



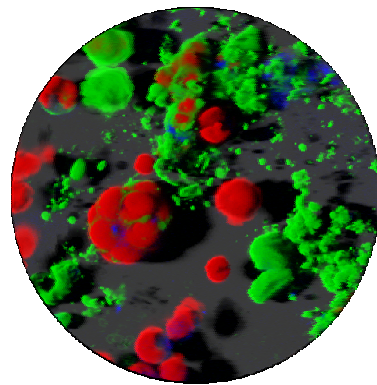
Facultat de Farmàcia
Dept. de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia

Caracterització de biofilms fototròfics d'ambients hipogeus

MÒNICA ROLDÁN MOLINA

2008

Annex



Capítol 7

Annex: Quantificador de biofilms

7.1. Introducció	267
7.1.1. Descripció del projecte	267
7.1.2. Antecedents	268
7.1.3. Objectius	269
7.2. Quantificació	270
7.2.1. Funcions de quantificació	270
7.2.2. Altres paràmetres	273
7.3. Entorn de treball	274
7.3.1. Elecció del llenguatge de programació	274
7.3.2. Java	276
7.4. Manual d'usuari	276
7.4.1. Instal·lació i execució	276
7.4.2. Format de l'aplicació	277
7.4.3. Entrada de dades	279
7.4.4. Opcions per defecte	280
7.4.5. Conversió del format	281
7.4.6. Càrrega de resultats ja calculats	281
7.4.7. Funcions de quantificació	281
7.4.8. Visors 2D i 3D	282
7.5. Conclusions	283
7.6. Referències	285

7.1. Introducció

7.1.1. Descripció del projecte

El programa “Quantificador de biofilms” s’ha portat a terme amb la col·laboració de la Unitat de Llenguatges i Sistemes Informàtics de la Universitat Politècnica de Catalunya i ha format part del projecte de fi de carrera d’Enric Font, dirigit pel Dr. Josep Vilaplana. Aquest projecte s’emmarca dins de la titulació d’Enginyeria Informàtica de la Facultat d’Informàtica i va néixer de la necessitat de construir una aplicació feta a mida per a la quantificació de biofilms fototròfics, permetent obtenir un *feedback* adequat entre el camp de la informàtica i la biologia, adaptant el producte als nostres requeriments i a les nostres preferències.

L’objectiu d’aquest projecte és, doncs, realitzar una aplicació per a la quantificació de biofilms. S’entén per quantificació d’aquestes comunitats el càlcul d’uns determinats valors que les representen mitjançant l’aplicació d’unes funcions. Es rebrà com a paràmetre d’entrada una pila d’imatges bidimensionals corresponents a una mostra provinent d’un microscopi confocal. Es tracta de quantificar aquestes imatges a partir d’una sèrie de funcions, donant suport a la posterior caracterització de l’estructura i la morfologia dels biofilms per part dels investigadors. A part de les imatges, es requereix informació essencial com la mida del vòxel, el nombre d’imatges o el format del nom de les imatges. El microscopi de rastreig làser confocal TCS-SP2 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) genera un fitxer d’extensió .info que conté tota aquesta informació i altra. El programa que hem elaborat permet la lectura d’aquest fitxer per extreure la dita informació. Altrament, es pot introduir la informació manualment o bé a partir de la lectura d’un fitxer d’extensió .bfm de format propi de l’aplicació, que es detallarà més endavant.

Les funcions de quantificació més rellevants per a la caracterització i la comprensió de l'estructura d'aquestes comunitats van ser les següents: *Biovolume* (biovolum), *Biomass distribution* (distribució de la biomassa), *Thickness distribution* (distribució del gruix), *Average Thickness* (gruix mitjà), *Roughness* (coeficient de rugositat), *Biofilm porosity* (porositat del biofilm), *Areal porosity* (porositat de l'àrea) i *Surface to ratio volum* (superfície vs. ratio volum). A part d'aquestes funcions, l'aplicació incorpora una reconstrucció 3D del volum analitzat, així com un visor d'imatges per contrastar si el llindar seleccionat és l'adequat.

