

Modelización del crecimiento de una población microbiana en medio líquido y su implicación en el estudio de la morfología celular a través del análisis digital de imágenes

Modeling the growth of a microbial population in a liquid medium and its involvement of the study of cellular morphology through digital image analysis

Ángel Viteri, Mónica Blanco, Rosa Carbó, Marta Ginovart

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

angel.viteri.leon@gmail.com, monica.blanco@upc.edu, rosa.carbo@upc.edu, marta.ginovart@upc.edu

Abstract

*Cuando la levadura crece en un medio líquido rico en nutrientes genera una curva de crecimiento que presenta principalmente tres fases: fase de adaptación (o fase lag), fase exponencial (o fase log), y fase estacionaria. El modelo de Buchanan es un modelo lineal a trozos, simple pero suficientemente bueno para obtener estimaciones de los principales parámetros cinéticos de crecimiento microbiano. La morfometría de las levaduras que se reproducen por gemación (con células madre y células hija) informa sobre el estado de las poblaciones y su capacidad productiva. Se han analizado de forma conjunta resultados experimentales en relación al número de células de *S. cerevisiae* creciendo en un medio de cultivo líquido cerrado con glucosa y con dos concentraciones diferentes de oxígeno (condiciones aerobias y microaerófilas), y un conjunto de imágenes digitales tomadas de estas células creciendo. Las distribuciones de valores obtenidos para los parámetros morfológicos de las células (área, perímetro, diámetro mayor, diámetro menor, circularidad y elongación) se han relacionado con las distintas fases de crecimiento identificadas con el modelo Buchanan ajustado. La utilización de un modelo de crecimiento poblacional y los parámetros cinéticos estimados junto con el análisis de imágenes digitales de células individuales ha generado una aproximación muy atractiva del sistema, permitiendo conjugar conceptos matemáticos y biológicos a la vez que realizar un estudio a dos niveles distintos del sistema, a nivel poblacional y a nivel individual.*

*When the yeast is grown in a nutrient-rich liquid medium, its growth curve consists of three main phases: adaptation (or lag) phase, exponential (or log) phase and stationary phase. Buchanan's model is a piece-wise linear model which, although being a rather simple model, turns out to be good enough to estimate the main kinetic parameters of microbial growth. The morphometry of yeast cells, which can reproduce by budding (with mother cells and daughter cells), provides information about the state of yeast populations and their productive capacity. Experimental results in connection with the number of cells of *S. cerevisiae* growing in closed liquid culture with glucose, and under two different oxygen conditions, aerobic and microaerophilic, were jointly analysed with digital images of the growing cells. The observed distributions of the morphological parameters (area, perimeter, major diameter, minor diameter, circularity and elongation) were compared with the growth phases identified from the fitted model. The use of the Buchanan population growth model and the estimations of the kinetic parameters, along with analysis of digital images of the individual cells, proved to be an interesting approach that helped us to integrate mathematical and biological concepts and to perform the study at two levels: with populations and with individual cells.*

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, morfometría, crecimiento microbiano, modelo de Buchanan, análisis de imágenes.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, morphometry, microbial growth, Buchanan's model, image analysis.

1. Introducción

1.1. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Desde el punto de vista microbiológico y biotecnológico, las levaduras (hongos unicelulares) presentan diferentes características siendo su comportamiento diferente según el medio en que se cultivan y se fermentan (Gaspar et al., 2011). Se han utilizado a lo largo de la historia algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* y en concreto, *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 4), conocida como levadura de cerveza o levadura del pan debido a su empleo como fermento (Arias, 2012). Es una de las levaduras con mayor impacto económico y social, ya que es usada en las industrias agroalimentarias y en la producción de productos químicos y proteínas heterólogas (Cipollina, Vai, Porro & Hatzis, 2007), así como en la producción de etanol (Tibayrenc, Preziosi-Belloy & Ghommidh, 2011).

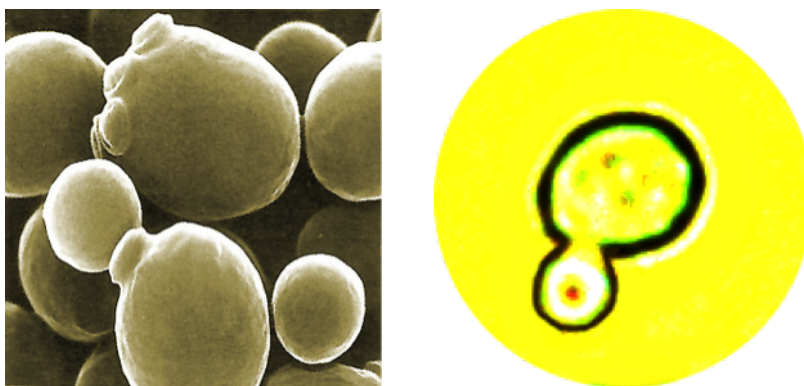


Figura 1: Izquierda: Micrografía electrónica de un conjunto de levaduras *S. cerevisiae* (obtenida de https://c2.staticflickr.com/4/3314/3507133086_b40acb2da1.jpg). Derecha: Imagen digital de una célula de levadura que muestra la reproducción por gemación, identificándose la célula madre y la futura célula hija (la gema).

