a, 5b, 6a, 6b, 7a, 7b) de las colonias de *C. Albicans* y las colonias de *C. tropicalis* de los gráficos unidimensionales desde el punto de vista de Máximos – Mínimos, diferencias, coeficientes de X6 y el Intercepto en Y

| Cepa | Número asignado | Máximo | Mínimo | Diferencia | X6 Val abs (10 ⁻⁸ X6) | Y Intercepto |
|--|-----------------|--------|--------|------------|--|-----------------|
| Número asignado | (Figura) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| C a L. verde 52033 Horizontal | 1 (4a) | #214 | 57 | 157 | -3E-07 X6 30 | 50,476 |
| C a L. verde 52033 Vertical | 2 (4b) | #221 | 71 | 150 | 6E-07 X6 60 | 120,48 |
| C a L. verde 23585 Horizontal | 3 (5a) | #218 | 186 | 32 | 6E-08 X6 6 | 194,51 |
| C a L. verde 23585 Vertical | 4 (5b) | #219 | 123 | 96 | 1E-07 X6 10 | 190,15 |
| C t L. verde 52906 Horizontal | 5 (6a) | #199 | 166 | 33 | 1E-07 X6 10 | 188,08 |
| C t L. verde 52906 Vertical | 6 (6b) | #190 | 168 | 22 | -4E-08 X6 4 | 188.94 |
| C t L. verde 42128 | 7 (7a) | #203 | 152 | 51 | -3E-07 X6 30 | 175,14 |

| | | | | | | |
|--------------------------------------|--------|------|-----|----|------------------|--------|
| Horizontal | | | | | | |
| C t L. verde 42128 Vertical | 8 (7b) | #205 | 139 | 66 | -2E-07 X6 20 | 168,16 |

Se reporta la diferencia en términos porcentuales (%) respecto al valor mayor en cada caso. Se compara el valor horizontal con el vertical de cada colonia o ambos horizontales y ambos verticales de dos colonias, para cada una de las columnas de la 1 a la 5. Para la comparación se utiliza la numeración de las filas, por ejemplo: 1 con 2; 3 con 4; 5 con 6; 7 con 8; 2 con 1; 2 con 4; 3 con 1; 4 con 3; 5 con 7; 6 con 5; 7 con 5; 7 con 8; 8 con 6; 8 con 7. En las siguientes tablas se hace de la misma manera. Se reporta solamente los resultados que son menores o iguales al 10%. **Resultados de la comparación en la columna 1: Fila 5 con 6: 4,53%; 2 con 1: 3,17%; 2 con 4: 0,91%; 3 con 1: 1,84%; 4 con 3: 0,46%; 7 con 5: 1,97%; 8 con 6: 7,32%; 8 con 7: 0,98%. Resultados de la comparación en la columna 2: Fila 5 con 7: 8,43; 6 con 5: 1,19%; 7 con 8: 8,55%. Resultados de la comparación en la columna 3: Fila 1 con 2: 4,46%. Resultados de la comparación en la columna 5: Fila 3 con 4: 2,24%; 5 con 7: 6,88%; 6 con 5: 0,46%; 7 con 8: 3,99%.**

Figura 3. Representación de máximos y mínimos del perfil horizontal (H) y vertical (V) de las colonias de *Candida albicans* (Ca) y *Candida tropicalis* (Ct)

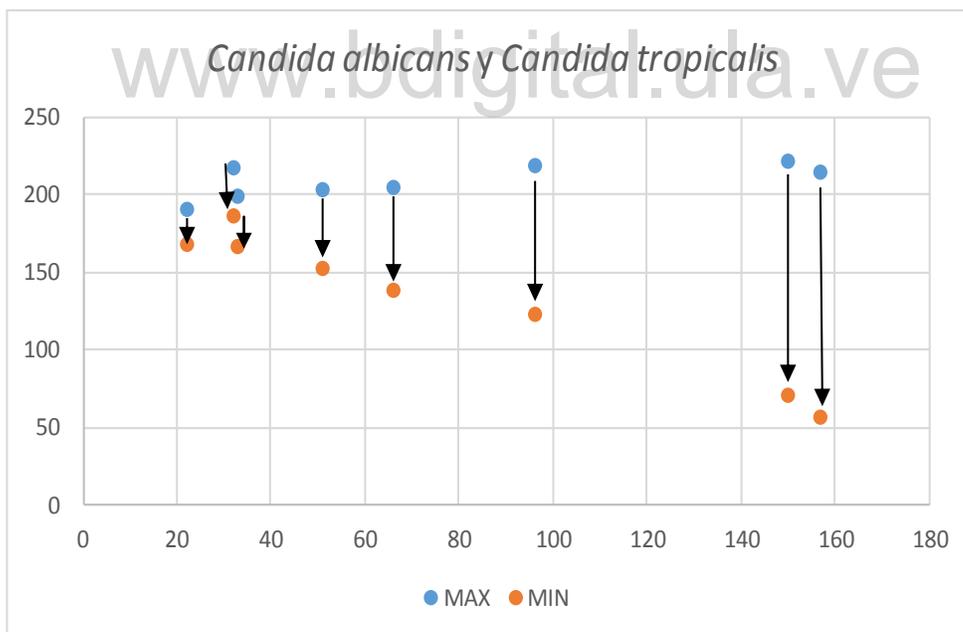


Figura 3. Representación de máximos y mínimos del perfil horizontal (H) y vertical (V) de las colonias de *Candida albicans* (Ca) y *Candida tropicalis* (Ct) Azules: Máximos; Rojos: Mínimos; Flechas: Diferencias. De izquierda a derecha: 1. Ct 52906 (V); 2. Ca 23585 (H); 3. Ct 52906 (H); 4. Ct 42128 (H); 5. Ct 42128 (V); 6. Ca 23585 (V); 7. Ca 52033 (V); 8. Ca 52033 (H)

Tabla 4.

Análisis del perfil (Figuras 8a, 8b, 9a, 9b, 10a, 10b, 11a, 11b) de las colonias de *E. coli* cepas DH y GY de los gráficos unidimensionales desde el punto de vista de Máximos – Mínimos, diferencias, coeficientes de X6 y el Intercepto en Y

| Cepa | Números asignados | Máximo | Mínimo | Diferencia | X6 Val abs (10 ⁻⁸ X6) | Y Intercepto |
|---|-------------------|--------|--------|------------|--|-----------------|
| Números asignados → | (Figura) ↓ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| E c DH L. verde 18172 Horizontal | 1 (8a) | #193 | 168 | 25 | -8E-10 X6 0,08 | 193,6 |
| E c DH L. verde 18172 Vertical | 2 (8b) | #189 | 174 | 15 | -9E-09 X6 0,9 | 181,63 |
| E c DH 46393 L. verde Horizontal | 3 (9a) | #193 | 173 | 20 | -5E-08 X6 5 | 189,39 |
| E c DH 46393 L. verde Vertical | 4 (9b) | #194 | 160 | 34 | 5E-08 X6 5 | 202,02 |
| E c GY L. verde 9863 Horizontal | 5 (10a) | #214 | 101 | 113 | -2E-07 X6 20 | 120 |
| E c GY L. verde 9863 Vertical | 6 (10b) | #196 | 45 | 151 | -6E-08 X6 6 | 111,16 |
| E c GY L. verde 34943 | 7 (11a) | #212 | 141 | 71 | 4E-08 X6 4 | 169,24 |

| | | | | | | |
|--|---------|------|-----|----|-----------------|--------|
| Horizontal | | | | | | |
| Ec GY L. verde 34943 Vertical | 8 (11b) | #197 | 118 | 79 | -6E-08 X6 6 | 114,31 |

Se reporta la diferencia en términos porcentuales (%) respecto al valor mayor en cada caso. Se compara el valor horizontal con el vertical de cada colonia o ambos horizontales y ambos verticales de dos colonias, para cada una de las columnas de la 1 a la 5. Para la comparación se utiliza la numeración de las filas, por ejemplo: 1 con 2; 3 con 4; 5 con 6; 7 con 8; 1 con 3; 2 con 1; 2 con 4; 3 con 1; 4 con 2; 4 con 3; 5 con 7; 6 con 8; 8 con 6; 8 con 7. En las siguientes tablas se hace de la misma manera. Se reporta solamente los resultados que son menores o iguales al 10%. **Resultados de la comparación en la columna 1: Fila 1 con 2: 2,07%; 5 con 6: 8,41%; 7 con 8: 7,07%; 1 con 3: 0%; 4 con 2: 2,58%; 4 con 3: 0,52%; 5 con 7: 0,94%; 8 con 6: 0,52%.** **Resultados de la comparación en la columna 2: Fila 3 con 4: 7,52%; 2 con 1: 3,45%; 2 con 4: 8,05%; 3 con 1: 2,89%.** **Resultados de la comparación en la columna 3: Fila 8 con 7: 10,13%.** **Resultados de la comparación en la columna 4: Fila 3 con 4: 0%; 6 con 8: 0%.** **Resultados de la comparación en la columna 5: Fila 5 con 6: 7,37%; 1 con 2: 6,18%; 1 con 3: 2,18%; 4 con 2: 10,09%; 4 con 3: 6,25%; 8 con 6: 2,76%.**

Figura 4. Representación de máximos y mínimos del perfil horizontal (H) y vertical (V) de las colonias de *Escherichia coli* cepas DH y GY

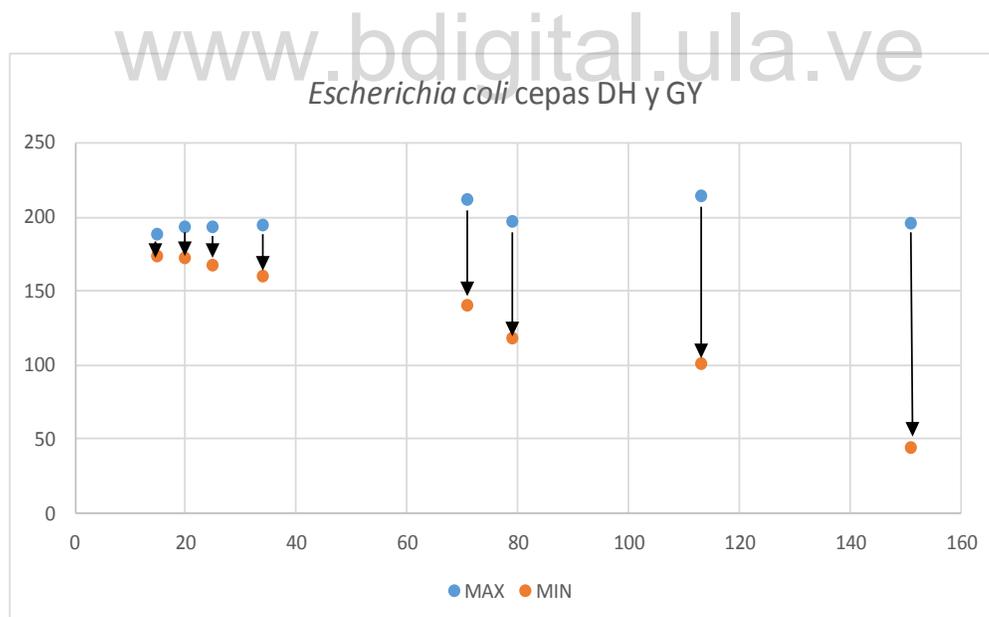


Figura 4. Representación de máximos y mínimos del perfil horizontal (H) y vertical (V) de las colonias de *Escherichia coli* (Ec) para la cepas DH y GY: Azules: Máximos; Rojos: Mínimos; Flechas: Diferencias. De izquierda a derecha: 1. Ec DH 18172 (V); 2. Ec DH 46393 (H); 3. Ec DH 18172 (H); 4. Ec DH 46393 (V); 5. Ec GY 34943 (H); 6. Ec GY 34943 (V); 7. Ec GY 9863 (H); 8. Ec GY 9863 (V), respetando las abreviaturas de las diferentes cepas.

Se observa en el cuadro de diferencia los criterios de inclusión y exclusión porcentuales, tomando como referencia aquellos resultados por debajo del 10%, acotando que aquellos valores por encima de este rango no son exactos para cuantificar los parámetros de las colonias. Por tanto, se demuestra que hay mayor regularidad de las colonias en los resultados de la columna de los máximos, las demás columnas (mínimos, diferencia, coeficiente X6 y el Intercepto Y), algunos de sus resultados no entran en el criterio de inclusión por reflejar valores por encima del 10%. Los perfiles unidimensionales de las colonias de *Staphylococcus aureus* se encuentran en los anexos del presente trabajo de investigación.

Por tal motivo se concluye que esta sección unidimensional observa el comportamiento de las colonias demostrando ser un excelente método para ver la variabilidad, confiabilidad y regularidad de las colonias, siendo los otros métodos más complejos y más variables; el sistema matemático puede ser abordado pero no es materia de este trabajo de investigación; por lo que si se observa diferencia tanto en 1D como en 2D y 3D, pero las diferencias son más complejas de manejar.

Sección bidimensional

Figura 5. Perfil bidimensional del Agar Mueller Hinton

Figura 5.1 Perfil bidimensional en grafico de barra

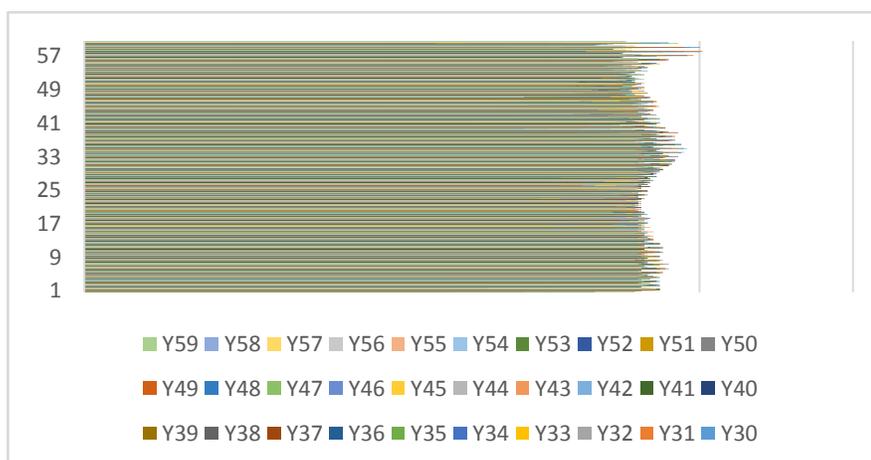


Figura 5.1 Perfil bidimensional (grafico de barra) del fotograma del Agar Mueller Hinton, usando las coordenadas de la matriz desde 0 al 59 en el “eje vertical” y desde 30 al 59 en el “eje horizontal” del Agar Mueller Hinton

Figura 5.2 Perfil bidimensional en grafico de línea

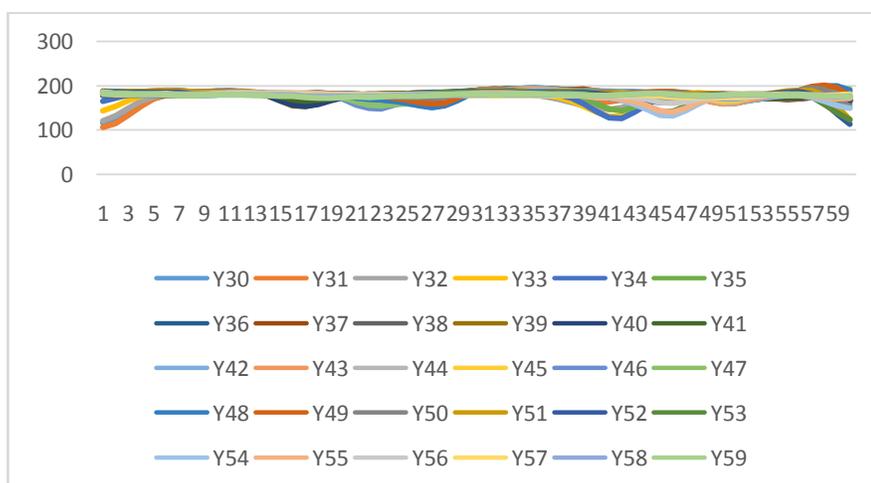


Figura 5.2 Perfil bidimensional (grafico de línea) del fotograma del Agar Mueller Hinton, usando las coordenadas de la matriz desde 0 al 59 en el “eje vertical” y desde 30 al 59 en el “eje horizontal” del Agar Mueller Hinton

Figura 6. Perfil bidimensional de la colonia *Staphylococcus aureus* 42119

Figura 6.1 Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de *Staphylococcus aureus* 42119

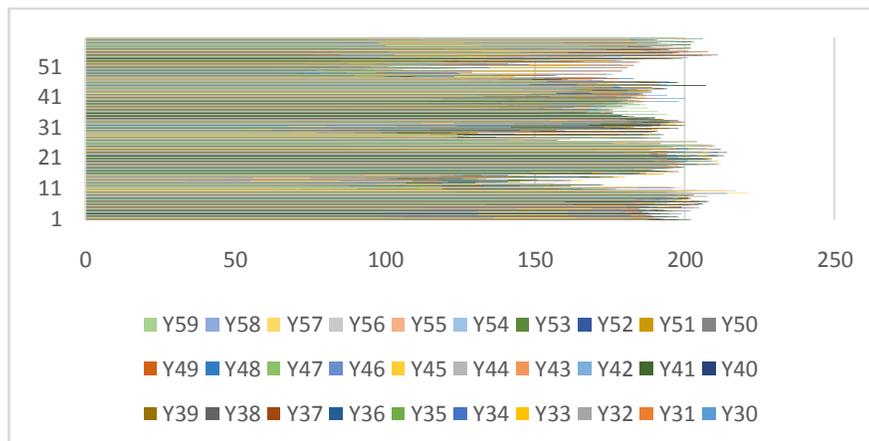


Figura 6.1 Perfil bidimensional (grafico de barra) del fotograma de la colonia de *Staphylococcus aureus* 42119, usando las coordenadas de la matriz desde 0 al 59 en el “eje vertical” y desde 30 al 59 en el “eje horizontal” del *Staphylococcus aureus*.