Un pas previ a la quantificació de la mostra és convertir les imatges a escala de grisos i aplicar-hi un llindar per tal de separar el que és biomassa del biofilm del fons. La selecció d'aquest llindar és arbitrària i, per aquesta raó, segons el valor seleccionat per l'operador es poden produir nivells inacceptables de variabilitat. Aquest llindar pot ser seleccionat manualment o automàticament, de manera que la selecció automàtica proporciona nivells similars a la selecció manual.

7.1.2. Antecedents

La idea de l'aplicació prové d'un programa implementat en MATLAB 5.3 (amb l'ús del paquet Image Processing Toolbox) anomenat COMSTAT [1].

COMSTAT és un programa per a la quantificació d'estructures tridimensionals de biofilms a partir imatges adquirides per un microscopi làser confocal. Abans de realitzar la quantificació del biofilm, a cada sèrie d'imatges s'aplica un llindar determinat. La informació de les imatges i els resultats són guardats en un fitxer de text, on s'inclou el nom de la sèrie d'imatges, el nombre d'imatges, el llindar i la mida del vòxel.

MATLAB proporciona una àmplia varietat de funcions matemàtiques per tractar, analitzar i mostrar imatges. A més, MATLAB és multiplataforma, funcionant

tant en Windows com Unix. COMSTAT implementa les diferents mesures de quantificació utilitzant les funcions de MATLAB. Aquest fet fa que COMSTAT sigui un programa fàcil de comprendre i que les funcions puguin ésser modificades fàcilment segons els criteris i necessitats dels usuaris.

El gran desavantatge que presenta COMSTAT és que requereix la llicència de MATLAB i del Image Processing Toolbox per poder-lo utilitzar. Hem trobat algunes restriccions del programa com la impossibilitat de introduir mostres de sèries considerables (~100) sota la plataforma WINDOWS i, a part, es requereix la conversió manual dels noms dels fitxers per adaptar-los al format de COMSTAT. A més, necessitàvem poder calcular alguns paràmetres que el programa COMSTAT no contempla (per exemple, la porositat).

7.1.3. Objectius

Els objectius són els següents:

- Lectura de l'entrada, conversió de formats i tractament d'imatges TIFF provinents del microscopi confocal Leica TCS-SP2. Això inclou la lectura dels fitxers generats pel microscopi Leica i l'extracció de la informació necessària del biofilm que s'està analitzant, conversió del format Leica (i d'altres possibles) al format propi i possibilitat de salvar els resultats en un fitxer de text, així com la possibilitat de carregar els resultats prèviament emmagatzemats.
- Implementació de funcions de quantificació i del càlcul del llinar. Les funcions de quantificació són: càlculs del biovolum, distribució de biomassa, gruix mitjà, distribució del gruix, rugositat, porositat i distribució de la porositat, cobertura de la superfície i càlcul automàtic del llinar per cada imatge de la sèrie corresponent a un biofilm.

- Visualització en 2D de les imatges i en 3D del volum total de la mostra, mitjançant la tècnica de *ray casting* [2], i mostra d'un gràfic 2D caracteritzant el gruix del biofilm.

7.2. Quantificació

En aquest capítol s'expliquen les diverses funcions de quantificació, el càlcul del llinard i la visualització volumètrica del biofilm.

7.2.1. Funcions de quantificació

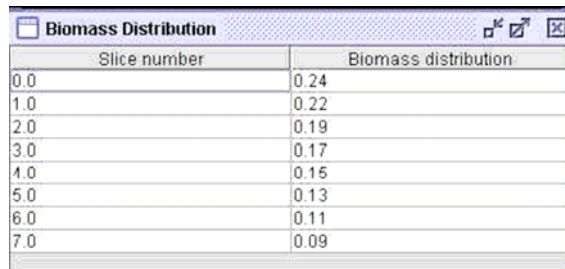
Biovolum

El biovolum és definit com el nombre de píxels de biomassa en tota la sèrie d'imatges multiplicat per la mida del vòxel i dividit per l'àrea de substrat de la sèrie d'imatges. El valor resultant és el volum de la biomassa dividit per l'àrea del substrat ($\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$). El biovolum representa el volum total del biofilm per unitat d'àrea i també proporciona una estimació de la seva biomassa.

$$\text{Biovolum} = \frac{\text{Biomassa} \cdot \text{Voxel size}}{\text{Àrea substrat}}$$

Distribució de la biomassa

Es tracta de mostrar, per a cada imatge corresponent a la sèrie adquirida, la relació de píxels que pertanyen a la biomassa del biofilm respecte el total. D'aquesta manera es veu com queda distribuït el biovolum total del biofilm en les diferents profunditats.