Como todo microorganismo, *S. cerevisiae* tiene unas fases de crecimiento definidas y que, como la Figura 2 muestra, caracterizan la evolución temporal del tamaño de la población (Buchanan, Whiting & Damert, 1997):

- Fase de adaptación o fase lag (también a veces denominada fase de latencia): Durante la cual las levaduras adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (nutrientes, pH, temperatura, etc.) para poder iniciar el crecimiento exponencial.
- Fase exponencial o fase logarítmica: La velocidad de crecimiento es la máxima y el tiempo de generación es el mínimo. Durante esta fase, las levaduras consumen los nutrientes a mayor velocidad.
- Fase estacionaria: No se incrementa el número de levaduras. Las levaduras entran en esta fase porque se acaba algún nutriente esencial del medio, y porque los productos residuales que se han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito o también por la presencia de competidores que limitan su crecimiento.
- Fase de muerte: Se produce una reducción del número de levaduras viables del cultivo.

Son diversos los modelos que se pueden utilizar para describir la curva de crecimiento microbiano en un cultivo cerrado con medio líquido, y entre ellos destaca por su simplicidad y uso el

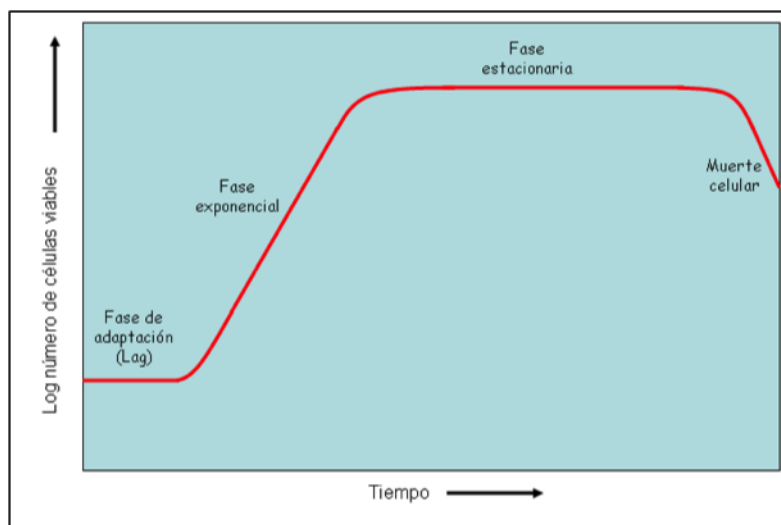


Figura 2: Curva de crecimiento típica de una población microbiana en un cultivo cerrado en medio líquido (obtenida de https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c2/Curva_de_crecimiento.png).

modelo lineal a trozos de tres fases, conocido también como modelo de Buchanan (Buchanan et al. 1997).

Según sean los requerimientos de oxígeno, los microorganismos se pueden clasificar como aerobios, microaerófilos, anaerobios facultativos, anaerobios estrictos y aerotolerantes. Los aerobios necesitan oxígeno como aceptor final de electrones para crecer aeróbicamente. Los microaerófilos necesitan relativamente bajas cantidades de oxígeno para realizar determinadas funciones celulares, sin embargo el oxígeno no debe superar el 2 – 10 %v/v (compárese con el nivel atmosférico de 21 %v/v). Los microorganismos anaerobios facultativos tienen doble metabolismo, pudiendo crecer en presencia de oxígeno y también sin oxígeno; los anaerobios aerotolerantes pueden crecer en presencia de oxígeno pero no lo utilizan, sólo realizan metabolismo fermentativo. Y los anaerobios estrictos mueren en presencia de oxígeno. La molécula de oxígeno, O₂, es esencial para los organismos que crecen por respiración aeróbica y aunque la fermentación es un término que ha sido aplicado sobre todo en procesos anaeróbicos, donde los organismos no utilizan oxígeno molecular en la respiración, resulta que incluso esos organismos generalmente requieren una fuente de este elemento (Bamforth, 2007). *S. cerevisiae* es una levadura anaeróbica facultativa, por lo que puede crecer en distintas concentraciones de oxígeno y también en su ausencia. En presencia de oxígeno suele presentar metabolismo oxidativo. Mientras que en ausencia de oxígeno presenta metabolismo fermentativo, siendo la fermentación alcohólica la más utilizada en distintos procesos industriales. En ellos, las condiciones del entorno varían y *Saccharomyces* debe adaptarse a los cambios ambientales viéndose obligada a pasar en poco tiempo de condiciones aerobias a microaerófilas y a anaerobias, cambiando el tipo de metabolismo en relación a la concentración de oxígeno presente. Comprender su crecimiento respirofermentativo es importante para optimizar los diferentes procesos biotecnológicos en los que esta levadura está implicada (Portell, Ginovart, Carbó & Vives-Rego, 2011; Carbó et al., 2015).

El ciclo de vida de la levadura *S. cerevisiae* alterna dos fases, una haploide y otra diploide. Las células haploides presentan dos posibilidades en su ciclo biológico: un ciclo de reproducción vegetativo, por el que la célula se divide asexualmente para dar dos células, y un ciclo sexual, en el que dos células de tipo sexual opuesto se fusionan para dar lugar a una célula diploide

que entra de nuevo en un ciclo de división vegetativo. Durante el ciclo de vida vegetativo, la levadura se divide por gemación dejando en su superficie celular las cicatrices que evidencian la consecución este proceso (Figura 4). La célula hija inicia su crecimiento a partir de una gema formada por la célula madre, y cuando la gema alcanza un tamaño crítico, se produce la citoquinesis (división de los orgánulos y otros componentes citoplasmáticos), septación y separación de las dos células.