Figura 6.2 Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de *Staphylococcus aureus* 42119

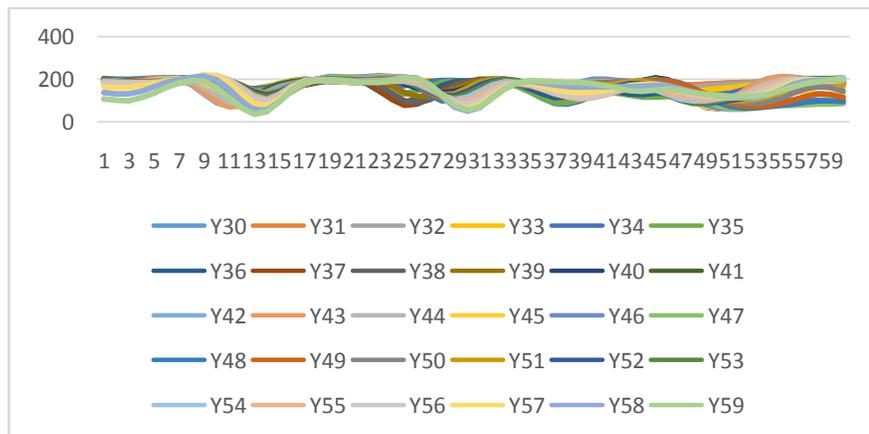


Figura 6.2 Perfil bidimensional (grafico línea) del fotograma de la colonia de *Staphylococcus aureus* 42119, usando las coordenadas de la matriz desde 0 al 59 en el “eje vertical” y desde 30 al 59 en el “eje horizontal” del *Staphylococcus aureus*.

Figura 7. Perfil bidimensional de la colonia *Staphylococcus aureus* 9401

Figura 7.1 Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de *Staphylococcus aureus* 9401

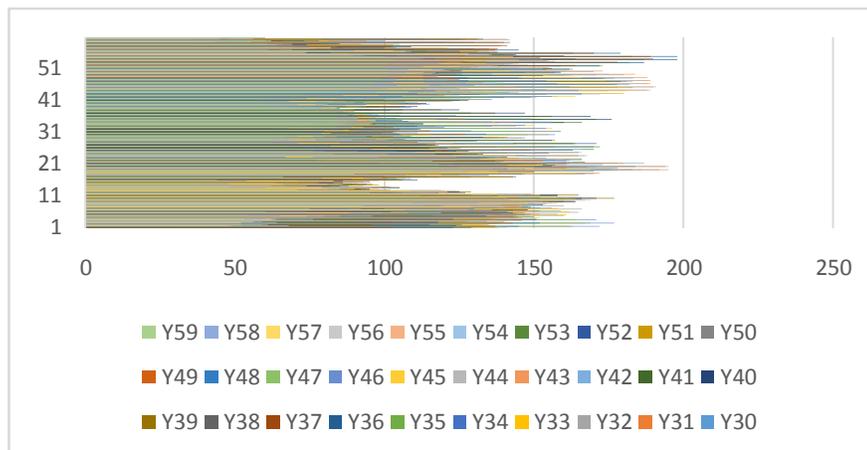


Figura 7.1 Perfil bidimensional (grafico de barra) del fotograma de la colonia de *Staphylococcus aureus* 9401, usando las coordenadas de la matriz desde 0 al 59 en el “eje vertical” y desde 30 al 59 en el “eje horizontal” del *Staphylococcus aureus*.

Figura 7.2 Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de *Staphylococcus aureus* 9401

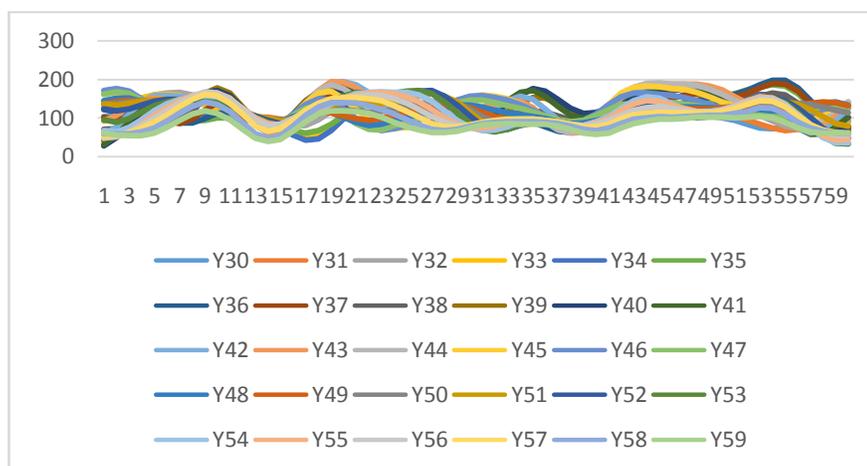


Figura 7.2 Perfil bidimensional (grafico de línea) del fotograma de la colonia de *Staphylococcus aureus* 9401, usando las coordenadas de la matriz desde 0 al 59 en el “eje vertical” y desde 30 al 59 en el “eje horizontal” del *Staphylococcus aureus*

Se puede concluir en esta sección bidimensional que en los gráficos de barra solo el agar Muller Hinton cumple una función continua, dejando que cada sitio se exprese por su lado mientras que en los demás microorganismos no se comporta de la misma manera; y que en los gráficos de línea se comporta de forma irregular impidiendo que tenga una secuencia entre ellas por lo tanto están en forma discontinua

Sección tridimensional

Figura 8. Perfil tridimensional del Agar Mueller Hinton

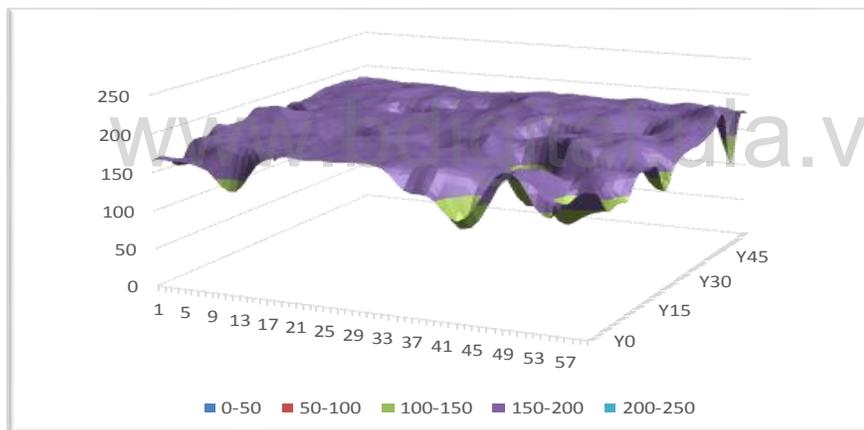


Figura 8. Perfil tridimensional del fotograma del Agar Mueller Hinton, usando las coordenadas de la matriz desde 1 al 60 en el “eje X” y desde 1 al 60 en el “eje Y” del Agar Mueller Hinton.

Figura 9. Perfil tridimensional de la colonia de *Staphylococcus aureus* 42119

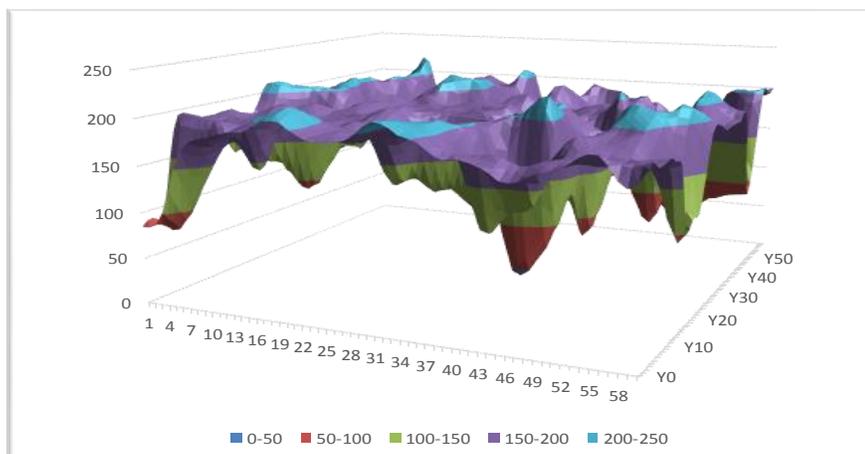


Figura 9. Perfil tridimensional del fotograma de la colonia de *Staphylococcus aureus* 42119, usando las coordenadas de la matriz desde 1 al 60 en el “eje X” y desde 1 al 60 en el “eje Y” del *Staphylococcus aureus*

Figura 10. Perfil tridimensional de la colonia de *Staphylococcus aureus* 9401

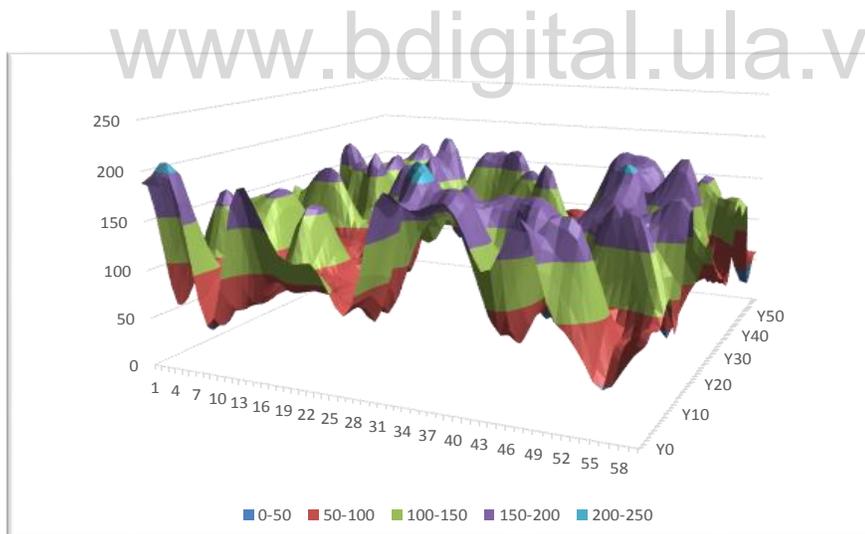


Figura 10. Perfil tridimensional del fotograma de la colonia de *Staphylococcus aureus* 9401, usando las coordenadas de la matriz desde 1 al 60 en el “eje X” y desde 1 al 60 en el “eje Y” del *Staphylococcus aureus*

En esta sección se concluye que existe discontinuidad en las colonias, observando diferencia en los picos tanto en la altura como en el grosor, por lo tanto en esta sección no hay confiabilidad al haber mayor variabilidad

siendo estos dos últimos métodos más complejos; por lo que se puede decir que el sistema matemático puede ser abordado pero no es materia de este trabajo de investigación.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este trabajo de investigación se realizó con un prototipo siendo un dispositivo tecnológico para el análisis y detección de microorganismos, al ser utilizado accesorios de bajo costo y de fácil acceso para su diseño. Permitiendo el uso de procesamiento de imágenes en cámaras Webcam para tomar los fotogramas o videos requeridos en el estudio cuyo procesamiento se basó en la utilización de las siguientes herramientas de video en el que los videos fueron procesados por Diferencias Temporales con ImageJ y por Diferencias Generalizadas con ImageDP. Se seleccionó un conjunto de fotogramas consecutivos, generalmente once. En ambos casos se forma una nueva imagen.

Se debe destacar que en este trabajo de investigación se realizó en tres partes o secciones, teniendo una misma matriz de datos para cada microorganismo; obteniendo que en la sección unidimensional (1D) al realizarle tendencia polinomial y cálculos matemáticos porcentuales se demuestra que estos microorganismos de estudio presentan regularidad numérica y confiabilidad en el uso de este dispositivo electrónico.

Para las secciones bidimensional (2D) y tridimensional (3D), solo se enfocó en los fotogramas y sus respectivos gráficos, siendo estos métodos más complejos y más variables; el sistema matemático puede ser abordado pero no es materia de este trabajo de investigación; que si se observa diferencia tanto en 1D como en 2D y 3D, pero las diferencias son más complejas de manejar.

Por lo tanto la evaluación de las colonias en este prototipo mostró el potencial para el análisis desde un punto de vista cuantitativo teniendo buena sensibilidad a bajas intensidades de Biospeckle

RECOMENDACIONES

Se recomienda la utilización de este prototipo de estudio por ser un dispositivo tecnológico, ya que con pocos accesorios de bajo costo y de fácil acceso se puede dar uso a este equipo. Se sugiere que al momento de realizar los videos no generar ningún tipo de ruido o vibraciones ya que estos interfieren con el análisis y procesamientos de cada uno de los videos.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Abrahams, P. y col (2003). *Gran atlas Mc MINN de Anatomía humana*. Océano grupo editorial, S.A. Barcelona, España. 60, 99, 110, 140, 160, 200.
- Abche, S. (2015). *Utilización del sistema mejorado de procesamiento de imágenes de biospeckle en ensayos con bacterias y diferentes antibióticos*. (Tesis de maestría). Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Andrades, F. (2011). *Diseño, elaboración y ejecución para el procesamiento de Imágenes de Biospeckle por el Método Matemático de las Diferencias Temporales*. (Tesis de grado). Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Arias, F. (2016). *El proyecto de investigación: Introducción a la metodología científica* (pp. 37-41). (7ª ed.). Caracas. Episteme.
- Arrieche, A. (2016). *Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de biospeckle a ensayos de Trypanosoma cruzi en viales de cultivo profundo*. (Tesis de grado). Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Balmages, I., Liepins, J., Zolins S., Bliznuks, D., Lihacova, I., Lihachev, A. (2021, Marzo 01). *Laser speckle imaging for early detection of microbial colony forming units*. Biomedical Optics Express, Vol. 12, No. 3
- Belandria, O. (2011). *Evaluación comparativa de la Quimiotaxis y el antibiograma con el método Biospeckle sobre bacterias*. (Trabajo de maestría), Universidad de Los Andes, Mérida Venezuela.
- Braun, B. et al. (2011). *A human curated annotation of the candida albicans genome*. *Revista Plos genet*, 1, (1), 36 – 57.