Slice number	Biomass distribution
0.0	0.24
1.0	0.22
2.0	0.19
3.0	0.17
4.0	0.15
5.0	0.13
6.0	0.11
7.0	0.09

Distribució del gruix

El *gruix* es defineix com la màxima *alçada* del biofilm (distància entre la primera i l'última secció corresponent a cada punt, que es considera la superfície) en una posició determinada, mesurada mitjançant el nombre de seccions i la distància entre cada una d'elles i ignorant porus i buits dins del biofilm.

La *distribució del gruix* és utilitzada per calcular una sèrie de variables com la rugositat, o el gruix mitjà. El programa també realitza un gràfic complementari on es visualitza la distribució del gruix per a cada píxel (x,y), així com una taula que inclou els valors numèrics.

Gruix mitjà

Mesura l'alçada mitjana i és la variable més usada en la caracterització de biofilms [3].

Coefficient de rugositat

Proporciona una mesura de la dimensió z, o gruix, en cada punt de la superfície i és un indicador de l'heterogeneïtat del biofilm.

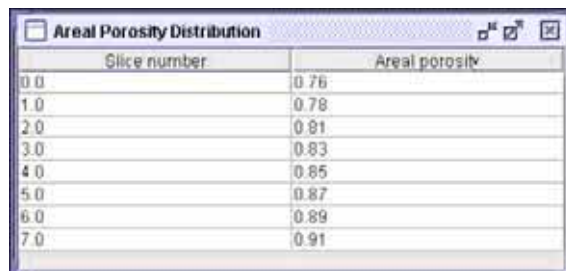
S'utilitza la versió del coeficient de *roughness* adimensional donat a Murga et al. [4], també utilitzat en el COMSTAT. Es calcula a partir de la *distribució del gruix* i es defineix com:

$$\sum_{i=1}^N = \frac{|L_i - L_f|}{L_f} * \frac{1}{N}$$

On N és el nombre de mesures de *gruix*, L_i correspon al *gruix* de la i -èssima mesura i L_f correspon a la *gruix mitjà*.

Porositat de l'àrea i porositat del biofilm

La *porositat de l'àrea* (àrees discontinues) es calcula per a cada imatge 2D i és una ràtio del nombre de píxels buits sobre el total. La *porositat del biofilm* es calcula sobre tot el biofilm (tota la pila d'imatges) i requereix la *porositat de l'àrea* de cada secció individual i el *gruix del biofilm*. El que es fa és integrar la *porositat de l'àrea* de totes les seccions xy des de la superfície del biofilm fins al fons, o sigui el *gruix del biofilm* [5].



Slice number	Areal porosity
0.0	0.76
1.0	0.78
2.0	0.81
3.0	0.83
4.0	0.85
5.0	0.87
6.0	0.89
7.0	0.91

Superfície vs. Ratio volum

La *superfície* de biofilm es defineix com el conjunt de píxels que tenen com a mínim un píxel de fons com a veí. Tots els píxels situats al voltant de la frontera de la sèrie es defineixen com a biomassa, excepte la frontera superior, definida com a fons. D'aquesta manera solament les superfícies exposades al nutrient

s'inclouen en el càlcul de la *surface area*. La *surface area* és la suma de l'àrea de totes les superfícies dels voxels que contenen biomassa exposats al fons.

El *surface to volume ratio* és la relació entre la *surface area* i el *bio-volume*. Mostra quina fracció del biofilm està exposada al nutrient i, per tant, pot indicar com el biofilm s'adapta al medi.