1.2. Morfometría

La morfología o estudio de la estructura de un organismo y de sus respectivas características incluye tanto aspectos de la apariencia externa (forma, color) como aspectos de su estructura interna, juega un papel importante en muchos estudios biológicos. Multitud de procesos biológicos producen diferencias entre individuos, que pueden indicar los distintos papeles funcionales de las mismas estructuras, o las diferentes respuestas a determinadas presiones selectivas, así como diferencias en los procesos de crecimiento. La morfología descriptiva se encarga de la descripción y comparación de las formas orgánicas y el análisis morfológico nos ayuda a comprender las causas de las variaciones en el fenotipo (Zelditch, Swiderski, Sheets & Fink, 2004). La forma de los organismos puede cambiar como consecuencia del crecimiento, envejecimiento, tratamiento experimental o evolución, entre otras razones.

La morfometría es una rama de la morfología encargada de cuantificar la morfología de los organismos. Con el avance de la tecnología y la estadística, la descripción pasó a la cuantificación y adquirió términos de mayor complejidad, donde no solo se buscaba comparar parámetros entre grupos de estudio y control, sino también relaciones entre éstos, ya que era una manera de encontrar asociaciones que permitieran explicar las diferencias observadas (Toro, Manríquez & Suazo, 2010). La morfometría comprende el estudio cuantitativo de la variación morfológica y su covariación con otras variables (Bookstein, 1997). El término morfometría involucra los métodos usados para la descripción de la forma de los organismos y al análisis estadístico utilizado con los datos conseguidos (Rohlf & Marcus, 1993).

En un estudio de morfometría con microorganismos unicelulares, los componentes de tamaño y forma se obtienen a partir de un conjunto de variables cuantitativas tales como longitud, anchura, altura, ángulos, etc. sobre las cuales se aplican análisis estadísticos con el propósito de resumir el cambio que se ha producido en el objeto de estudio, la célula microbiana (Bookstein, 1997). El análisis morfométrico consta de tres etapas fundamentales: procesamiento de imágenes, obtención de variables y análisis estadístico (Toro et al., 2010).

En el caso de las células de *S. cerevisiae* se observan esferoidales, elipsoidales y a veces cilíndricas. Sus dimensiones se encuentran entre 2.5 – 10 micras de ancho y 4.5 – 21 micras de largo (Garzón & Hernández, 2009). Tiene un volumen medio de $70 \mu\text{m}^3$ (Groves, Falsont, Le Mairet & Tanner, 1996). Aplicando la fórmula del volumen de una esfera ($V = 4\pi r^3/3$) y asumiendo una geometría esférica para un individuo, podemos obtener un radio de 2.56 μm y un diámetro de 5.12 μm . Así mismo, podemos usar la expresión del área de un círculo ($A = \pi r^2$) y asignar una área de proyección en un plano de aproximadamente $20.59 \mu\text{m}^2$. Hay que tener en cuenta que la tasa de crecimiento, mutación y condiciones ambientales también afectan el tamaño y forma de la levadura. Y que la morfología de estas células está íntimamente relacionada con su estado fisiológico (Coelho et al., 2004) y su estado en el ciclo celular.

1.3. Proceso digital de imágenes microscópicas

La cuantificación de objetos presentes en imágenes microscópicas es una tarea a la que investigadores de diversos campos de la ciencia se han de enfrentar habitualmente. Reconocer, contar y medir tamaño, forma, posición, densidad y otro tipo de atributos de determinados objetos presentes en una imagen, es algo que, actualmente, está al alcance de cualquier ordenador personal complementado con un hardware y software específico. Estas tareas hoy en día se están realizando de un modo mucho más rápido, preciso y reproducible que hace unos años gracias al gran avance tecnológico.

Una imagen puede considerarse como un objeto plano cuya intensidad luminosa y color puede variar de un punto a otro. Si se trata de imágenes monocromas (blanco y negro), se puede representar como una función continua $f(x, y)$ donde (x, y) son sus coordenadas y el valor f es proporcional a la intensidad luminosa (nivel de gris) en ese punto. Para obtener una imagen que pueda ser tratada por el ordenador es preciso someter la función $f(x, y)$ a un proceso de discretización tanto en sus coordenadas como en su intensidad, la digitalización. Por consiguiente una imagen digital es una imagen $f(x, y)$ que ha sido discretizada en sus coordenadas espaciales y en su intensidad luminosa. Cada elemento en que se divide la imagen recibe el nombre de píxel (*picture element*), y viene acompañado por un valor, el número de niveles de gris. Las dimensiones de la matriz, número de filas por número de columnas, asociada a la imagen nos condicionan la capacidad de resolución de la imagen digital. En caso de las imágenes a color la intensidad puede considerarse como un vector tridimensional cuyas componentes son las intensidades en las tres bandas espectrales: rojo, verde y azul (Martínez & Sampedro, 1994).

Todo sistema de proceso de imágenes consta de: i) Sistema de adquisición de la imagen, normalmente se trata de dispositivos electrónicos en blanco y negro o color; ii) Procesador de imágenes, que se encarga de la digitalización de las imágenes, su almacenamiento en memoria y su visualización mediante el monitor apropiado; iii) Ordenador de control que contiene los programas de proceso de imágenes y se encarga de su ejecución.