- Briceño, M. y Ángel, A. (2013). *Detección de la presencia de bacterias por biospeckle: Métodos de atenuación del láser*. (Tesis de grado). Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Briers, J. y Webster, S. (1996). *Laser speckle contrasted analysis: a non-scanning, full technique for monitoring capillary blood flow*. J. Biomed. Opt. [Revista en línea], 1:174-179.
- Contreras, R. (2016). *Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de Biospeckle a ensayos con Trypanosoma cruzi: prueba preliminar de fármacos*. (Tesis de grado). Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Díaz k. y Gallego K. (2013) *Utilización del sistema dinámico "Biospeckle" para medir el efecto de ciprofloxacina sobre Escherichia coli cepa 322 K12* (Trabajo de Grado) Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- García, L. (2010). *Evaluación comparativa del ensayo de fármacos desenergizantes sobre Trypanosoma cruzi, usando laser "Especkle" dinámico y otras técnicas de bioensayo*. (Tesis de grado), Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela
- González, J. y col. (2011). *Estudio cualitativo de la actividad biológica en una muestra celular mediante el método de biospeckle*. Universidad de Valencia (España). 30 – 33.
- Gould, G. (1957). *Desarrollo de sus propias ideas para la fabricación de un láser*. Universidad de Columbia (USA). 12.
- Grassi HC., Andrades, E., Lorena, M. y Andrades, J. (2022). *A prototype of biospecklemeter for microbiological analysis: A starting point for a potential digital- image laser an antibiotic susceptibility test (Dilast)*. Laser Physics
- Grassi, HC, Garcia, LC, Lobo-Sulbaran, ML, Velasquez, A, Andrades-Grassi, FA, Cabrera, H, Andrades-Grassi, JE, Andrades, EDJ (2016). *Quantitative Laser Biospeckle Method for the Evaluation of the Activity of Trypanosoma cruzi using VDRL plates and Digital analysis*. Plos

- Negl, Trop. Diseases, 10 (12): 1-26 e0005169.doi: 101371/journal.pntd.0005169.
- Grassi, HC, Velásquez, A, Belandria, OM, Lobo-Sulbaran, ML, Andrades-Grassi, JE, Cabrera, H, Andrades, EDJ (2019). *Biospeckle Laser Digital Image Processing for Quantitative and Statistical Evaluation of the Activity of Ciprofloxacin on Escherichia coli K-12*. Laser Physics, 29, 7: 1-15. 075603. <https://doi.10.1088/1555-6611/ab21d8>.
- Griffin, K. (2015). *Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de biospeckle a ensayos de Trypanosoma cruzi bajo diferentes condiciones: método de imagen de diferencias acumuladas de base variable*. (Tesis de grado). Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Hernández, S. y col. (2003). *Metodología de la investigación*. Editorial Mc Graw-Hill Internacional.
- Krone, C. et al. (2001). *Does gastrointestinal candida albicans prevent ubiquinone absorption*. Med Hypotheses, 57, (5), 570 – 572.
- Lobo, L. (2011). *Estrategias para evaluar la actividad biológica de fármacos comensales sobre Trypanosoma cruzi*. (Tesis de maestría). Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Maiman, T. (1960). *Stimulated optical Radiation in ruby* Revista Nature, 187, 493 -494.
- Méndez, R. (2015). *Aplicaciones biotecnológicas para el diagnóstico microbiológico: modificaciones de variable del método de Biospeckle*. (Trabajo de postgrado) Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Moreno, N. (2015). *Variables que inciden en la detección de la actividad de bacterias por Biospeckle*. (Tesis de maestría). Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Muñoz, O. (2015). *Uso del prototipo de Biospeckle para evaluar la actividad bacteriana en muestras de orina de pacientes con infecciones del tracto urinario en el área de emergencia adultos del IAHULA en el*

- periodo comprendido Mayo/Junio 2015.* (Tesis de maestría).
Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Murray, P. (2009). *Microbiología Médica* (5a ed.). España: Mosby (Elsevier Science).
- Podesta, M. (2.002). *Understanding the properties of matter.*(USA). 131.
- Pomarico, J. et al (2004). *Speckle interferometry applied to pharmacodynamic studies: evaluation of parasite motility.* Eur Bophys J. 33, 694-699.
- Raffensperger, E. y col (2002). *Manual de la enfermería.* Océano grupo editorial, S.A. Barcelona, España. 150, 160, 215, 235, 250, 260.
- Ramírez, E., Cabrera, H., Grassi, H., Andrades, E., Otero, I., Rodríguez, D., Darias, J. (2017, Junio 07). *Digital imaging information technology for biospeckle activity assessment relative to bacteria and parasites.* Lasers Med Sci, DOI 10.1007/s10103-017-2256-0
- Ramírez, E., Martí, L., y Contreras, O. (2011). *Dos configuraciones diferentes para la descripción temporal de actividad de Escherichia coli mediante Speckle dinámico.* Revista Mexicana de Física. Volumen (57), pp. 445-446.
- Reyes, A. (2.011). *Escherichia coli.* España. 10 – 32.
- Tortora, G. y col. (2007). *Microbios en nuestras vidas. Introducción a la microbiología.* 9,2.

ANEXOS

Figura 11.

Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para el Agar Mueller Hinton. Se resalta las columnas y las filas que se escogieron para hacer el perfil unidimensional para el eje horizontal (fila) y eje vertical (columna).

Para todos los otros resultados se hizo de la misma manera.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 106 | 108 | 108 | 107 | 108 | 107 | 105 | 105 | 102 | 102 | 102 | 106 | 106 | 105 | 109 | 112 | 119 | 133 | 135 | 137 | 137 | 142 | 142 | 145 | 146 | 147 | 146 | 146 | 147 | 148 | 148 | 149 | 149 | 150 | 150 | 151 | 151 | 152 | 152 | 153 | 153 | 154 | 154 | 155 | 155 | 156 | 156 | 157 | 157 | 158 | 158 | 159 | 159 | 160 | 160 | 161 | 161 | 162 | 162 | 163 | 163 | 164 | 164 | 165 | 165 | 166 | 166 | 167 | 167 | 168 | 168 | 169 | 169 | 170 | 170 | 171 | 171 | 172 | 172 | 173 | 173 | 174 | 174 | 175 | 175 | 176 | 176 | 177 | 177 | 178 | 178 | 179 | 179 | 180 | 180 | 181 | 181 | 182 | 182 | 183 | 183 | 184 | 184 | 185 | 185 | 186 | 186 | 187 | 187 | 188 | 188 | 189 | 189 | 190 | 190 | 191 | 191 | 192 | 192 | 193 | 193 | 194 | 194 | 195 | 195 | 196 | 196 | 197 | 197 | 198 | 198 | 199 | 199 | 200 | 200 | 201 | 201 | 202 | 202 | 203 | 203 | 204 | 204 | 205 | 205 | 206 | 206 | 207 | 207 | 208 | 208 | 209 | 209 | 210 | 210 | 211 | 211 | 212 | 212 | 213 | 213 | 214 | 214 | 215 | 215 | 216 | 216 | 217 | 217 | 218 | 218 | 219 | 219 | 220 | 220 | 221 | 221 | 222 | 222 | 223 | 223 | 224 | 224 | 225 | 225 | 226 | 226 | 227 | 227 | 228 | 228 | 229 | 229 | 230 | 230 | 231 | 231 | 232 | 232 | 233 | 233 | 234 | 234 | 235 | 235 | 236 | 236 | 237 | 237 | 238 | 238 | 239 | 239 | 240 | 240 | 241 | 241 | 242 | 242 | 243 | 243 | 244 | 244 | 245 | 245 | 246 | 246 | 247 | 247 | 248 | 248 | 249 | 249 | 250 | 250 | 251 | 251 | 252 | 252 | 253 | 253 | 254 | 254 | 255 | 255 | 256 | 256 | 257 | 257 | 258 | 258 | 259 | 259 | 260 | 260 | 261 | 261 | 262 | 262 | 263 | 263 | 264 | 264 | 265 | 265 | 266 | 266 | 267 | 267 | 268 | 268 | 269 | 269 | 270 | 270 | 271 | 271 | 272 | 272 | 273 | 273 | 274 | 274 | 275 | 275 | 276 | 276 | 277 | 277 | 278 | 278 | 279 | 279 | 280 | 280 | 281 | 281 | 282 | 282 | 283 | 283 | 284 | 284 | 285 | 285 | 286 | 286 | 287 | 287 | 288 | 288 | 289 | 289 | 290 | 290 | 291 | 291 | 292 | 292 | 293 | 293 | 294 | 294 | 295 | 295 | 296 | 296 | 297 | 297 | 298 | 298 | 299 | 299 | 300 | 300 | 301 | 301 | 302 | 302 | 303 | 303 | 304 | 304 | 305 | 305 | 306 | 306 | 307 | 307 | 308 | 308 | 309 | 309 | 310 | 310 | 311 | 311 | 312 | 312 | 313 | 313 | 314 | 314 | 315 | 315 | 316 | 316 | 317 | 317 | 318 | 318 | 319 | 319 | 320 | 320 | 321 | 321 | 322 | 322 | 323 | 323 | 324 | 324 | 325 | 325 | 326 | 326 | 327 | 327 | 328 | 328 | 329 | 329 | 330 | 330 | 331 | 331 | 332 | 332 | 333 | 333 | 334 | 334 | 335 | 335 | 336 | 336 | 337 | 337 | 338 | 338 | 339 | 339 | 340 | 340 | 341 | 341 | 342 | 342 | 343 | 343 | 344 | 344 | 345 | 345 | 346 | 346 | 347 | 347 | 348 | 348 | 349 | 349 | 350 | 350 | 351 | 351 | 352 | 352 | 353 | 353 | 354 | 354 | 355 | 355 | 356 | 356 | 357 | 357 | 358 | 358 | 359 | 359 | 360 | 360 | 361 | 361 | 362 | 362 | 363 | 363 | 364 | 364 | 365 | 365 | 366 | 366 | 367 | 367 | 368 | 368 | 369 | 369 | 370 | 370 | 371 | 371 | 372 | 372 | 373 | 373 | 374 | 374 | 375 | 375 | 376 | 376 | 377 | 377 | 378 | 378 | 379 | 379 | 380 | 380 | 381 | 381 | 382 | 382 | 383 | 383 | 384 | 384 | 385 | 385 | 386 | 386 | 387 | 387 | 388 | 388 | 389 | 389 | 390 | 390 | 391 | 391 | 392 | 392 | 393 | 393 | 394 | 394 | 395 | 395 | 396 | 396 | 397 | 397 | 398 | 398 | 399 | 399 | 400 | 400 | 401 | 401 | 402 | 402 | 403 | 403 | 404 | 404 | 405 | 405 | 406 | 406 | 407 | 407 | 408 | 408 | 409 | 409 | 410 | 410 | 411 | 411 | 412 | 412 | 413 | 413 | 414 | 414 | 415 | 415 | 416 | 416 | 417 | 417 | 418 | 418 | 419 | 419 | 420 | 420 | 421 | 421 | 422 | 422 | 423 | 423 | 424 | 424 | 425 | 425 | 426 | 426 | 427 | 427 | 428 | 428 | 429 | 429 | 430 | 430 | 431 | 431 | 432 | 432 | 433 | 433 | 434 | 434 | 435 | 435 | 436 | 436 | 437 | 437 | 438 | 438 | 439 | 439 | 440 | 440 | 441 | 441 | 442 | 442 | 443 | 443 | 444 | 444 | 445 | 445 | 446 | 446 | 447 | 447 | 448 | 448 | 449 | 449 | 450 | 450 | 451 | 451 | 452 | 452 | 453 | 453 | 454 | 454 | 455 | 455 | 456 | 456 | 457 | 457 | 458 | 458 | 459 | 459 | 460 | 460 | 461 | 461 | 462 | 462 | 463 | 463 | 464 | 464 | 465 | 465 | 466 | 466 | 467 | 467 | 468 | 468 | 469 | 469 | 470 | 470 | 471 | 471 | 472 | 472 | 473 | 473 | 474 | 474 | 475 | 475 | 476 | 476 | 477 | 477 | 478 | 478 | 479 | 479 | 480 | 480 | 481 | 481 | 482 | 482 | 483 | 483 | 484 | 484 | 485 | 485 | 486 | 486 | 487 | 487 | 488 | 488 | 489 | 489 | 490 | 490 | 491 | 491 | 492 | 492 | 493 | 493 | 494 | 494 | 495 | 495 | 496 | 496 | 497 | 497 | 498 | 498 | 499 | 499 | 500 | 500 | 501 | 501 | 502 | 502 | 503 | 503 | 504 | 504 | 505 | 505 | 506 | 506 | 507 | 507 | 508 | 508 | 509 | 509 | 510 | 510 | 511 | 511 | 512 | 512 | 513 | 513 | 514 | 514 | 515 | 515 | 516 | 516 | 517 | 517 | 518 | 518 | 519 | 519 | 520 | 520 | 521 | 521 | 522 | 522 | 523 | 523 | 524 | 524 | 525 | 525 | 526 | 526 | 527 | 527 | 528 | 528 | 529 | 529 | 530 | 530 | 531 | 531 | 532 | 532 | 533 | 533 | 534 | 534 | 535 | 535 | 536 | 536 | 537 | 537 | 538 | 538 | 539 | 539 | 540 | 540 | 541 | 541 | 542 | 542 | 543 | 543 | 544 | 544 | 545 | 545 | 546 | 546 | 547 | 547 | 548 | 548 | 549 | 549 | 550 | 550 | 551 | 551 | 552 | 552 | 553 | 553 | 554 | 554 | 555 | 555 | 556 | 556 | 557 | 557 | 558 | 558 | 559 | 559 | 560 | 560 | 561 | 561 | 562 | 562 | 563 | 563 | 564 | 564 | 565 | 565 | 566 | 566 | 567 | 567 | 568 | 568 | 569 | 569 | 570 | 570 | 571 | 571 | 572 | 572 | 573 | 573 | 574 | 574 | 575 | 575 | 576 | 576 | 577 | 577 | 578 | 578 | 579 | 579 | 580 | 580 | 581 | 581 | 582 | 582 | 583 | 583 | 584 | 584 | 585 | 585 | 586 | 586 | 587 | 587 | 588 | 588 | 589 | 589 | 590 | 590 | 591 | 591 | 592 | 592 | 593 | 593 | 594 | 594 | 595 | 595 | 596 | 596 | 597 | 597 | 598 | 598 | 599 | 599 | 600 | 600 | 601 | 601 | 602 | 602 | 603 | 603 | 604 | 604 | 605 | 605 | 606 | 606 | 607 | 607 | 608 | 608 | 609 | 609 | 610 | 610 | 611 | 611 | 612 | 612 | 613 | 613 | 614 | 614 | 615 | 615 | 616 | 616 | 617 | 617 | 618 | 618 | 619 | 619 | 620 | 620 | 621 | 621 | 622 | 622 | 623 | 623 | 624 | 624 | 625 | 625 | 626 | 626 | 627 | 627 | 628 | 628 | 629 | 629 | 630 | 630 | 631 | 631 | 632 | 632 | 633 | 633 | 634 | 634 | 635 | 635 | 636 | 636 | 637 | 637 | 638 | 638 | 639 | 639 | 640 | 640 | 641 | 641 | 642 | 642 | 643 | 643 | 644 | 644 | 645 | 645 | 646 | 646 | 647 | 647 | 648 | 648 | 649 | 649 | 650 | 650 | 651 | 651 | 652 | 652 | 653 | 653 | 654 | 654 | 655 | 655 | 656 | 656 | 657 | 657 | 658 | 658 | 659 | 659 | 660 | 660 | 661 | 661 | 662 | 662 | 663 | 663 | 664 | 664 | 665 | 665 | 666 | 666 | 667 | 667 | 668 | 668 | 669 | 669 | 670 | 670 | 671 | 671 | 672 | 672 | 673 | 673 | 674 | 674 | 675 | 675 | 676 | 676 | 677 | 677 | 678 | 678 | 679 | 679 | 680 | 680 | 681 | 681 | 682 | 682 | 683 | 683 | 684 | 684 | 685 | 685 | 686 | 686 | 687 | 687 | 688 | 688 | 689 | 689 | 690 | 690 | 691 | 691 | 692 | 692 | 693 | 693 | 694 | 694 | 695 | 695 | 696 | 696 | 697 | 697 | 698 | 698 | 699 | 699 | 700 | 700 | 701 | 701 | 702 | 702 | 703 | 703 | 704 | 704 | 705 | 705 | 706 | 706 | 707 | 707 | 708 | 708 | 709 | 709 | 710 | 710 | 711 | 711 | 712 | 712 | 713 | 713 | 714 | 714 | 715 | 715 | 716 | 716 | 717 | 717 | 718 | 718 | 719 | 719 | 720 | 720 | 721 | 721 | 722 | 722 | 723 | 723 | 724 | 724 | 725 | 725 | 726 | 726 | 727 | 727 | 728 | 728 | 729 | 729 | 730 | 730 | 731 | 731 | 732 | 732 | 733 | 733 | 734 | 734 | 735 | 735 | 736 | 736 | 737 | 737 | 738 | 738 | 739 | 739 | 740 | 740 | 741 | 741 | 742 | 742 | 743 | 743 | 744 | 744 | 745 | 745 | 746 | 746 | 747 | 747 | 748 | 748 | 749 | 749 | 750 | 750 | 751 | 751 | 752 | 752 | 753 | 753 | 754 | 754 | 755 | 755 | 756 | 756 | 757 | 757 | 758 | 758 | 759 | 759 | 760 | 760 | 761 | 761 | 762 | 762 | 763 | 763 | 764 | 764 | 765 | 765 | 766 | 766 | 767 | 767 | 768 | 768 | 769 | 769 | 770 | 770 | 771 | 771 | 772 | 772 | 773 | 773 | 774 | 774 | 775 | 775 | 776 | 776 | 777 | 777 | 778 | 778 | 779 | 779 | 780 | 780 | 781 | 781 | 782 | 782 | 783 | 783 | 784 | 784 | 785 | 785 | 786 | 786 | 787 | 787 | 788 | 788 | 789 | 789 | 790 | 790 | 791 | 791 | 792 | 792 | 793 | 793 | 794 | 794 | 795 | 795 | 796 | 796 | 797 | 797 | 798 | 798 | 799 | 799 | 800 | 800 | 801 | 801 | 802 | 802 | 803 | 803 | 804 | 804 | 805 | 805 | 806 | 806 | 807 | 807 | 808 | 808 | 809 | 809 | 810 | 810 | 811 | 811 | 812 | 812 | 813 | 813 | 814 | 814 | 815 | 815 | 816 | 816 | 817 | 817 | 818 | 818 | 819 | 819 | 820 | 820 | 821 | 821 | 822 | 822 | 823 | 823 | 824 | 824 | 825 | 825 | 826 | 826 | 827 | 827 | 828 | 828 | 829 | 829 | 830 | 830 | 831 | 831 | 832 | 832 | 833 | 833 | 834 | 834 | 835 | 835 | 836 | 836 | 837 | 837 | 838 | 838 | 839 | 839 | 840 | 840 | 841 | 841 | 842 | 842 | 843 | 843 | 844 | 844 | 845 | 845 | 846 | 846 | 847 | 847 | 848 | 848 | 849 | 849 | 850 | 850 | 851 | 851 | 852 | 852 | 853 | 853 | 854 | 854 | 855 | 855 | 856 | 856 | 857 | 857 | 858 | 858 | 859 | 859 | 860 | 860 | 861 | 861 | 862 | 862 | 863 | 863 |

Figura 13.

Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para el *Staphylococcus aureus* 9401. Se resalta las columnas y las filas que se escogieron para hacer el perfil unidimensional en los ejes horizontal (fila) y eje vertical (columna).

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 90 | 188 | 192 | 196 | 197 | 195 | 170 | 133 | 75 | 50 | 60 | 92 | 137 | 174 | 191 | 193 | 178 | 163 | 146 | 132 | 127 | 124 | 126 | 127 | 119 | 104 | 88 | 80 | 81 | 91 | 122 |
| 91 | 184 | 197 | 208 | 209 | 205 | 173 | 124 | 75 | 44 | 50 | 78 | 124 | 162 | 179 | 177 | 159 | 138 | 121 | 112 | 110 | 112 | 115 | 118 | 112 | 100 | 89 | 81 | 91 | 119 | |
| 92 | 158 | 162 | 200 | 203 | 196 | 168 | 124 | 80 | 48 | 48 | 70 | 108 | 141 | 155 | 152 | 134 | 115 | 102 | 96 | 97 | 101 | 104 | 105 | 101 | 94 | 87 | 82 | 91 | 117 | |
| 93 | 116 | 145 | 166 | 174 | 171 | 153 | 123 | 88 | 58 | 50 | 63 | 91 | 116 | 127 | 124 | 111 | 98 | 90 | 88 | 90 | 93 | 94 | 94 | 91 | 87 | 84 | 82 | 92 | 116 | |
| 94 | 76 | 104 | 124 | 134 | 139 | 132 | 117 | 94 | 70 | 58 | 60 | 77 | 93 | 104 | 103 | 97 | 91 | 87 | 86 | 88 | 90 | 89 | 88 | 86 | 83 | 80 | 80 | 92 | 114 | |
| 95 | 51 | 78 | 98 | 105 | 113 | 107 | 94 | 76 | 63 | 58 | 67 | 78 | 88 | 92 | 76 | 88 | 86 | 86 | 87 | 87 | 86 | 87 | 85 | 80 | 77 | 76 | 89 | 112 | 90 | |
| 96 | 51 | 78 | 89 | 98 | 102 | 100 | 96 | 88 | 77 | 66 | 60 | 63 | 73 | 85 | 94 | 75 | 95 | 95 | 90 | 88 | 88 | 87 | 88 | 85 | 78 | 72 | 88 | 81 | 108 | |
| 97 | 53 | 71 | 85 | 92 | 94 | 91 | 88 | 82 | 75 | 67 | 58 | 61 | 71 | 86 | 99 | 104 | 101 | 95 | 91 | 92 | 95 | 99 | 88 | 84 | 73 | 63 | 78 | 93 | 100 | |
| 98 | 67 | 80 | 91 | 96 | 95 | 89 | 86 | 81 | 75 | 67 | 58 | 61 | 73 | 83 | 111 | 115 | 113 | 101 | 95 | 95 | 94 | 89 | 87 | 85 | 77 | 63 | 82 | 81 | 117 | |
| 99 | 60 | 99 | 109 | 109 | 109 | 94 | 85 | 85 | 78 | 69 | 59 | 62 | 77 | 109 | 124 | 125 | 125 | 106 | 96 | 94 | 92 | 89 | 87 | 82 | 76 | 70 | 83 | 105 | 116 | |
| 100 | 60 | 109 | 109 | 109 | 109 | 94 | 85 | 85 | 78 | 69 | 59 | 62 | 77 | 109 | 124 | 125 | 125 | 106 | 96 | 94 | 92 | 89 | 87 | 82 | 76 | 70 | 83 | 105 | 116 | |
| 101 | 115 | 125 | 132 | 134 | 131 | 121 | 107 | 87 | 86 | 71 | 62 | 64 | 81 | 113 | 144 | 137 | 147 | 112 | 103 | 98 | 94 | 91 | 87 | 81 | 74 | 64 | 80 | 102 | 123 | 139 |
| 102 | 124 | 145 | 163 | 167 | 163 | 152 | 134 | 101 | 89 | 77 | 63 | 64 | 80 | 119 | 142 | 139 | 154 | 112 | 105 | 92 | 82 | 75 | 69 | 68 | 60 | 50 | 60 | 106 | 129 | 159 |
| 103 | 124 | 142 | 162 | 162 | 162 | 151 | 137 | 105 | 95 | 82 | 68 | 63 | 76 | 104 | 137 | 137 | 156 | 115 | 112 | 101 | 92 | 80 | 72 | 61 | 50 | 34 | 78 | 111 | 144 | 164 |
| 104 | 121 | 133 | 144 | 146 | 144 | 138 | 121 | 101 | 87 | 70 | 62 | 72 | 87 | 125 | 144 | 148 | 158 | 119 | 116 | 104 | 92 | 82 | 70 | 60 | 50 | 40 | 60 | 118 | 138 | 158 |
| 105 | 121 | 132 | 136 | 137 | 135 | 130 | 116 | 100 | 86 | 70 | 63 | 72 | 87 | 120 | 135 | 135 | 153 | 119 | 119 | 109 | 93 | 85 | 78 | 65 | 57 | 45 | 67 | 111 | 137 | 155 |
| 106 | 124 | 138 | 135 | 136 | 137 | 137 | 127 | 111 | 91 | 74 | 63 | 69 | 86 | 106 | 115 | 112 | 102 | 96 | 94 | 94 | 90 | 83 | 77 | 68 | 56 | 44 | 64 | 113 | 146 | 166 |
| 107 | 135 | 139 | 140 | 140 | 143 | 143 | 134 | 113 | 89 | 68 | 60 | 63 | 75 | 87 | 92 | 91 | 87 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 |
| 108 | 130 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 | 130 | 110 | 90 | 68 | 60 | 63 | 75 | 87 | 92 | 91 | 87 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 | 80 |
| 109 | 131 | 143 | 147 | 148 | 152 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 |
| 110 | 131 | 143 | 147 | 148 | 152 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 | 153 |
| 111 | 138 | 140 | 148 | 148 | 154 | 156 | 153 | 138 | 112 | 85 | 66 | 57 | 56 | 58 | 59 | 62 | 74 | 84 | 99 | 112 | 117 | 120 | 127 | 132 | 137 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 |
| 112 | 138 | 145 | 148 | 148 | 154 | 156 | 153 | 138 | 112 | 85 | 66 | 57 | 56 | 58 | 59 | 62 | 74 | 84 | 99 | 112 | 117 | 120 | 127 | 132 | 137 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 |
| 113 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 114 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 115 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 116 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 117 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 118 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 119 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 120 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 121 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 122 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 123 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 124 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 125 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 126 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 127 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 128 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 129 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 130 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 131 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 132 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 133 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 134 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 135 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 136 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 137 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 138 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 139 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 140 | 135 | 142 | 145 | 146 | 154 | 154 | 152 | 135 | 110 | 84 | 67 | 60 | 59 | 60 | 61 | 64 | 76 | 86 | 101 | 117 | 124 | 130 | 136 | 142 | 147 | 152 | 157 | 162 | 167 | 172 |
| 141 | 135 | 142 | 145 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Figura 14 Perfil unidimensional de la colonia de *Staphylococcus aureus* 42119