7.2.2. Altres paràmetres

Selecció automàtica del llindar

La segmentació d'una imatge és un procés on cada píxel amb un valor de gris per sobre del valor llindar és classificat com primer terme (*foreground*) i un píxel amb un valor per sota del valor llindar com a fons d'informació (*background*), obtenint una imatge binària. Es calculen els altres paràmetres de quantificació a partir de les sèries binàries generades. La selecció del llindar és un pas important en l'anàlisi de quantificació de les imatges de CSLM perquè el valor escollit canviarà el volum i la morfologia de cadascú dels components del biofilm [6].

La selecció de la intensitat en l'escala de grisos utilitzada per aplicar el llindar és arbitrària, i sota el control de l'operador pot produir nivells indesitjables de variabilitat. La qualitat de la informació numèrica extreta de les imatges disminueix amb aquesta variabilitat. És desitjable trobar un mètode que millori la reproductibilitat de les operacions d'aplicació del llindar.

Després d'estudiar la bibliografia sobre el tema, s'ha optat per implementar la selecció iterativa del llindar segons Yang et al. [7], ja que és l'únic mètode que proporciona nivells pròxims als manuals. Aquest mètode està basat en l'histograma de la imatge i assumeix que hi ha un valor mitjà tant per als píxels de fons com per als de biomassa i que es pot trobar un valor òptim del llindar fent la mitjana d'aquests dos valors.

Visualització volumètrica del biofilm

A partir de tota la sèrie d'imatges d'un determinat biofilm se'n realitza la visualització del volum, mitjançant *ray casting* [2]. El *ray casting* és un mètode per obtenir imatges 3D generades per ordinador. Consisteix a llançar raigs 3D des de l'observador cap a l'escena i quan el raig intersecciona amb un objecte s'avalua la intensitat del llum en aquest punt.

7.3. Entorn de treball

Quan parlem de l'entorn de treball ens referim a l'elecció del llenguatge de programació escollit per desenvolupar l'aplicació.

7.3.1. Elecció del llenguatge de programació

Es pretén construir una aplicació multiplataforma (Linux, Windows), ja que nosaltres treballem en entorn Windows però volem que sigui compatible amb Linux (*software* lliure) per a possibles expansions de l'aplicació. Cal tenir en compte que l'aplicació treballa amb sèries d'imatges de resolució 512*512 píxels i que les funcions de quantificació requereixen analitzar totes les imatges píxel per píxel per extreure'n els resultats. Es requereix treballar amb matrius 2D i 3D, així com la possibilitat de realitzar una visualització volumètrica del biofilm. El llenguatge de programació haurà de donar suport a aquests requeriments. Atès el requeriment que el *software* desenvolupat sigui lliure, queda descartada l'opció d'usar Matlab per al desenvolupament de l'aplicació, ja que requereix llicència. Matlab és el llenguatge utilitzat pel COMSTAT i es tracta d'una aplicació multiplataforma i amb suport per treballar amb matrius de 2 i 3 dimensions.

A partir dels propis requeriments de l'aplicació, s'ha escollit el llenguatge JAVA. Aquest llenguatge està orientat a objectes: no compila a codi binari (específic de la plataforma), sinó a *Java bytecode*. El *Java bytecode* s'executa dins la JVM (Java Virtual Machine), que significa que pot córrer en qualsevol plataforma amb JVM, cosa que suposa un gran avantatge. Tanmateix, JAVA és lent respecte a altres programes compilats a codi màquina. Aquest llenguatge proporciona biblioteques que donen suport a l'ús de matrius 2D i 3D i, a més, existeixen diversos paquets de visualització de volums disponibles per a Java, tals com VTK, GTK o BIJ.

Tot i el desavantatge d'eficiència que presenta respecte a C++ (codi interpretat), s'ha optat per implementar l'aplicació amb JAVA, *software* lliure i multiplataforma.

Així doncs, finalment s'ha utilitzat:

- JAVA, JDK 1.4.
- JAI (Java Advanced Imaging). Biblioteca de tractament d'imatges per a Java.
- COLT. Biblioteca de suport al càlcul matricial.
- VTK (Visualization Toolkit). Paquet que proporciona les funcionalitats per visualitzar volums en 3D.
- IDE (Integrated Development Environment) NetBeans per tal de desenvolupar el programa. Ha estat útil per a la localització d'errors, la facilitat de consulta d'operadors de classes i per la indentació automàtica del codi.