La cuantificación de determinados objetos presentes en una imagen exige la realización de una secuencia de tareas en el proceso digital de imágenes (Digitalización, Procesamiento de imágenes, Clasificación y extracción de características, Imagen binaria, Cuantificación). Estos procesos se realizan sobre la imagen original para que el ordenador sea capaz de reconocer de un modo preciso los objetos a medir.

Digitalización

La digitalización es el paso de imágenes analógicas a forma digital por medio de un convertidor analógico a digital, teniendo en consideración que la imagen digital no pierda resolución con respecto a la imagen original. El proceso consiste en la transformación de la información continua contenida en la imagen real (con un número casi infinito de matices de luz y con un continuo de detalles gráficos), en una información discreta (que forma una imagen dividida en un número limitado de píxeles, cada uno con un nivel de iluminación discreto dentro de un rango finito de intensidad lumínica). El número de píxeles y el rango de nivel de gris son dos características del sistema de digitalización utilizado. Por lo general se utiliza un octeto (8 bits) para almacenar cada píxel, por lo que las intensidades de las imágenes se cuantifican en $2^8 = 256$ niveles por píxel (Pertusa, 2010).

Procesamiento de imágenes

Comprende una serie de operaciones cuyo origen es una imagen gris y cuyo resultado es otra imagen gris. El valor del píxel en la imagen de salida puede ser función del valor que tenía en la imagen de entrada, de los valores de sus vecinos o del valor de todos los puntos de la imagen de entrada. El objetivo es procesar una imagen de tal modo que la resultante sea más adecuada que la imagen original para una aplicación específica. Las funciones de este grupo se engloban en tres apartados:

- Operaciones puntuales donde el valor de un píxel en la imagen de salida depende del valor de ese píxel en la original, como las denominadas transformaciones de histograma, realce, linearización y escalado.
- Operaciones locales donde el valor del píxel en la imagen de salida es función del de sus vecinos más próximos y del suyo propio en la imagen original, para mejorar la calidad de la imagen o resaltar aspectos de la misma que nos interesan.
- Operaciones globales donde el valor del píxel resultante es función del valor de todos los píxeles de la imagen original, como el cálculo de la transformada de Fourier utilizada para pasar la imagen del dominio espacial al dominio de frecuencias.

Clasificación y extracción de características

Es el proceso por el cual los píxeles pertenecientes a una imagen son divididos normalmente en dos clases: objeto de interés y fondo. Un método sencillo de clasificación es el denominado *Thresholding* que se utiliza para convertir una imagen de niveles de gris en una imagen binaria. Cada píxel es clasificado como **ON** para el blanco (valor 255) u **OFF** para el negro (valor 0) dependiendo de si su nivel de gris excede o no un valor umbral específico.

Imagen binaria

La imagen binaria resultante del proceso de discriminación anterior puede que no represente perfectamente los objetos de interés debido a problemas inherentes en la imagen original. Con el fin de solucionar estos problemas se pueden aplicar distintos operadores morfológicos para separar zonas, cribar áreas de determinados tamaños, erosionar o dilatar regiones, mirar conectividades, extraer bordes, etc.

Dos de las operaciones morfológicas más utilizadas en análisis de imágenes son la erosión y la dilatación (Figura 3). La erosión consiste en examinar cada píxel y cambiarlo de **ON** a **OFF** si alguno de sus vecinos está en **OFF**. Normalmente se utilizan como vecinos los ocho que rodean al píxel examinado, aunque para algunas aplicaciones se pueden utilizar conectividades de 4 vecinos (los 2 verticales y los 2 horizontales) e incluso conectividades de 2 vecinos (los verticales o los horizontales). En cambio la dilatación es el proceso inverso, consiste en cambiar los píxeles de **OFF** a **ON** si alguno de sus vecinos está **ON**. Al resultado de una erosión más una dilatación se le denomina apertura (*Opening*). El nombre proviene de la tendencia de esta secuencia de operaciones a separar (abrir) puentes de unión entre objetos próximos o a abrir cavidades próximas al borde. La operación opuesta (dilatación más erosión) es denominada cierre (*Closing*) y puede usarse para conectar objetos muy próximos o para rellenar pequeños huecos. La Figura 3 muestra un ejemplo de los resultados de estas acciones sobre un objeto.

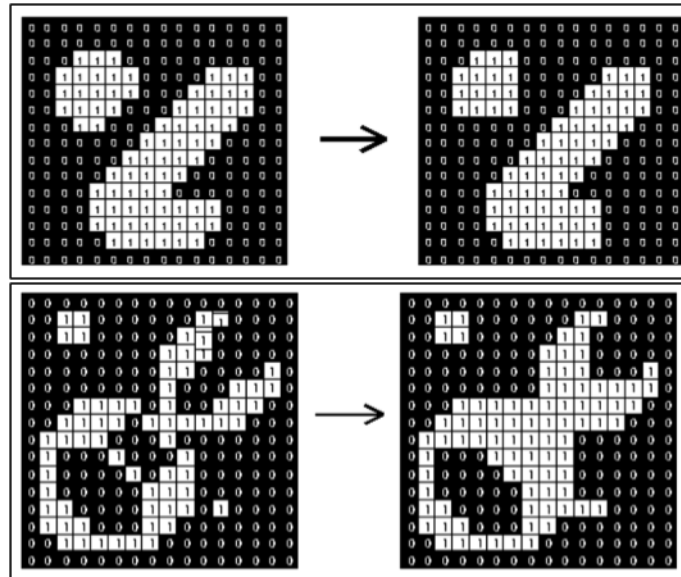


Figura 3: Dos ejemplos en que se muestra el efecto que tienen las operaciones de apertura (superior) y cierre (inferior). Obtenido de <http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/matmorph.htm> (<http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/figs/openbin.gif>, <http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/figs/closebin.gif>)

Cuantificación

Una vez que las imágenes binarias muestran de una forma individualizada los objetos que deseamos cuantificar, se procederá a su identificación y medida. Los parámetros a medir se pueden clasificar en morfométricos (aquellos que cuantifican tamaño, forma, orientación y relaciones espaciales de los objetos) y densitométricos (aquellos que cuantifican nivel de gris o parámetros derivados del nivel de gris como transmitancia, densidad óptica, etc.).