Figura 14.1 Perfil horizontal en pixel Y29 de *Staphylococcus aureus* 42119

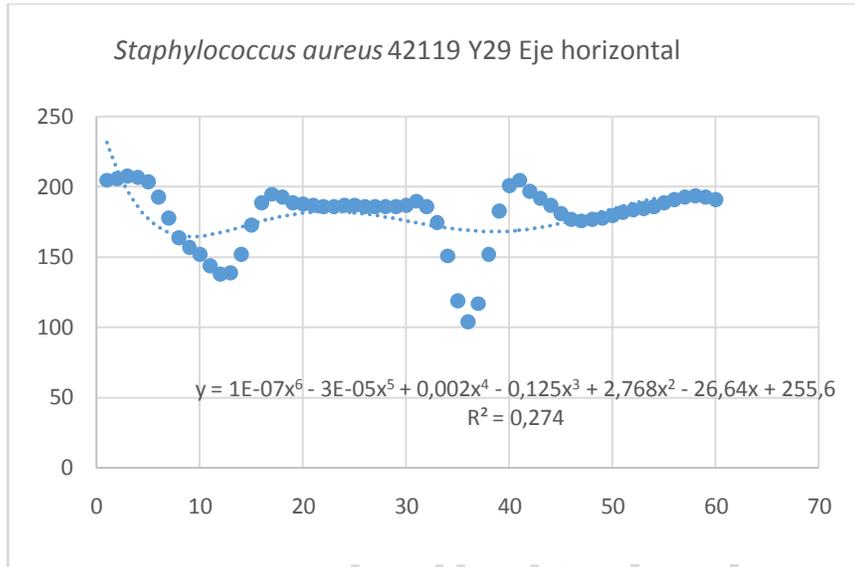


Figura 14.2 Perfil vertical en pixel X29 de *Staphylococcus aureus* 42119

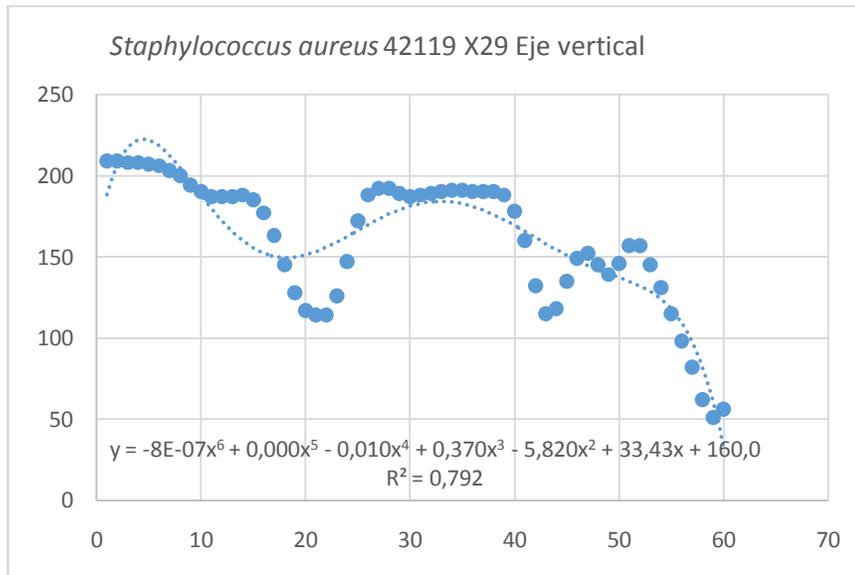


Figura 15 Perfil unidimensional de la colonia de *Staphylococcus aureus* 9401

Figura 15.1 Perfil horizontal en pixel Y29 de *Staphylococcus aureus* 9401

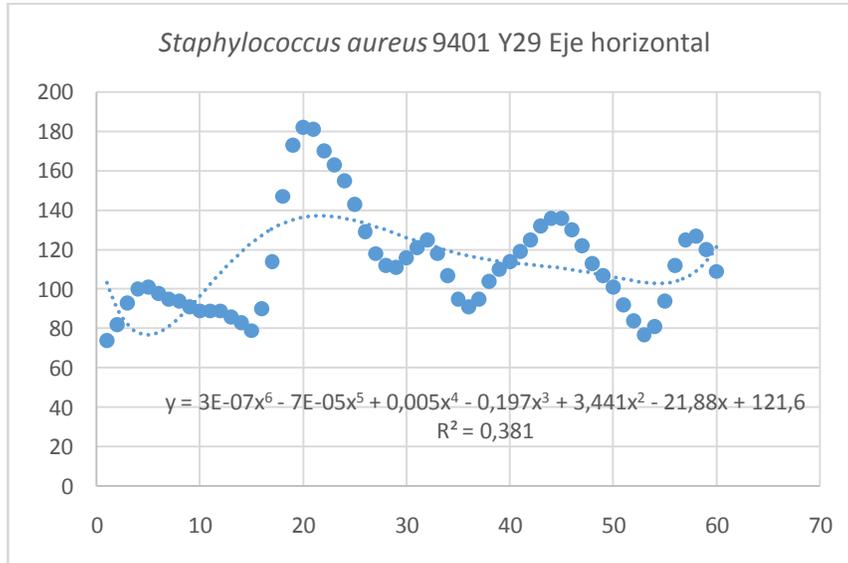


Figura 15.2 Perfil vertical en pixel X29 de *Staphylococcus aureus* 9401

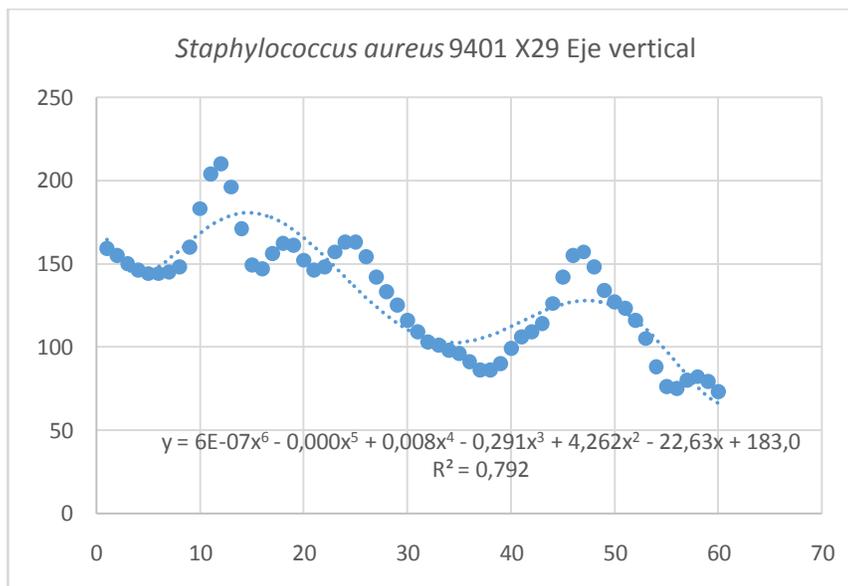


Figura 18 Perfil unidimensional de la colonia de *Candida albicans* 52033

Figura 18.1 Perfil horizontal en pixel Y29 de *Candida albicans* 52033

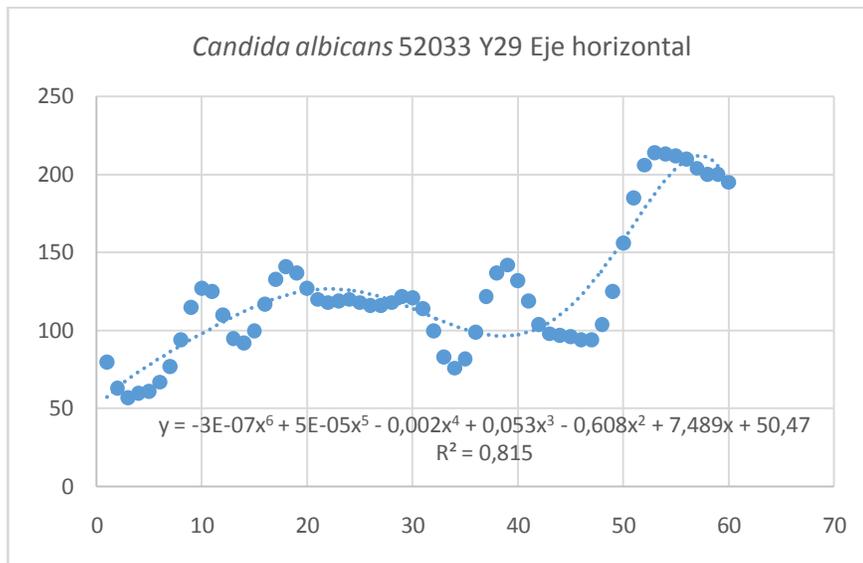


Figura 18.2 Perfil vertical en pixel X29 de *Candida albicans* 52033

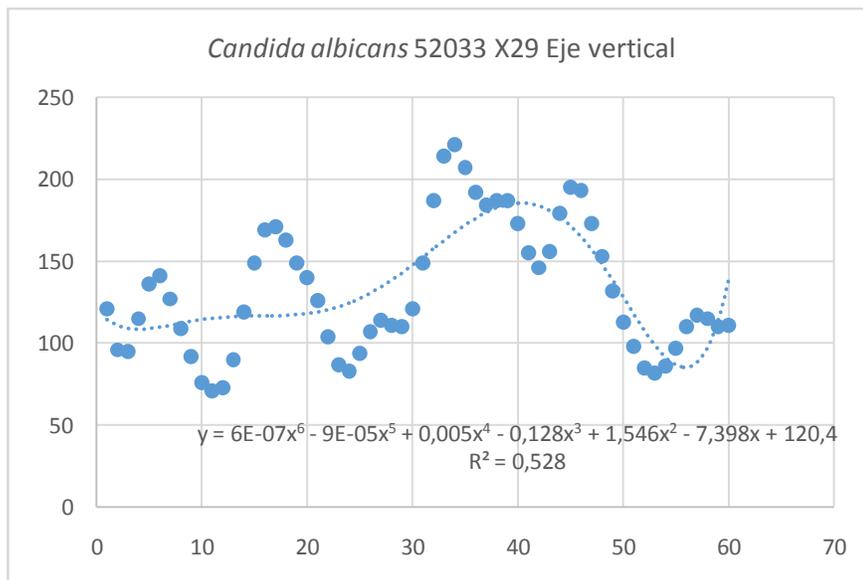


Figura 19 Perfil unidimensional de la colonia de *Candida albicans* 23585

Figura 19.1 Perfil horizontal en pixel Y29 de *Candida albicans* 23585

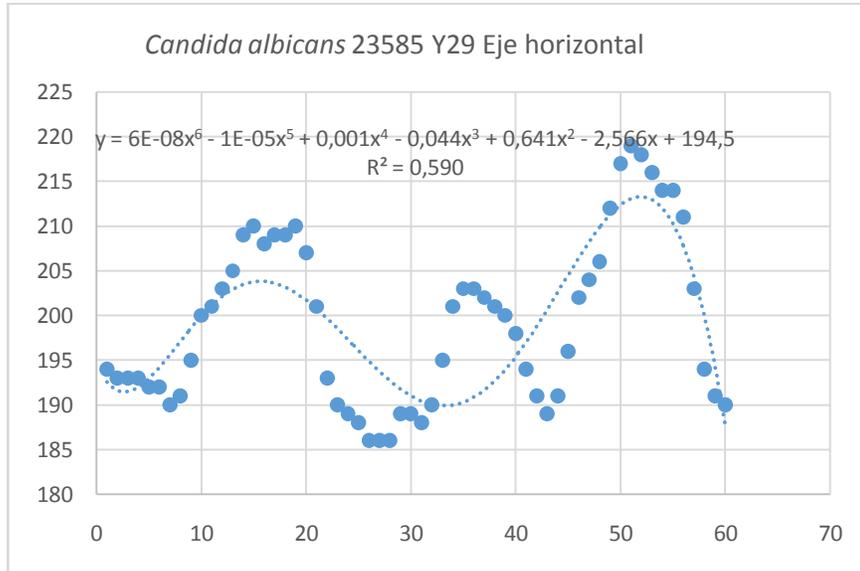


Figura 19.2 Perfil vertical en pixel X29 de *Candida albicans* 23585

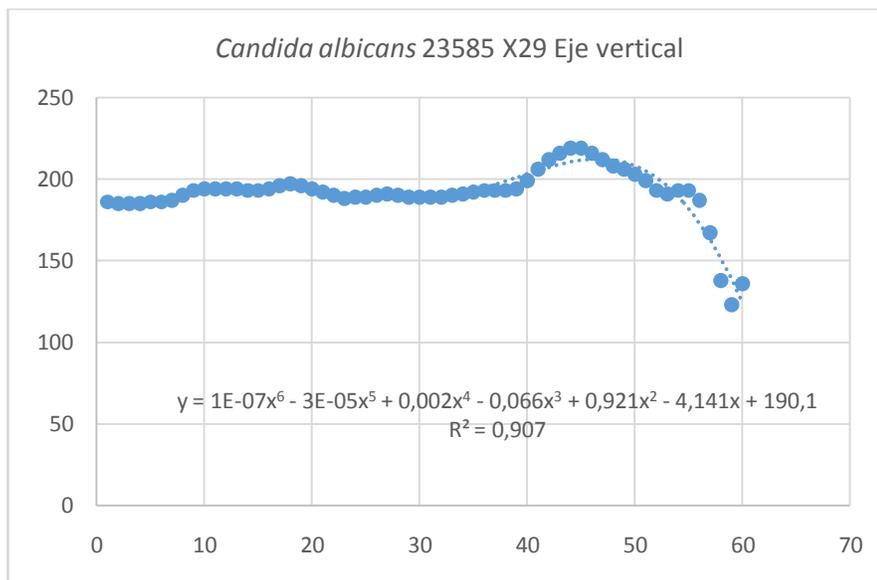


Figura 21.

Matriz (60x60) del resultado del fotograma escogido para la *Candida tropicalis* 42128. Se resalta las columnas y las filas que se escogieron para hacer el perfil unidimensional en los ejes horizontal (fila) y eje vertical (columna).