7.3.2 Java

En la majoria de llenguatges de programació es compila o interpreta un programa per tal d'executar-lo en el propi ordinador. El llenguatge JAVA és diferent en aquest sentit ja que el programa és compilat i interpretat. Amb el compilador, primer es transforma el programa en codi intermedi anomenat *Java bytecodes*, aleshores el codi independent de plataforma és interpretat en la plataforma Java. L'interpret executa cada instrucció *java bytecode* en l'ordinador. La compilació es realitza només un cop i la interpretació és realitzada cada cop que el programa és executat. *Java bytecodes* es pot compilar i executar en qualsevol plataforma que tingui un compilador de Java, com qualsevol implementació de la Java Virtual Machine. En aquest cas, el mateix programa escrit en el llenguatge de programació Java pot ésser executat, per exemple, en Windows 2000 o en un Mac.

7.4. Manual d'usuari

En aquest apartat oferim una guia sintetitzada per a la utilització del programa.

7.4.1. Instal·lació i execució

Per tal d'executar l'aplicació es requereix tenir la Java Virtual Machine instal·lada en l'ordinador. El programa és distribuït en un fitxer .JAR amb totes les classes necessàries incorporades. Per executar el .jar:

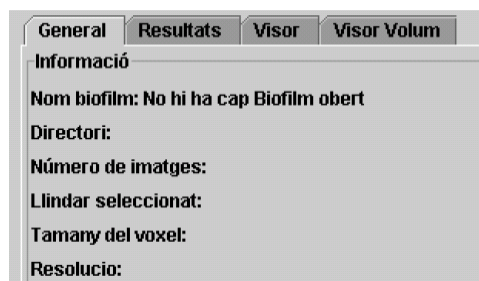
```
> java -jar qBiof.jar
```

7.4.2. Format de l'aplicació

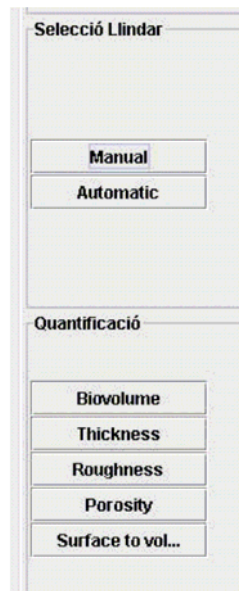
L'aplicació està distribuïda en 4 pestanyes on es mostra la informació general del biofilm, els resultats, un visor 2D i un visor del volum del biofilm.



En la part superior de la pestanya *General* es troba la informació del biofilm referent a: nom, directori, resolució, nombre d'imatges, llinar seleccionat i mida del vòxel.



En la part central i inferior apareixen les opcions que ens permetran aplicar un llinar manual, automàtic o calcular el *Biovolum*, *Thickness*, *Roughness*, *Porosity* o *Surface*.



A la pestanya *Resultats* es mostra en la part superior els valors del *Biovolum*, *Thickness*, *Roughness*, *Porosity* i *Surface* en cas que hagin estat calculats. En la part central es mostra una sèrie d'opcions per poder visualitzar les següents distribucions: *Thickness*, *Porosity*, *Biomass* i *Llindar*. També hi ha la possibilitat de veure un gràfic de la *Thickness distribution*. Finalment en la part inferior hi ha l'opció de guardar els resultats en un fitxer de text.



A la pestanya *Visor* es poden carregar les imatges del biofilm i automàticament s'obre la imatge corresponent després d'aplicar el llindar. En la pestanya *Visor Volum* es mostra una visualització 3D del volum del biofilm.

7.4.3. Entrada de dades

Actualment l'aplicació treballa amb imatges provinents de microscopis làsers confocals. Aquestes imatges tenen una resolució 512*512, de 8 bits per mostra i són de format .TIFF. Es disposa de 3 maneres diferents d'introduir les dades:

1-Introducció manual

Se'ns demanarà introduir la següent informació: nom del biofilm, directori on es troben les imatges, número d'imatges i mida del vòxel. En aquest cas el patró

del fitxer següent serà el següent: nomBiofilm_0.tif, nomBiofilm_1.tif, etc., nomBiofilm_nlms-1.tif.