1.4. El programa ImageJ

ImageJ es un programa Java de análisis y procesamiento de imágenes digitales de dominio público desarrollado por el Instituto Nacional de la Salud de Maryland de los Estados Unidos (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Se ejecuta, ya sea como un *applet* (componente de una aplicación que se ejecuta en el contexto de otro programa) en línea, o como una aplicación descargable en un ordenador (con Windows, Mac OSX o Linux). Permite mostrar, editar, analizar, procesar, guardar e imprimir imágenes de 8, 16 y 32 bits, y leer muchos formatos de imágenes (tiff, gif, jpeg, bmp, dicom, fits y raw). Puede medir distancias y ángulos entre píxeles, calcular áreas, crear histogramas de densidad y hacer transformaciones geométricas tales como escala, rotación y volteo.

El usuario también tiene la posibilidad de diseñar algoritmos para el tratamiento y análisis de las imágenes en varios lenguajes de programación (Java, JavaScript, Python, Ruby, Clojure, etc.), o simplemente implementar una macro en lenguaje del propio programa ImageJ. El programa ImageJ fue diseñado con una arquitectura abierta que proporciona una extensibilidad gracias a los *plugins* de Java. Estos *plugins* pueden ser desarrollados por el usuario según sus necesidades y permiten resolver casi cualquier problema de procesamiento de imágenes o de análisis. ImageJ dispone de una extensa librería de *plugins* que muestran ejemplos de resolución de diversos problemas.

Fiji es un paquete de procesamiento de imágenes basado en el programa ImageJ (Figura 4), que agrupa una serie de *plugins* instalados y organizados en un menú bien estructurado y coherente. Este paquete está enfocado para ser utilizado en la investigación y tiene varias ventajas para el usuario, ya que es muy fácil de instalar y dispone de una función de actualización automática. Se puede descargar por Internet a través de su página oficial (<http://fiji.sc/Fiji>) y también es de dominio público. Proporciona una amplia documentación en forma de descripciones detalladas de algoritmo y tutoriales. La Figura 5 muestra cómo al abrir con ImageJ una imagen digital de células de levadura que va a ser procesada, se despliega en pantalla la imagen seleccionada mostrando en la parte superior izquierda las características que ésta posee.

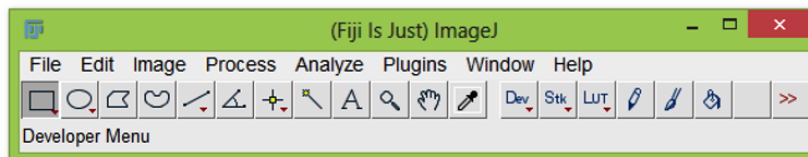


Figura 4: Interface de Fiji para Windows.

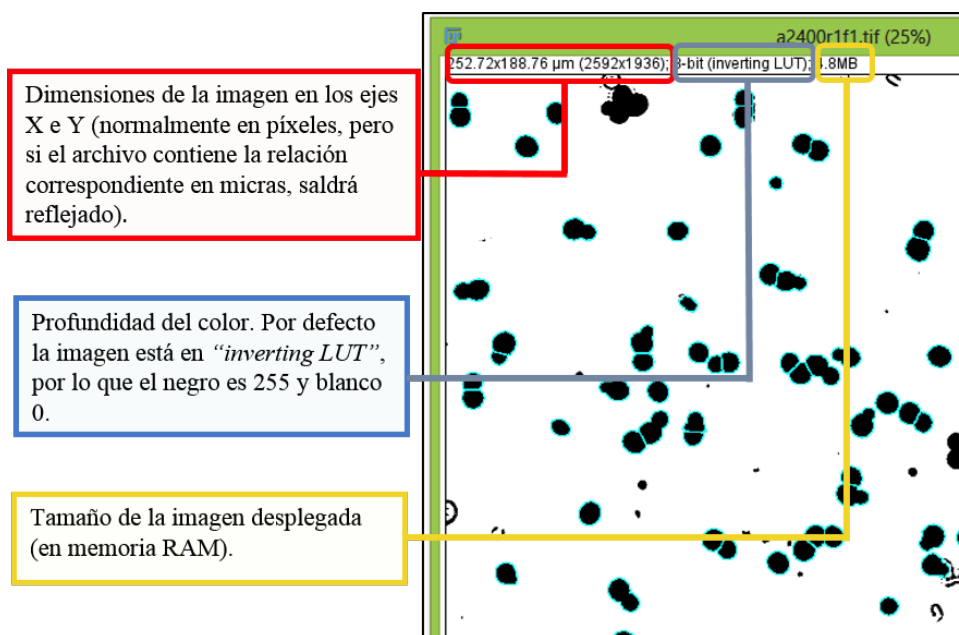


Figura 5: Imagen digital abierta con el programa Fiji para ser procesada donde se pueden ver las células de levadura

2. Objetivos

El objetivo fundamental de este trabajo es el tratamiento y análisis de imágenes de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se encuentran creciendo en cultivos cerrados, con dos concentraciones de oxígeno distintas, y cómo información sobre estas imágenes individuales de células se puede conectar con las fases de crecimiento y los parámetros cinéticos que caracterizan a la evolución temporal de la población.