Figura 22 Perfil unidimensional de la colonia de *Candida tropicalis* 52906

Figura 22.1 Perfil horizontal en pixel Y29 de *Candida tropicalis* 52906

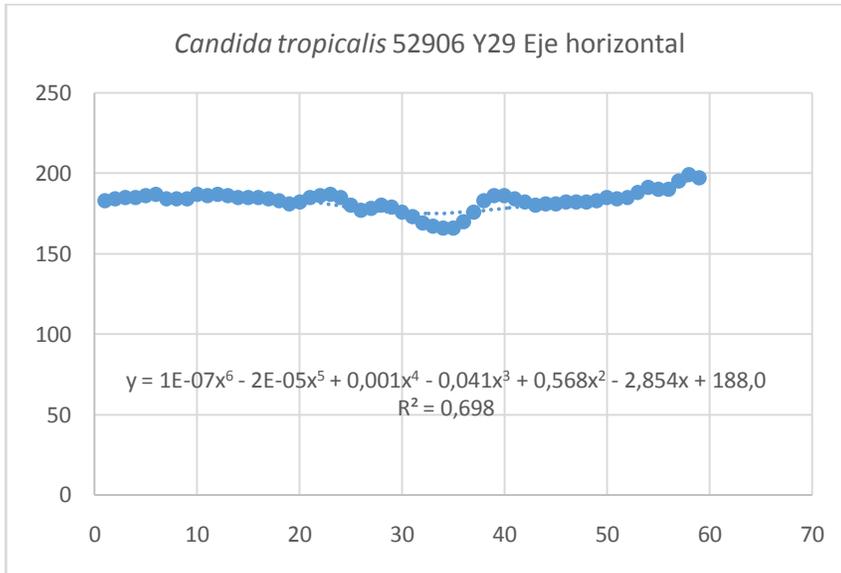


Figura 22.2 Perfil vertical en pixel X29 de *Candida tropicalis* 52906

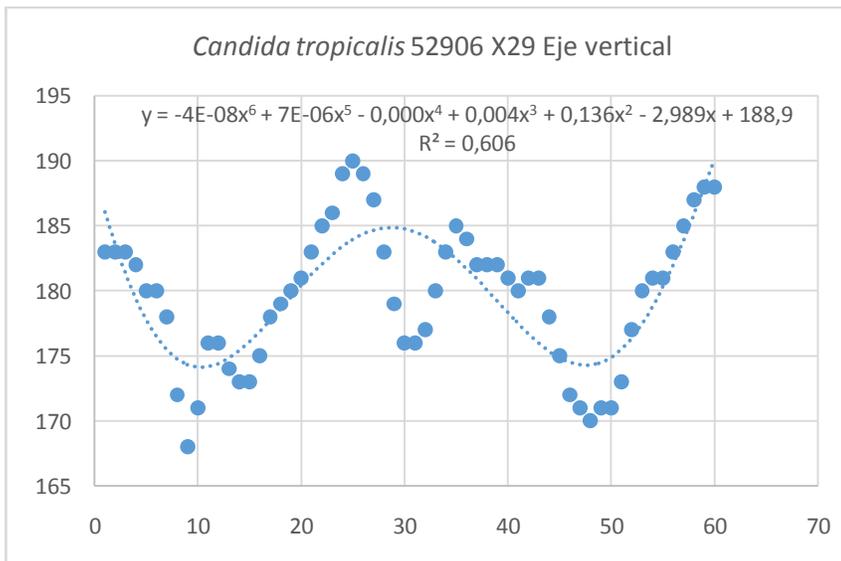


Figura 23 Perfil unidimensional de la colonia de *Candida tropicalis* 42128

Figura 23.1 Perfil horizontal en pixel Y29 de *Candida tropicalis* 42128

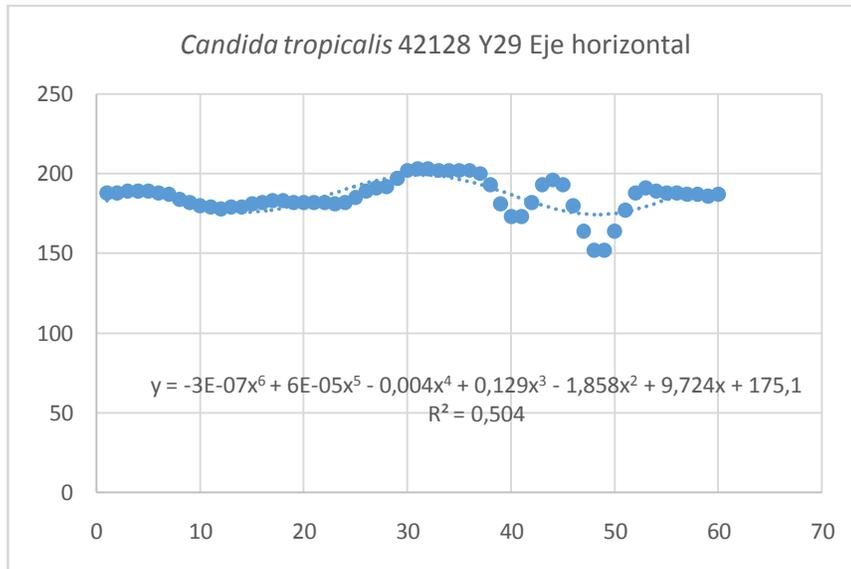


Figura 23.2 Perfil vertical en pixel X29 de *Candida tropicalis* 42128

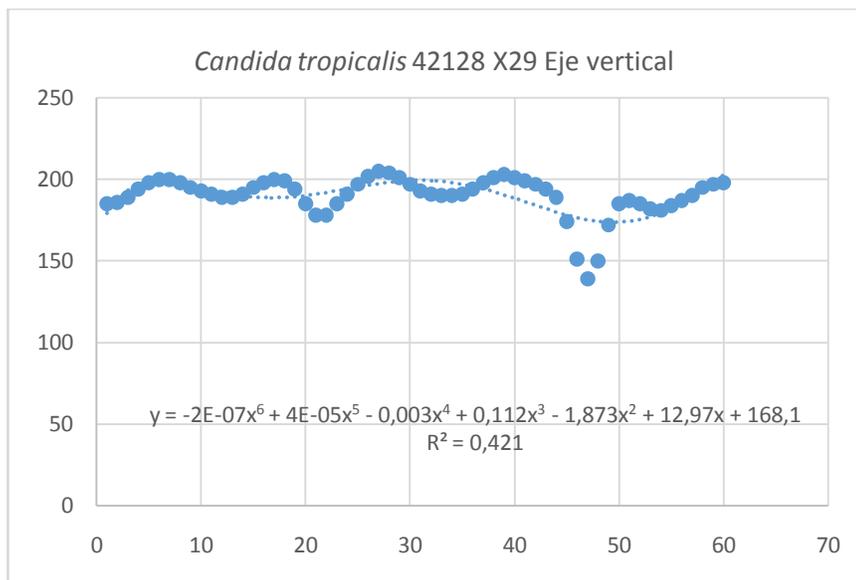


Figura 26 Perfil unidimensional de la colonia de *Escherichia coli* DH 18172

Figura 26.1 Perfil horizontal en pixel Y29 de *Escherichia coli* DH 18172

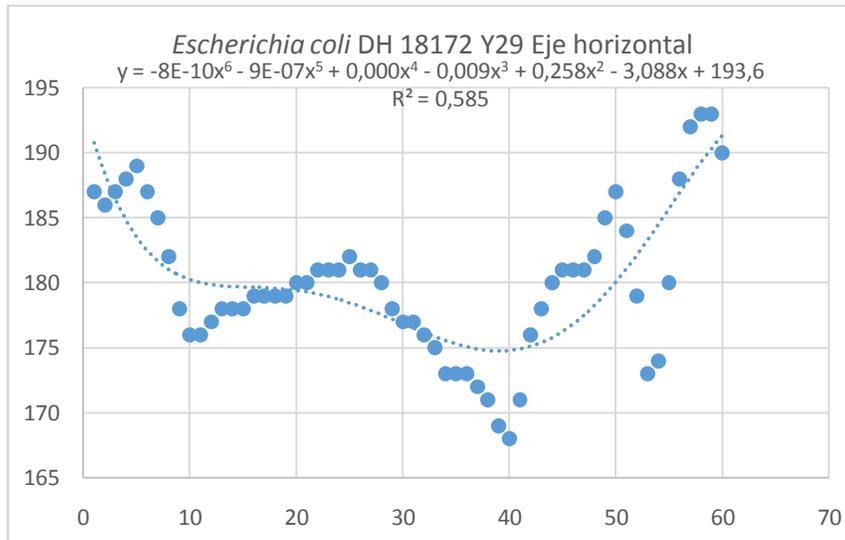


Figura 26.2 Perfil vertical en pixel X29 de *Escherichia coli* DH 18172

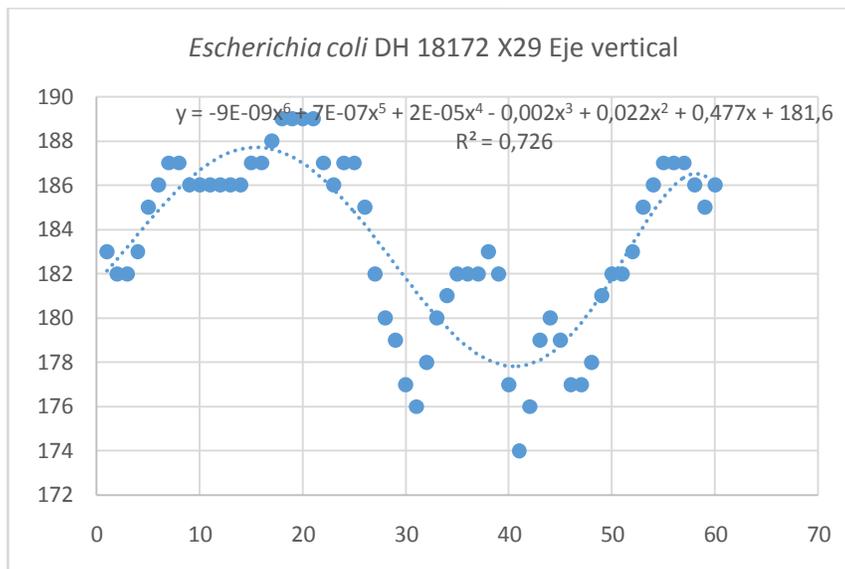


Figura 27 Perfil unidimensional de la colonia de *Escherichia coli* DH 46393

Figura 27.1 Perfil horizontal en pixel Y29 de *Escherichia coli* DH 46393

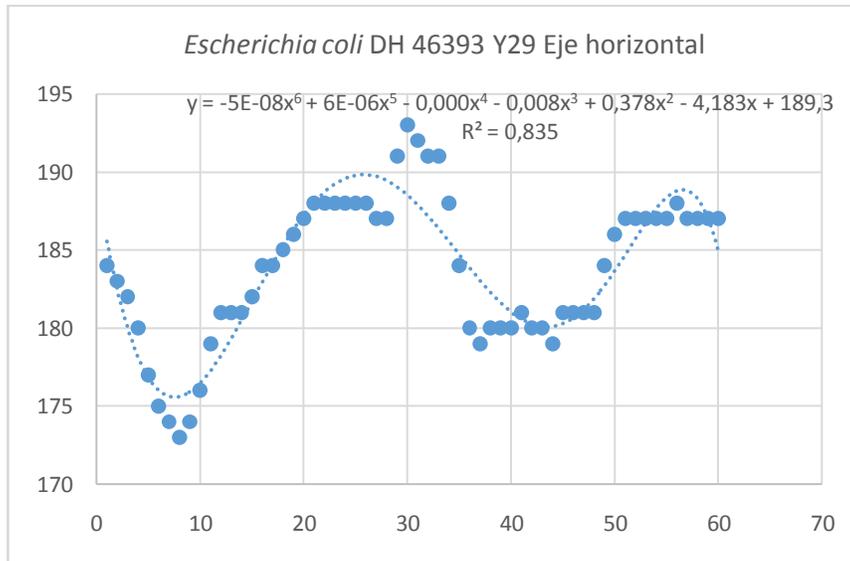


Figura 27.2 Perfil vertical en pixel X29 de *Escherichia coli* DH 46393

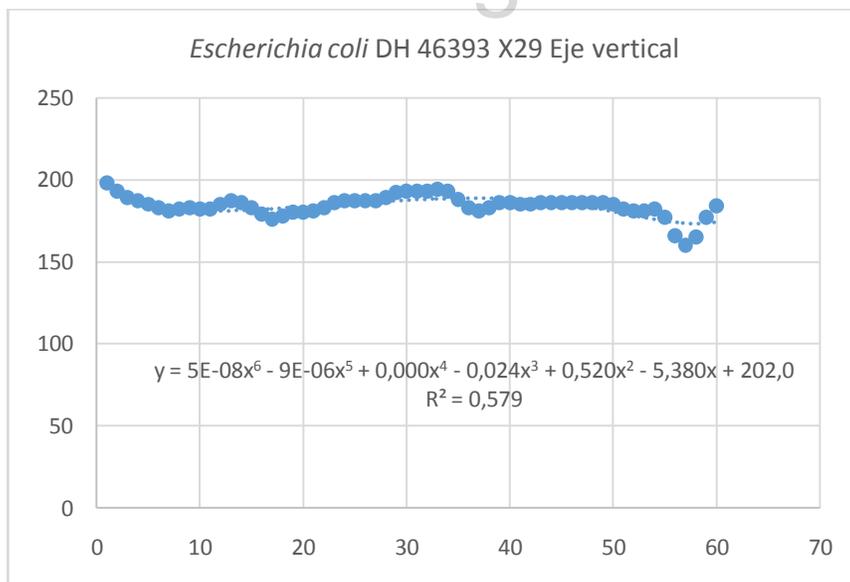


Figura 30 Perfil unidimensional de la colonia de *Escherichia coli* GY 9863

Figura 30.1 Perfil horizontal en pixel Y29 de *Escherichia coli* GY 9863

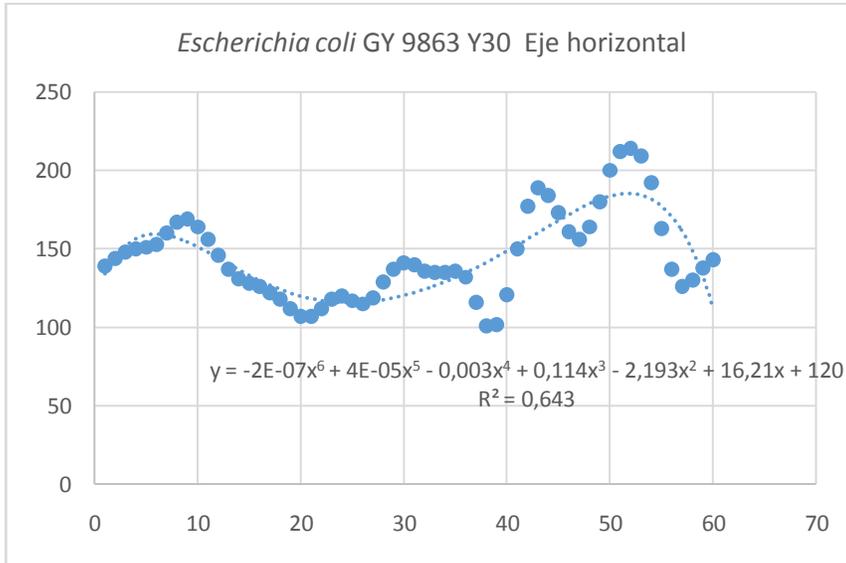


Figura 30.2 Perfil vertical en pixel X29 de *Escherichia coli* GY 9863

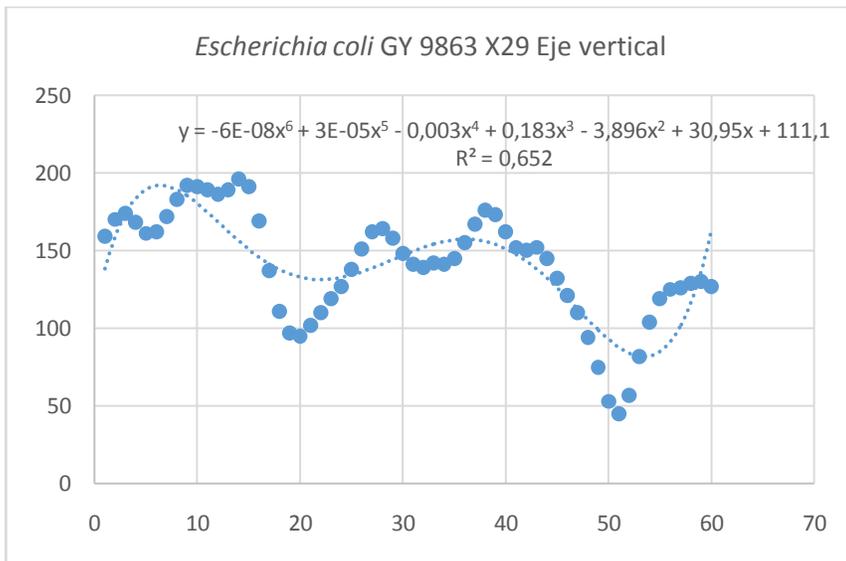


Figura 31 Perfil unidimensional de la colonia de *Escherichia coli* GY 34943

Figura 31.1 Perfil horizontal en pixel Y29 de *Escherichia coli* GY 34943

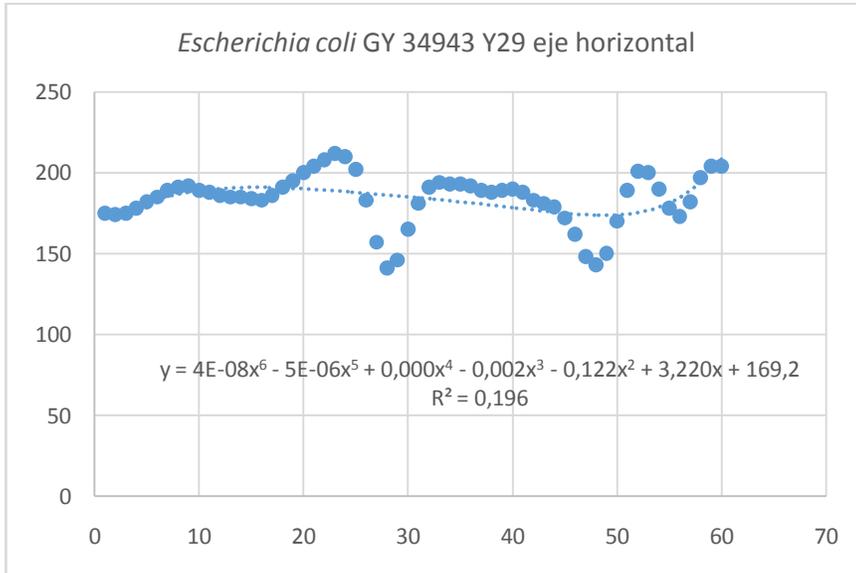


Figura 31.2 Perfil vertical en pixel X29 de *Escherichia coli* GY 34943

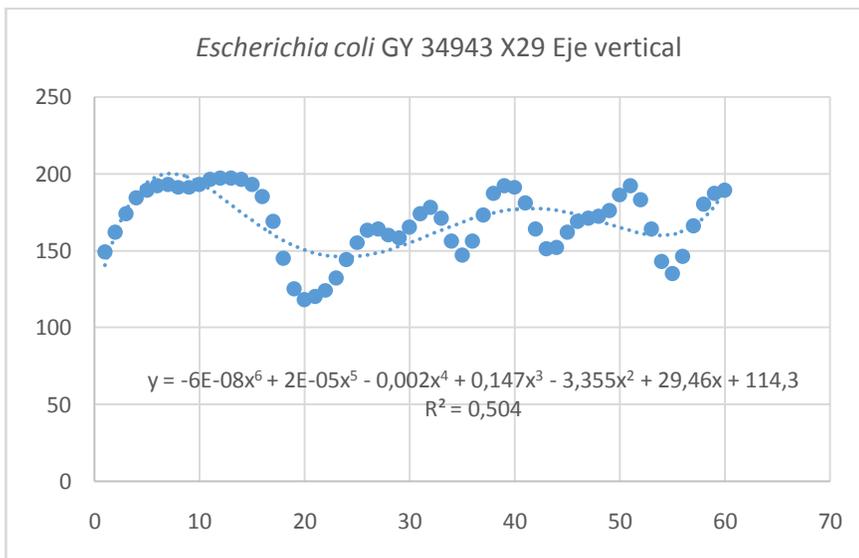
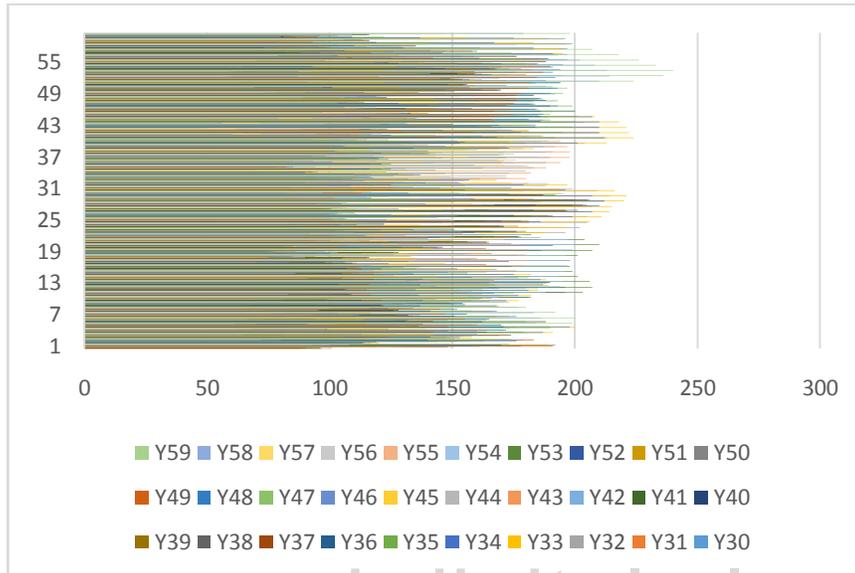


Figura 32 Perfil bidimensional de la colonia *Candida albicans* 52033

Figura 32.1 Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de *Candida albicans* 52033.



www.bdigital.ula.ve

Figura 32.2 Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de *Candida albicans* 52033.

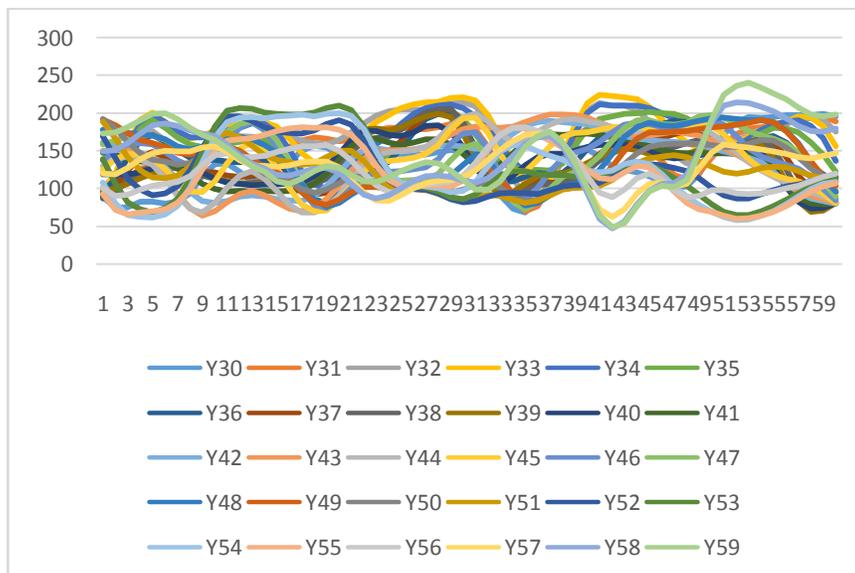


Figura 33 Perfil bidimensional de la colonia *Candida albicans* 23585

Figura 33.1 Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de *Candida albicans* 23585

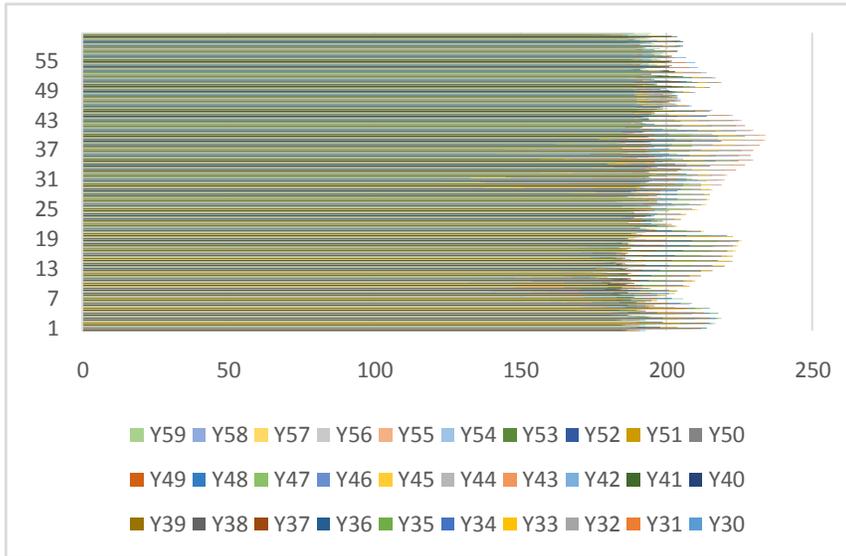


Figura 33.2 Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de *Candida albicans* 23585