2- Lectura de fitxer Leica

En aquesta opció l'aplicació ens demanarà seleccionar on es troba el fitxer Leica (de tipus .txt) i seleccionar una imatge de mostra per tal d'extreure'n el format del nom de fitxer.

3- Lectura de fitxer propi .bfm

En aquesta opció l'aplicació demana seleccionar on es troba el fitxer .bfm descriptor del biofilm. El format del fitxer serà el següent:

Nom: nom_biofilm

Path: directori_on_es_troba_el_biofilm

VoxelX: mida del voxel X

VoxelY: mida del voxel Y

VoxelZ: mida del voxel Z

Imatges: número d'imatges



7.4.4. Opcions per defecte

Per defecte l'aplicació intentarà crear un directori anomenat *temp* en el mateix directori on es troben les imatges del biofilm. Per defecte els resultats de la quantificació dels biofilms se salvaran en un fitxer de text anomenat resultats.txt.

Tan el fitxer de resultats com el directori on es guarden les imatges es poden canviar mitjançant: *Eines->Canvi opcions per defecte*.

7.4.5. Conversiu de format

L'aplicació incorpora una funcionalitat que permet la conversió de fitxers generats per Leica al format propi. Realitza un canvi de nom de tota la sèrie d'imatges i el fitxer .bfm pertinent. Es pot accedir a aquesta funcionalitat mitjançant: *Eines / Conversor*.

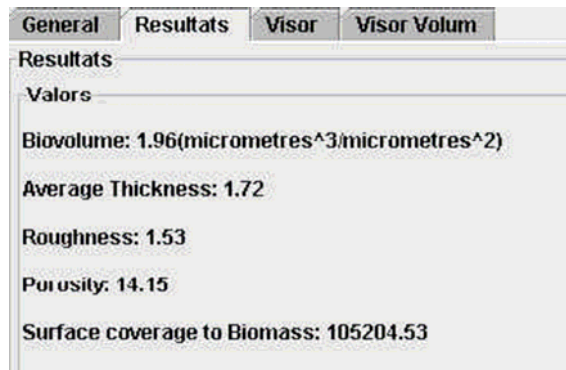
7.4.6. Càrrega de resultats ja calculats

Un cop obert el biofilm es pot carregar resultats ja calculats anteriorment del mateix biofilm. El que es fa és carregar el fitxer de resultats generat per la mateixa aplicació. D'aquesta manera es poden visualitzar directament els resultats o calcular els que falten. Es pot accedir a aquesta funcionalitat mitjançant: *Eines / Carrega Resultats*.

7.4.7. Funcions de quantificació

S'accedeix al càlcul dels diferents valors activant les opcions corresponents a *Biovolume*, *Thickness*, *Roughness*, *Surface* i *Porosity* que apareixen a la pestanya *General*.

Els resultats es visualitzen en la pestanya *Resultats*. Es pot visualitzar en forma de taula el *Biomass_distr*, *Porosity_distr* i *Llindar_distr*. A més, es pot veure un gràfic que mostra la *thickness_distr*, accedint a les diferents opcions en la pestanya *Resultats*.



Es permet la possibilitat de salvar els resultats en un fitxer de text, mitjançant el botó *Guardar resultats*. Es genera un fitxer resultats.txt en el directori on estan les imatges amb els valors guardats.

7.4.8. Visors 2D i 3D

La pestanya *Visor* permet la visualització de les imatges 2D del biofilm, per comparar-les amb les tractades. S'ha de seleccionar una imatge, obrir-la i també la tractada al mateix moment per comparar-les.

La pestanya *Volum* permet realitzar una visualització del volum del biofilm. S'obre un nou marc que conté el seu volum, el qual es pot anar girant per veure'l des de diferents orientacions. També es pot accedir a aquesta funcionalitat a través de la barra d'eines.