Este objetivo general se ha desarrollado a través de los siguientes objetivos específicos:

Objetivos metodológicos

- ✓ Familiarizarse con un programa de libre distribución para el análisis de imágenes digitales como ImageJ para establecer un protocolo general de trabajo relativo al procesamiento y análisis de imágenes digitales para microorganismos unicelulares como las levaduras.
- ✓ Analizar mediante este programa un conjunto de imágenes digitales de células de *Saccharomyces cerevisiae* creciendo en dos condiciones de niveles de oxígeno diferentes (condiciones aerobias y microaerófilas) conseguidas durante la realización de un trabajo experimental previo (Ribas & Pérez, 2012).

Objetivos de interés académico

- ✓ Caracterizar y analizar las evoluciones temporales del crecimiento de estas poblaciones de levadura en condiciones aerobias y condiciones microaerófilas a través del modelo lineal a trozos de crecimiento microbiano de Buchanan, obteniendo para cada uno de los ensayos las estimaciones de los correspondientes parámetros cinéticos.
- ✓ Obtener y analizar los resultados de diferentes parámetros morfométricos directos y sus derivados (o transformados) del análisis digital de las células de levadura obtenidas de estos cultivos en distintas fases de la evolución temporal de la población y para dos condiciones de crecimiento.
- ✓ Comparar los parámetros cinéticos obtenidos del modelo Buchanan y las distribuciones de los parámetros morfológicos analizados de las células de levadura entre las distintas fases de crecimiento (adaptación, exponencial y estacionaria), y entre las dos condiciones de crecimiento (aerobio y microaerófilo), identificando y conectando estados individuales de los microorganismos y fases poblacionales microbianas observadas.

3. Antecedentes del trabajo experimental realizado

Dentro de las numerosas cepas comerciales, la usada en este trabajo fue *Saccharomyces (cerevisiae) bayanus DV10*, levadura seca y activa, seleccionada por la Station Oenotechnique de Champagne (Epernay-Francia). Es una cepa que se adapta rápidamente a condiciones enológicas difíciles, capaz de fermentar mostos pobres en nutrientes y vinos base para producir vinos espumosos. Las imágenes digitales se obtuvieron durante la realización del Trabajo Final de Grado de Julen Rivas y Adrián Pérez, y dirigido por las profesoras Dra. Rosa Carbó y Dra. Marta Ginovart, titulado “Desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones aeróbicas y microaerófilas” defendido en abril del 2012 en la Escuela Superior de Agricultura de Barcelona (Universitat Politècnica de Catalunya). Consideramos que para los propósitos de este trabajo no son de interés los detalles específicos de los experimentos como la cepa de levadura, medio de cultivo, preparación del precultivo, o siembra del inóculo. No obstante, para el lector interesado éstos se pueden encontrar en Rivas & Pérez (2012) que bajo petición los autores pueden remitir, y también en el trabajo Carbó et al. (2015). Se realizaron tomas de muestra cada 90 minutos en 4 repeticiones de cultivos en condiciones aerobias y en 4 réplicas de cultivos en condiciones microaerófilas, durante las 35 horas aproximadamente que duraron los experimentos. Para la obtención de imágenes se utilizó un microscopio óptico Nikon Eclipse Lv100 equipado con una cámara digital Nikon Infinity 1 Tv lens C-0.45x, con un objetivo de la misma marca y modelo Lu Plan Fuer 50x/0.08° (apertura numérica) y acoplado a un ordenador con el software Perfect Image v7.7, que permite al usuario ver en directo la imagen del microscopio. Con el objetivo seleccionado, aparece la relación entre un píxel y su medida, que es necesario conocer para hacer el análisis de imagen. Las imágenes fueron tomadas con la escala de 1 píxel = 0.0975 μm . Para

asegurar que se podría disponer de material suficiente para analizar posteriormente se realizaron 3 fotografías por cada una de las preparaciones. Para tener las fotografías correctamente clasificadas y ordenadas es conveniente guardarlas con un nombre que nos ofrezca toda la información necesaria. Por ejemplo, con un determinado criterio se asigna nombre al fichero, chhmmrf.jpg, donde “c” se refiere a las condiciones de crecimiento (a=aerobias y m=microaerófilas); “hhmm” al tiempo transcurrido desde el inicio del experimento en horas (hh) y minutos (mm); “r” al número de repetición (r1, r2, r3 o r4); “f” al número de fotografía (f1, f2 o f3) como se muestra en la Figura 6.