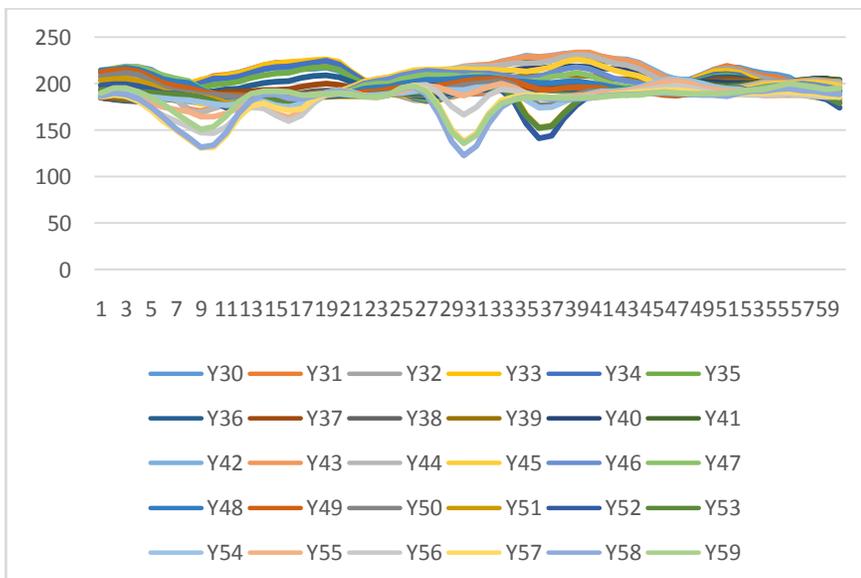
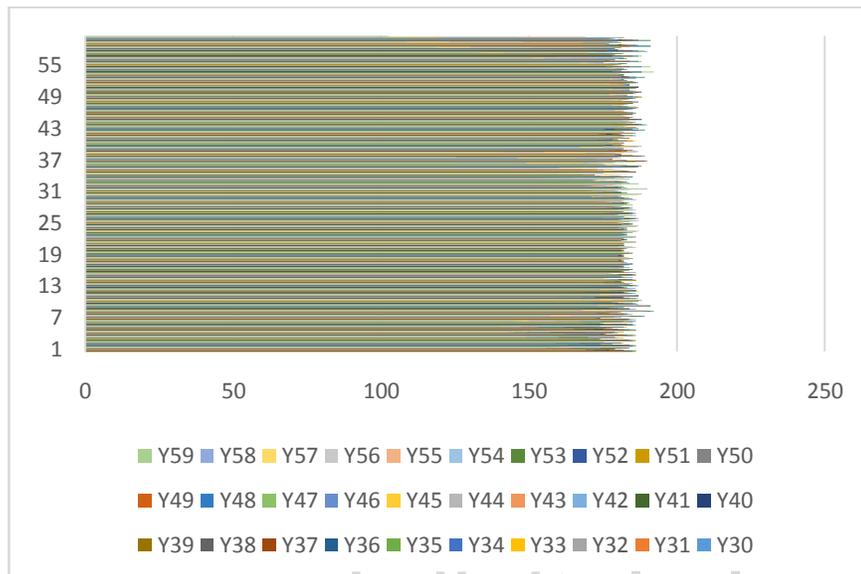


Figura 34 Perfil bidimensional de la colonia *Candida tropicalis* 52906

Figura 34.1 Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de *Candida tropicalis* 52906



www.bdigital.ula.ve

Figura 34.2 Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de *Candida tropicalis* 52906

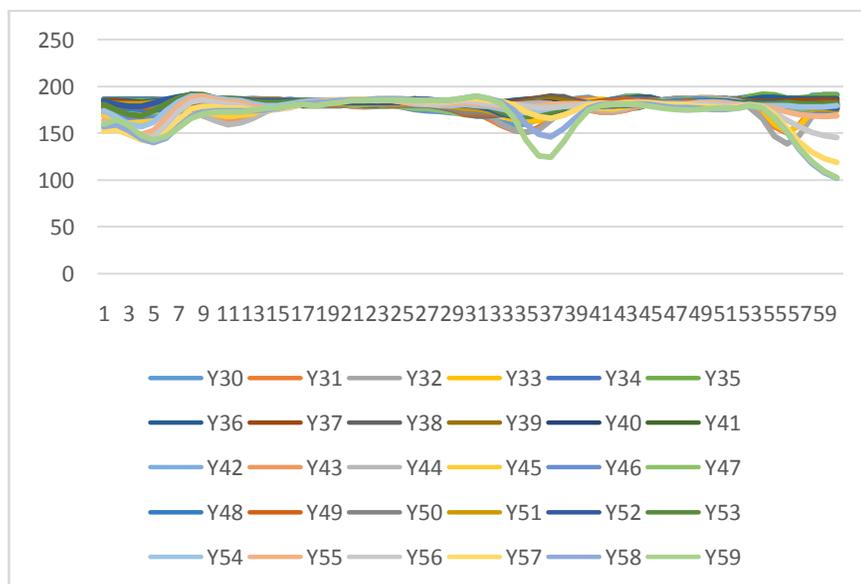


Figura 35 Perfil bidimensional de la colonia *Candida tropicalis* 42128

Figura 35.1 Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de *Candida tropicalis* 42128

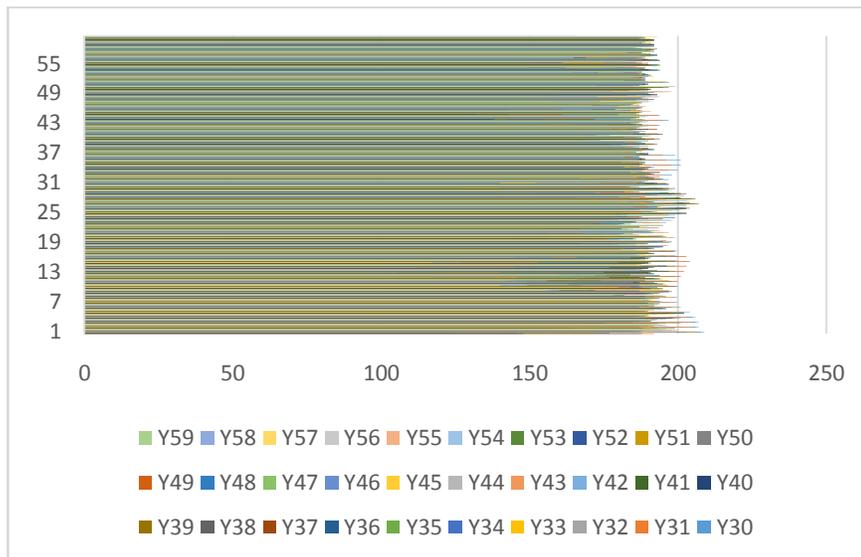


Figura 35.2 Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de *Candida tropicalis* 42128

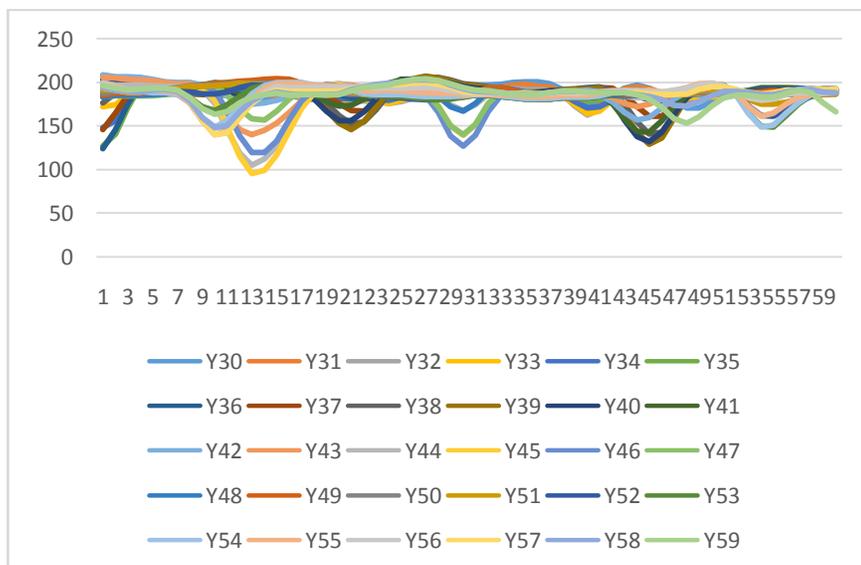
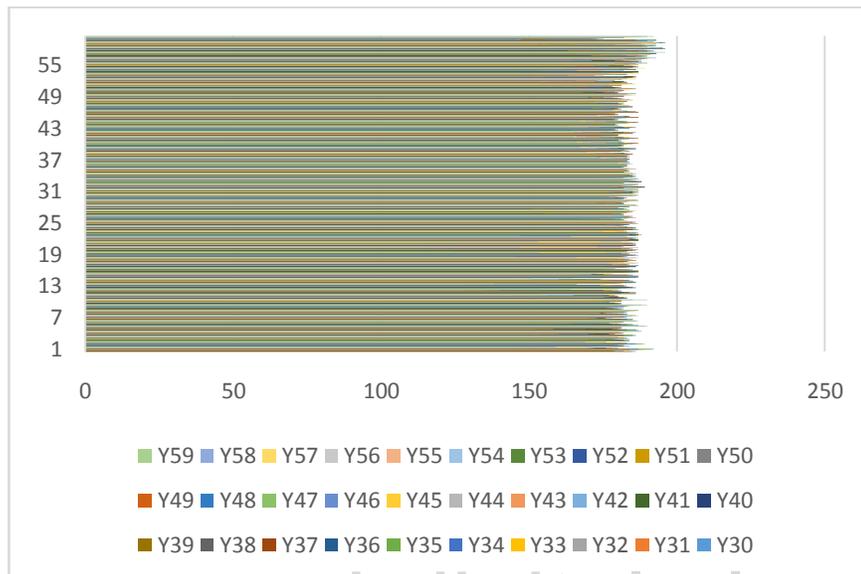


Figura 36 Perfil bidimensional de la colonia *Escherichia coli* DH 18172

Figura 36.1 Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de *Escherichia coli* DH 18172



www.bdigital.ula.ve

Figura 36.2 Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de *Escherichia coli* DH 18172

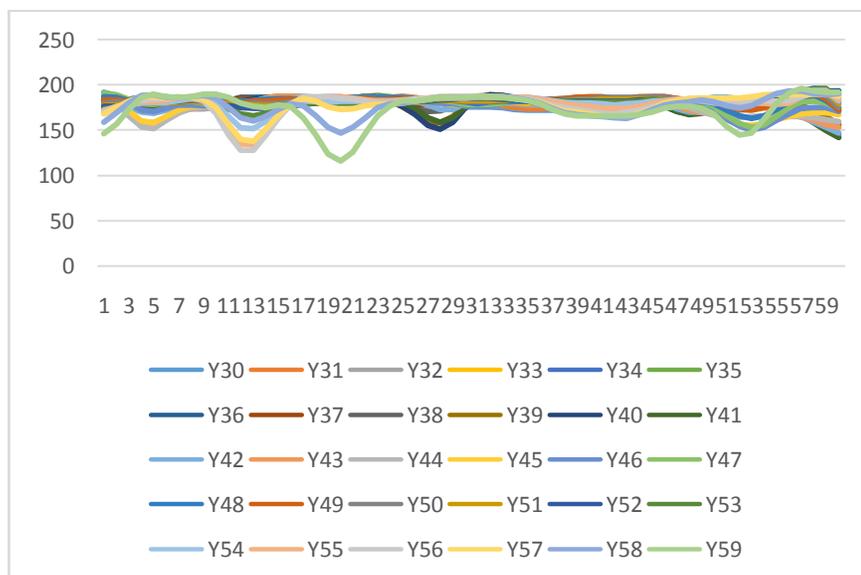
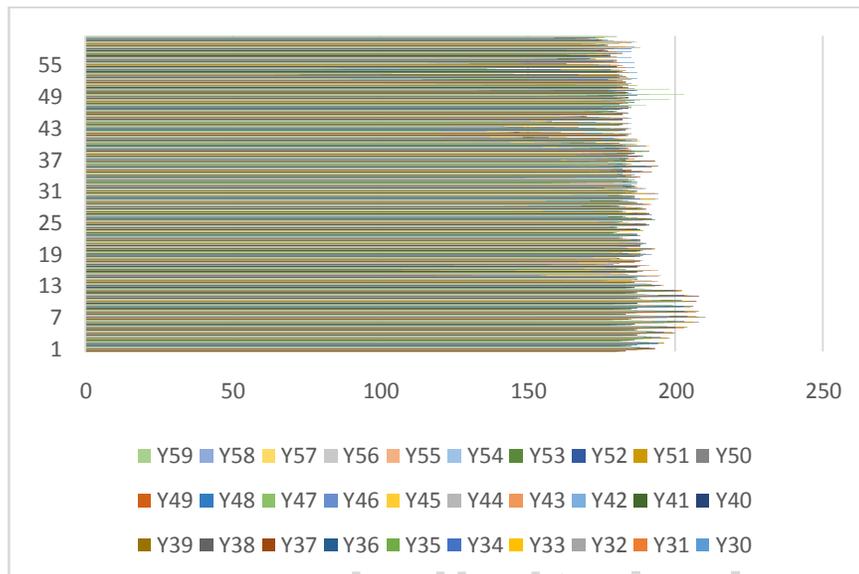


Figura 37 Perfil bidimensional de la colonia *Escherichia coli* DH 46393

Figura 37.1 Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de *Escherichia coli* DH 46393



www.bdigital.ula.ve

Figura 37.2 Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de *Escherichia coli* DH 46393

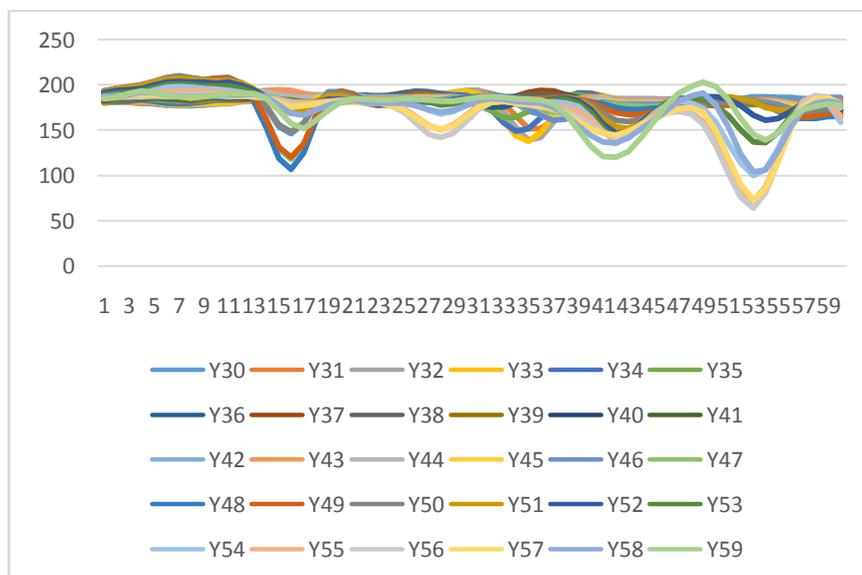
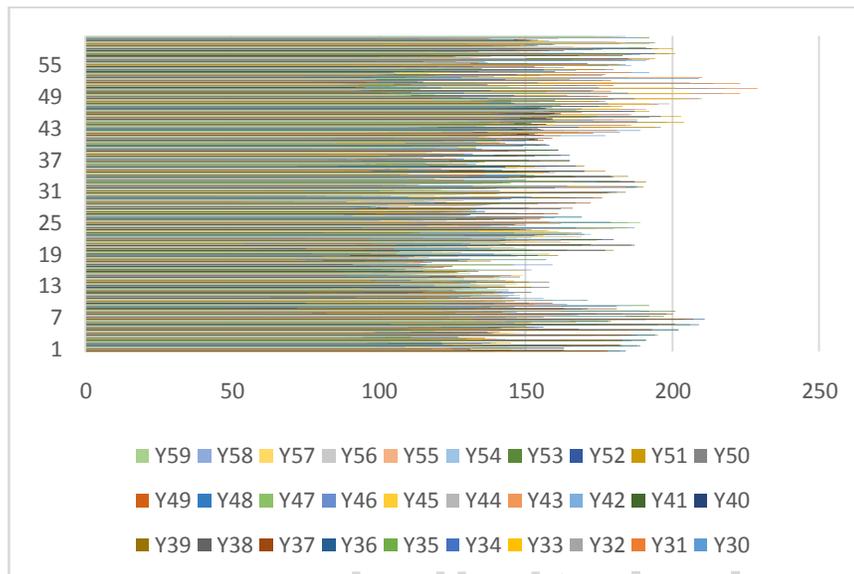


Figura 38 Perfil bidimensional de la colonia *Escherichia coli* GY 9863

Figura 38.1 Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de *Escherichia coli* GY 9863



www.bdigital.ula.ve

Figura 38.2 Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de *Escherichia coli* GY 9863