7.5. Conclusions

En aquest capítol es fa referència als objectius finals aconseguits i a les possibles extensions i millores de l'aplicació a curt i llarg termini.

S'han implementat totes les funcions de quantificació que necessitàvem per determinar diferències entre biofilms desenvolupats en condicions diverses. Tot i que ja disposem de programes de reconstrucció tridimensional de gran potència, addicionalment s'ha inclòs un visor d'imatges bidimensionals i la representació tridimensional del volum del biofilm amb resultats satisfactoris.

S'han aconseguit superar les limitacions que presentava el programa COMSTAT sota la plataforma WINDOWS: impossibilitat d'executar computacions amb entrades de sèries de biofilms relativament grans (~100 fitxers), interfície no gràfica, una sortida de resultats no gaire intuïtiva i la conversió prèvia del format del nom de les imatges provinents d'un microscopi confocal Leica. Aquest fet, junt amb la inclusió dels visors 2D i 3D en l'aplicació, fa que no s'hagin d'usar aplicacions externes per a aquestes visualitzacions, integrant així tota la funcionalitat desitjada en una sola aplicació.

Fins al moment, aquest programa s'ha utilitzat en la publicació Roldán M. et al. [8].

El programa està essent utilitzat actualment sota la plataforma Windows. S'han realitzat també proves sota Linux, per tal de comprovar el funcionament correcte de l'aplicació en d'altres plataformes. Pel que fa a l'extensibilitat de l'aplicació, el propi disseny fa que es compleixi amb èxit aquest objectiu. El principi de separació de la interfície de la funcionalitat del sistema fa que sigui fàcil incorporar noves funcions de quantificació a l'aplicació sense haver de fer canvis substancials a la capa de la interfície.

Futures versions

Es tracta d'una aplicació que planteja múltiples línies futures de treball. La primera millora de l'aplicació seria transformar el codi per tal de poder-lo compilar en codi natiu, d'aquesta manera es milloraria l'eficiència d'execució del programa.

Quant a l'entrada de dades, es podria afegir compatibilitat amb els diferents tipus de microscopi de rastreig làser confocal llegint el format de fitxer que genera cadascun i els formats d'arxiu. Addicionalment, es podria afegir la possibilitat de tractar amb altres tipus de imatges, que no siguin de format .TIFF i de resolució 512*512 amb 8 bits per mostra, ja que en molts estudis de quantificació s'utilitzen imatges de 12 bits. L'anàlisi dels diferents canals s'ha de fer de forma separada en diferents sessions. Atès que, en general, treballem amb sèries multicanal, seria molt avantatjós que el programa permetés un anàlisi conjunt dels diferents components del biofilm [9].

Es podria estendre el mòdul de les funcions de quantificació, afegint-n'hi de noves que ajudin a una millor caracterització i comprensió del biofilm. El mateix desenvolupament de l'aplicació facilita aquesta tasca, ja que sempre s'ha tingut present aquesta opció futura.

En un futur més llunyà es podria pensar en la possibilitat d'incorporar una base de dades a l'aplicació, on es puguin anar guardant totes les característiques dels biofilms, així com els resultats de quantificació que s'han anat recollint.

Una última línia futura de treball seria pensar en la possibilitat de realitzar els càlculs de quantificació de les diferents imatges que componen el biofilm en paral·lel. D'aquesta manera es podria millora en eficiència d'execució d'alguna funció de quantificació, ja que alguns càlculs es poden realitzar al mateix temps sense la necessitat d'esperar els càlculs de la resta d'imatges de la sèrie.