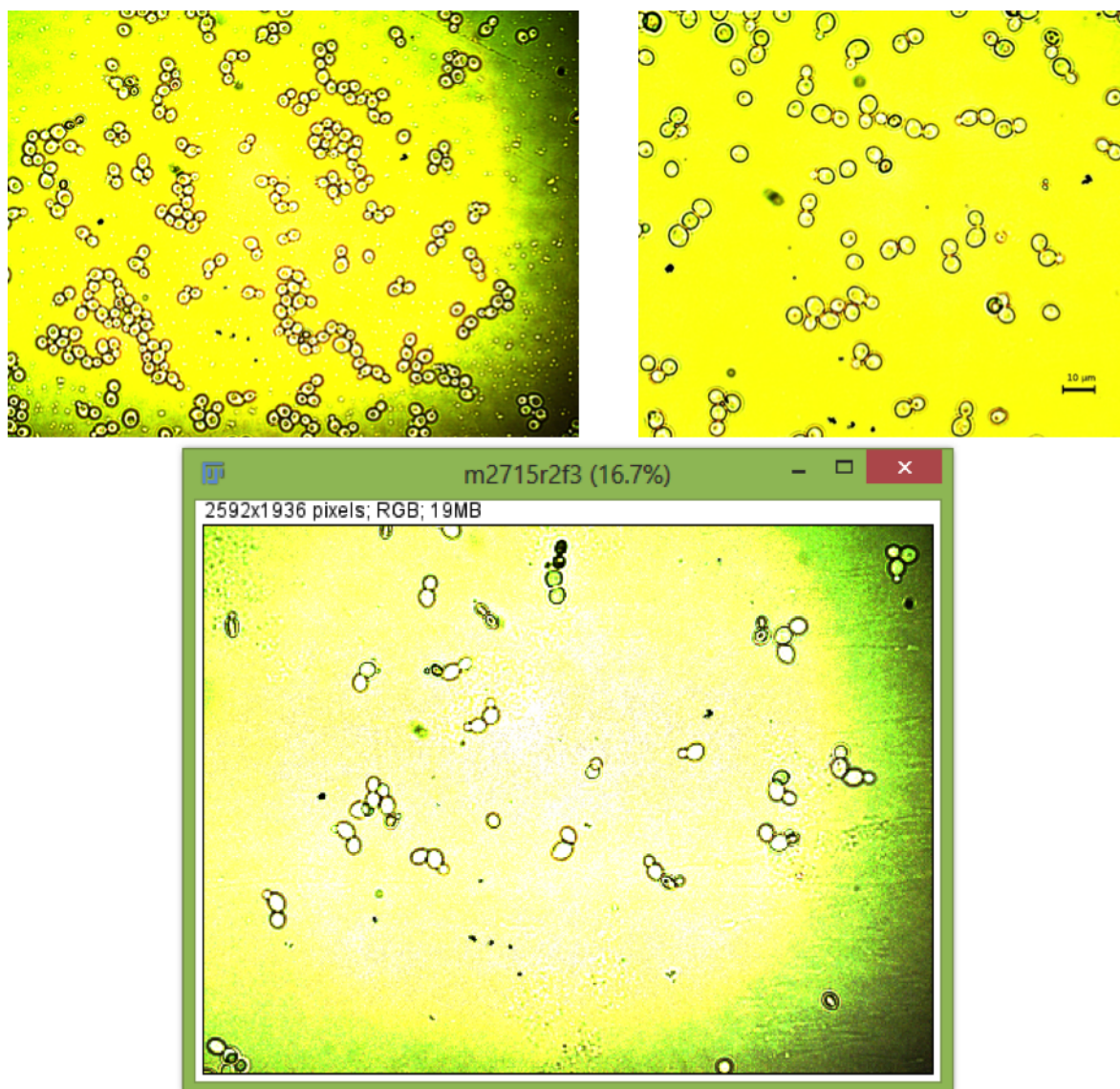


Figura 6: Superior: Dos ejemplos de fotografías disponibles para analizar. Inferior: Fotografía identificada como m2715r2f3.jpg que corresponde a la tercera foto de la segunda repetición en condiciones de crecimiento microaerófilas con el tiempo transcurrido desde el inicio del experimento de 27 horas y 15 minutos (Rivas & Pérez, 2012).

El trabajo que se presenta en este artículo sobre el análisis de estas imágenes digitales forma parte del Trabajo Final de Grado de Ingeniería de Sistemas Biológicos de Ángel Viteri, el cual fue dirigido por las profesoras Dra. Mónica Blanco y Dra. Marta Ginovart, con título

“Tratamiento y análisis de imágenes digitales de células de *Saccharomyces (cerevisiae) bayanus* creciendo en dos concentraciones de oxígeno distintas”, y se defendió en enero del 2016 en la Escuela Superior de Agricultura de Barcelona (Universitat Politècnica de Catalunya).

4. Protocolo diseñado para el tratamiento de imágenes

El tratamiento de imágenes se realizó con el programa libre ImageJ (Fiji). Para analizar la imagen final se necesita realizar una serie de pasos previos que involucren la limpieza de la imagen inicial. Esto se consigue quitando las imperfecciones y suciedad del microscopio utilizado para la captura de la imagen, así como las partículas que ensucian la muestra, o incluso las rallas incisivas del portaobjetos que han quedado grabadas y que deterioran la imagen. Luego se pasa la imagen a binaria, es decir, todos los píxeles tienen que ser blancos o negros (representando el fondo en blanco y las células u objetos de interés en negro). Por último, las células u objetos deben de estar cerradas y separadas para que el programa pueda reconocer cada una como una partícula diferente.

Los pasos a seguir para la obtención de la imagen final a partir de una imagen original son los siguientes: establecimiento de escala, duplicación de imagen y reducción de ruido, conversión de la imagen a 8 bits, mejoramiento del contraste, ajuste del umbral, conversión de la imagen a binario, cierre automático de objetos-células, rellenar agujeros, separación de células, y cierre manual de células.