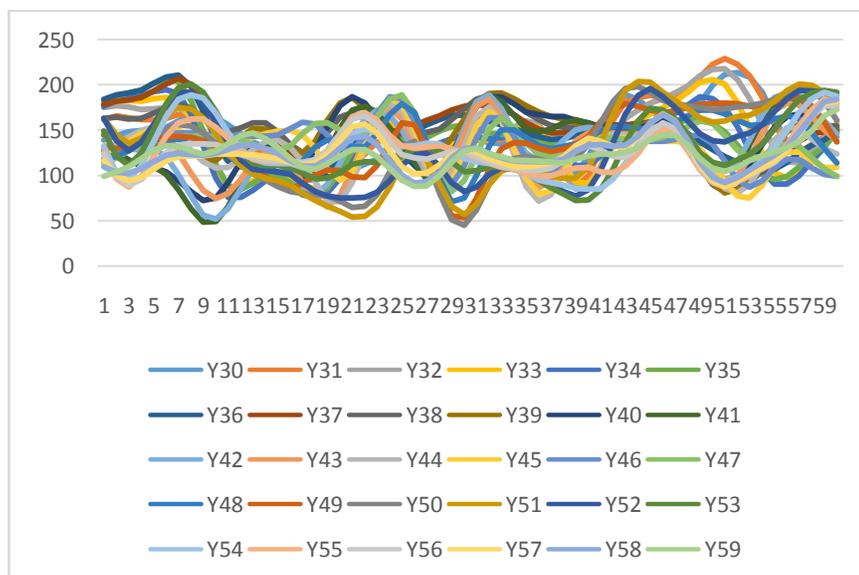
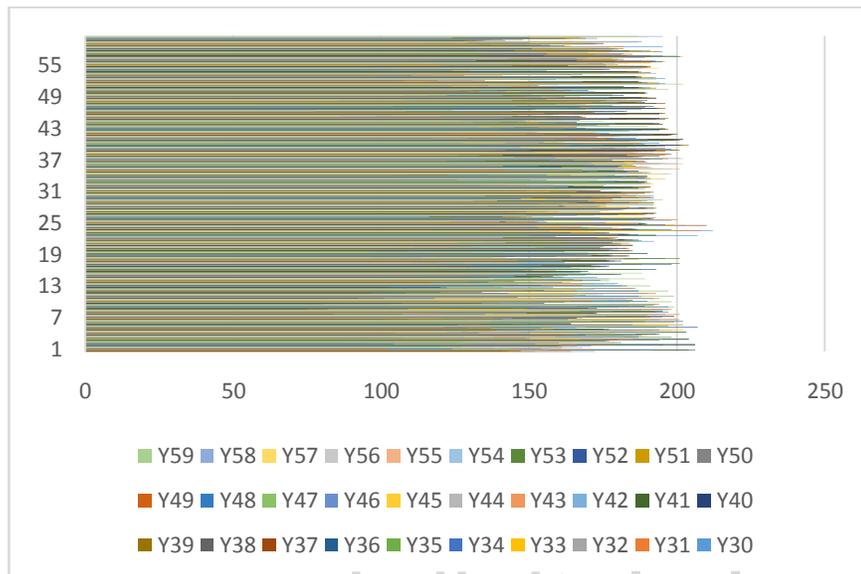


Figura 39 Perfil bidimensional de la colonia *Escherichia coli* GY 34943

Figura 39.1 Perfil bidimensional en grafico de barra de la colonia de *Escherichia coli* GY 34943



www.bdigital.ula.ve

Figura 39.2 Perfil bidimensional en grafico de línea de la colonia de *Escherichia coli* GY 34943

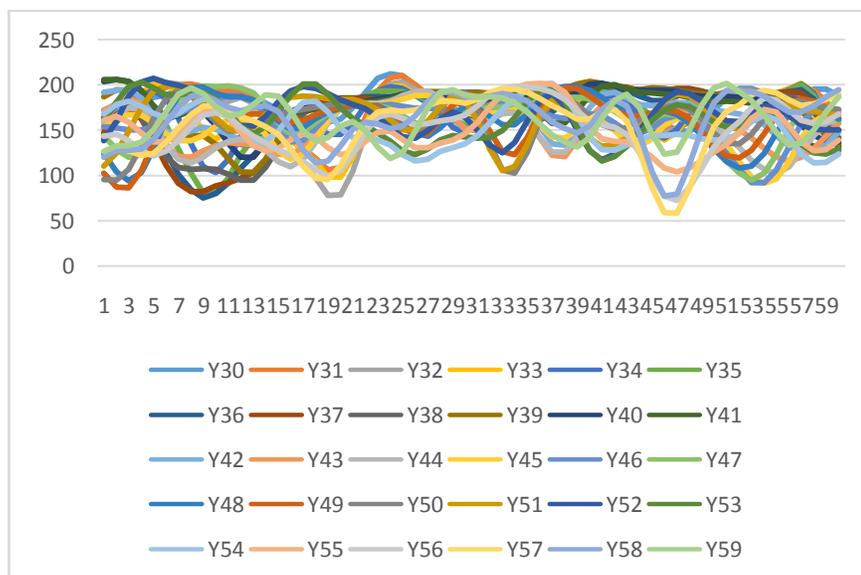


Figura 40. Perfil tridimensional de la colonia de *Candida albicans* 52033

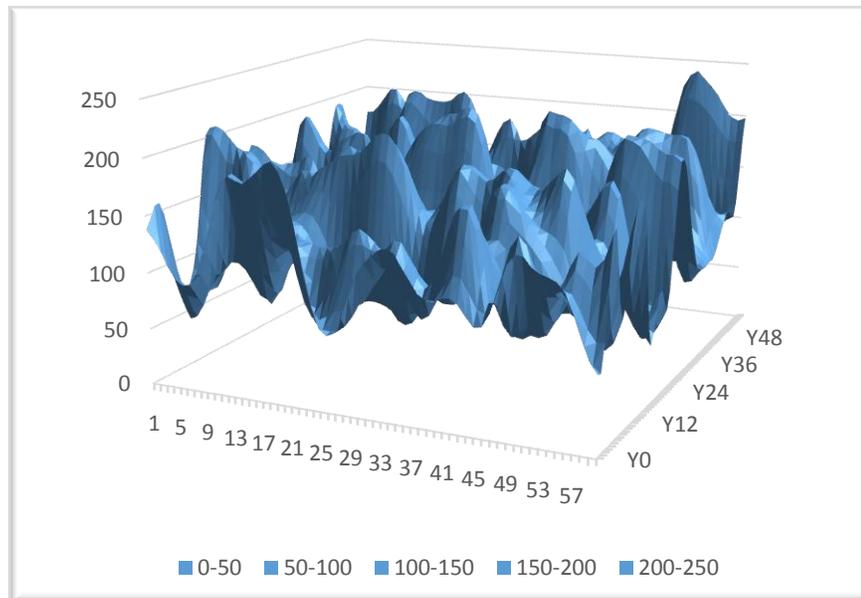


Figura 41 Perfil tridimensional de la colonia de *Candida albicans* 23585

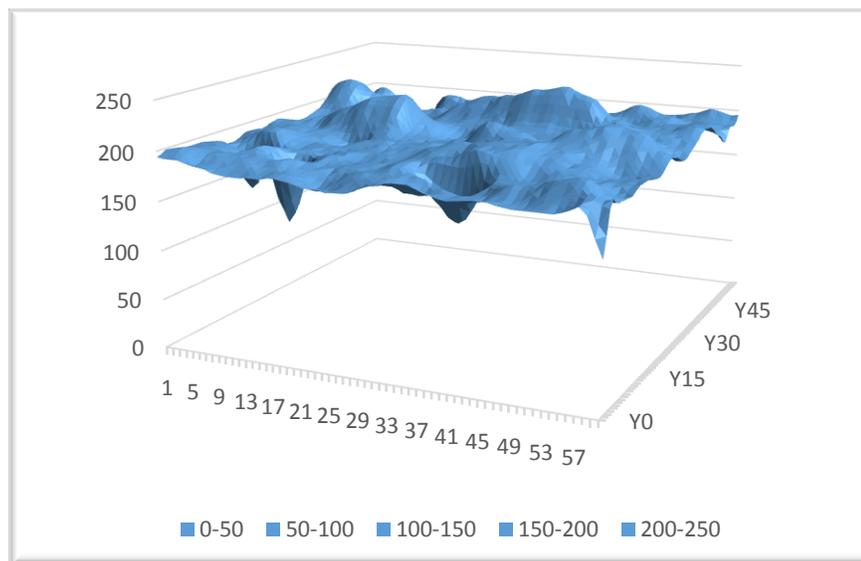


Figura 42 Perfil tridimensional de la colonia de *Candida tropicalis* 52906

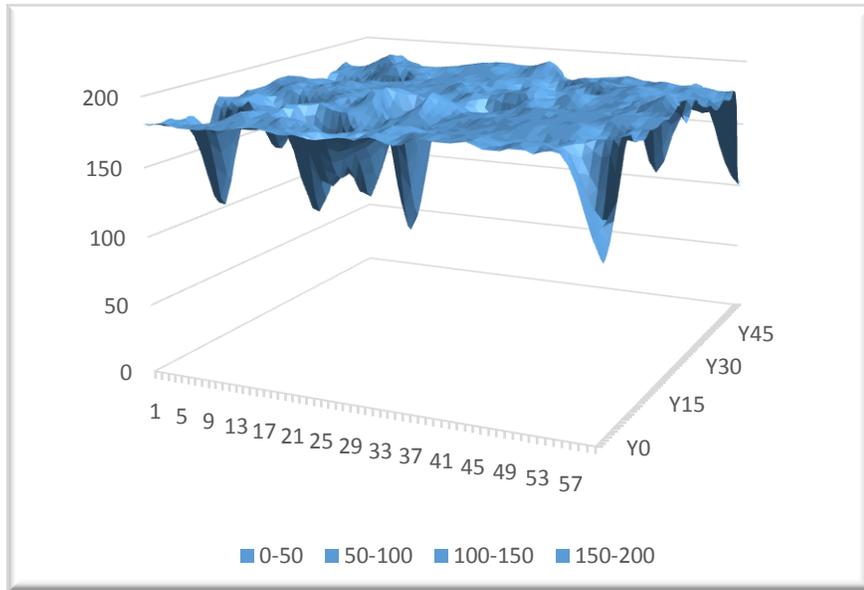


Figura 43 Perfil tridimensional de la colonia de *Candida tropicalis* 42128

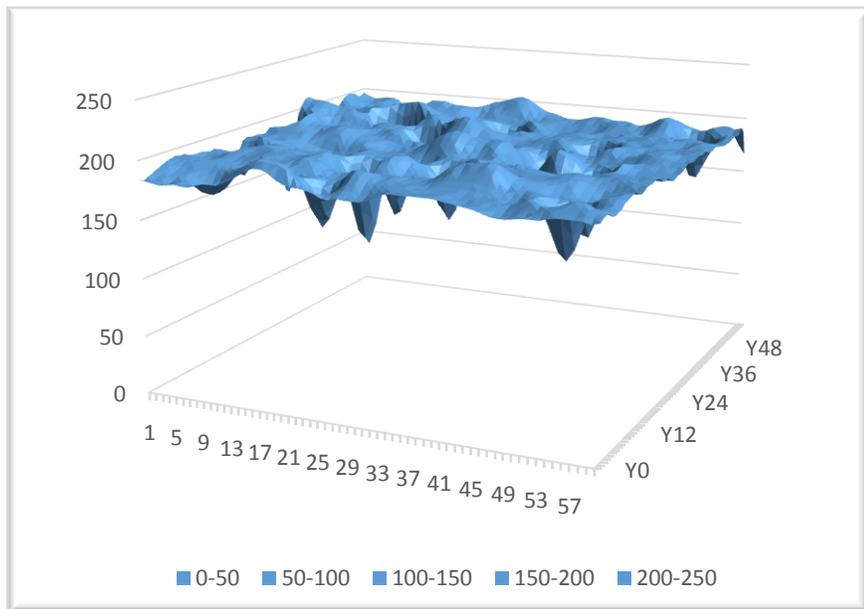


Figura 44 Perfil tridimensional de la colonia de *Escherichia coli* DH 18172

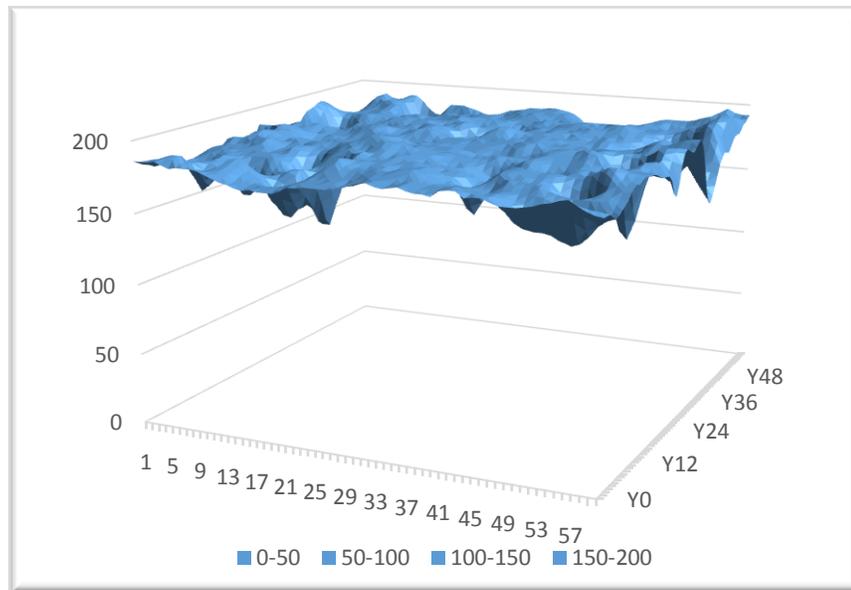


Figura 45 Perfil tridimensional de la colonia de *Escherichia coli* DH 46393

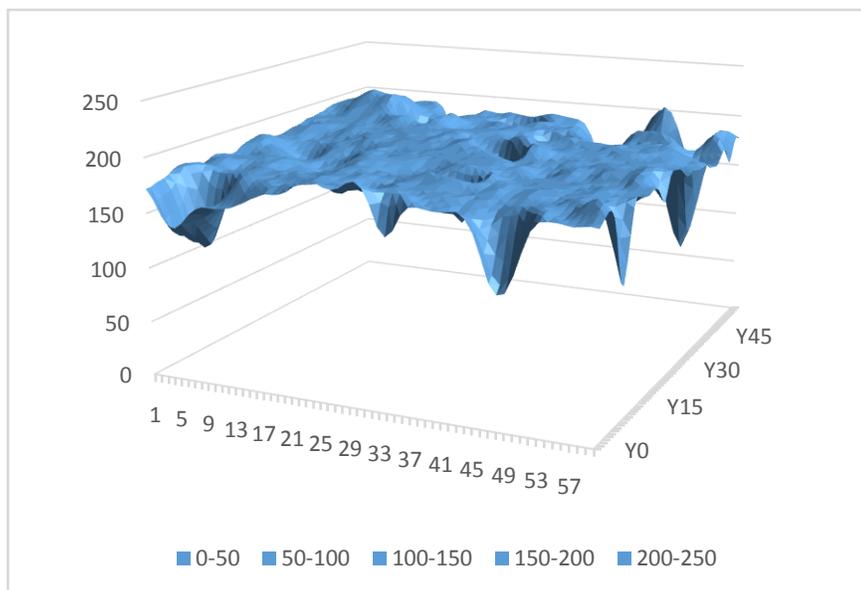


Figura 46 Perfil tridimensional de la colonia de *Escherichia coli* GY 9863

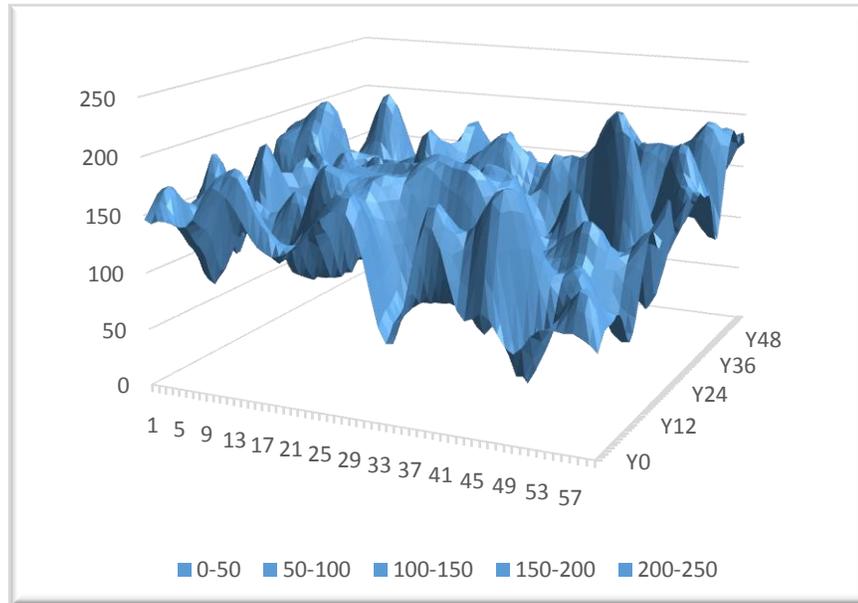


Figura 47 Perfil tridimensional de la colonia de *Escherichia coli* GY 34943