7.6. Referències

Les referències citades són:

- [1] Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B. K. & Molin, S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*. 146:2395-2407.
- [2] Roth, S. D. 1982. Ray Casting for Modeling Solids. *Computer Graphics and Image Processing*. 18:109-144.
- [3] Wood, T. K, González Barrios, A. F, Herzberg, M., Lee, J. 2006. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:361–367.
- [4] Murga, R., Stewart, P. S. & Daly, D. 1995. Quantitative analysis of biofilm thickness variability. *Biotechnol. Bioeng.* 45:503-510.
- [5] Lewandowski, Z. 2000. Notes on Biofilm porosity. *Wat. Res.* 34(9):2620-2624.
- [6] Xavier, J. B., Schnell, A., Wuertz, S., Palmer, R. White, D. C & Almeida, J. S. 2001. Objective threshold selection procedure for segmentation of scanning laser confocal microscope images . *J. Microbiol. Meth.* 47:169-180.
- [7] Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G. & Lewandowski, Z. 2001. Evaluation of biofilm image thresholding methods. *Wat. Res.* 35(5):1149–1158.
- [8] Roldán M., Oliva F., González del Valle M., Saiz-Jiménez C. & Hernández-Mariné M. 2006. Does green light influence the fluorescence properties and structure of phototrophic biofilms? *Appl. Environ. Microbiology.* 72(4):3026-3031.
- [9] Mueller, L. N., de Brouwer, J. F. C., Almeida, J. S., Stal, L. J. & Xavier, J. B. 2006. Analysis of a marine phototrophic biofilm by confocal laser scanning microscopy using the new image quantification software PHLIP. *BMC Ecology.* 6:1.

Per a la realització del programa s'ha consultat la següent bibliografia:

Colt website. Open Source Libraries for High Performance Scientific and Technical Computing in Java.

<http://hoschek.home.cern.ch/hoschek/colt/V1.0.3/doc/overview-summary.html>.

Teniente, E., Costal, D. & Ribera, M., 2003. Enginyeria del Software. Especificació de sistemes orientats amb la notació uml. Col. Aula Politècnica, 23. Edicions de la Universitat Politècnica de Catalunya. pp. 146.

Da Coda al fine, <http://octave.sourceforge.net/coda/>

Gómez, C., Mayol, E., Olivé, A., Teniente, E. 2001. Enginyeria del Software Disseny I. Col. Aula Politècnica, 17. Edicions de la Universitat Politècnica de Catalunya. pp.132.

Hermanowicz, S. W. 2001. A simple 2D biofilm model yields a variety of morphological features. *Mathematical Biosciences*. 169:1-14.

Hermanowicz, S. W., Schindler, U. & Wilderer, P. A. 1995. Fractal structure of biofilms: new tools for investigation of morphology. *Water Sci. Technol.* 32:99-105.

Hermanowicz, S. W., Schlinder, U. & Wilderer, P. 1996. Anisotropic morphology and fractal dimensions of biofilms. *Wat. Res.* 30(3):753-755.

Heydorn, A., Ersboll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M. R., Nielsen, A. T., Givskov, M. & Molin, S. 2002. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development: Impact of Mutations in Genes Involved in Twitching Motility, Cell-to-Cell Signaling and Stationary-Phase Sigma Factor Expression. *Appl. Environ. Microbiology*. 68(4):2008-2017.

- Heydorn, A., Ersboll, B., Hentzer, M., Parsek, M. R., Givskov, M. & Molin, S. 2000. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology*. 146:2409-2415.
- Java Advanced Imaging API, <http://java.sun.com/products/java-media/jai/index.jsp>.
- Java Image FAQ, <http://www.geocities.com/marcoschmidt.geo/java-image-faq.html>.
- Java VTK Examples, <http://ij-plugins.sourceforge.net/vtk-examples/>.
- Java website, www.java.sun.com
- Octave website, <http://www.site.uottawa.ca/~adler/octave/>.
- Personal Computer-Base Scientific Visualization System, <http://www.futurevisions.net/pchen/pcvis/>
- Programming in Java Advanced Imaging, http://java.sun.com/products/java-media/jai/forDevelopers/jai1_0_1guide-unc/JAITOC.fm.html
- Sourceforge, Open Source software development website, <http://sourceforge.net/>.
- VTK website, The Visualization Toolkit, <http://public.kitware.com/VTK/index.php>.
- Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G. & Lewandowski, Z. 2000. Quantifying biofilm structure using image analysis. *J. Microbiol. Methods*. 39:109-119.
- Zhang T. C. & Bishop P. L. 1994. Density, porosity and pore structure of biofilms. *Wat. Res.* 28:2267-2277.