4.1. Establecer la escala

La relación entre μm y píxel de todas las imágenes debe ser la misma y que, como ya se indicó, debe ser $0.0975 \mu\text{m}/\text{píxel}$ (Figura 7).

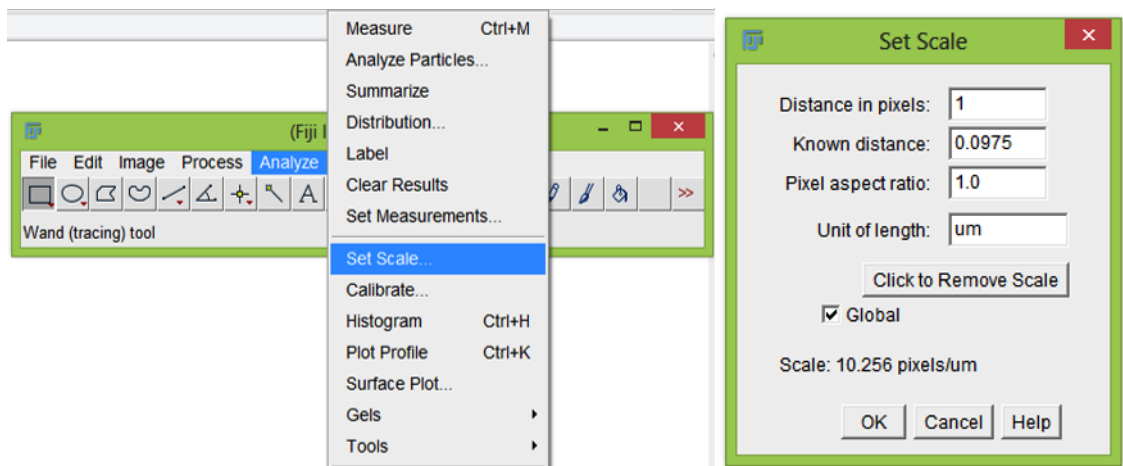


Figura 7: Opción “Set Scale” del programa ImageJ. Con “Global” establecemos que todas las imágenes abiertas con el programa tengan la misma escala.

4.2. Duplicar la imagen y reducir ruido

Se duplica la imagen original y se la difumina para obtener el fondo, sin llegar a apreciar las células de interés. Luego se realiza la operación resta de la imagen original con la imagen duplicada-difuminada para obtener una nueva imagen con las células más definidas (Figura 8).

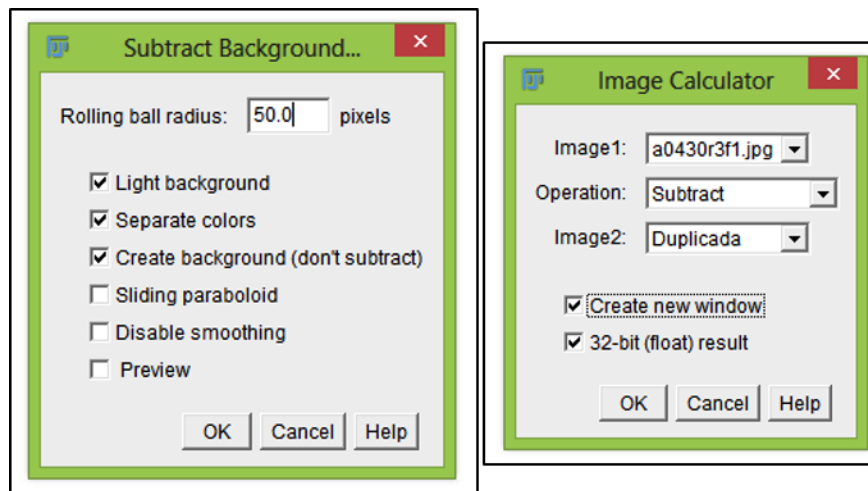


Figura 8: Opción “Subtract Background” (con valor 50, el más adecuado después de diversas pruebas) y opción “Image Calculator” del programa ImageJ.

4.3. Convertir la imagen a 8 bits

Cambio del formato de la imagen resultante de 32 bits a 8 bits (Figura 9). Al tener la imagen en 8 bits tendremos 256 niveles de gris que están comprendidos en un rango de 0 a 255.

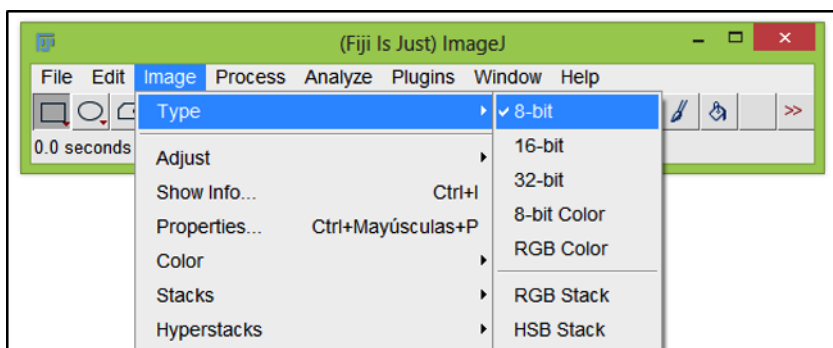


Figura 9: Opción “8-bit” del programa ImageJ.

4.4. Mejorar el contraste

Conseguimos resaltar las células de interés con el contraste. Utilizamos “Saturated pixels” de la opción “Enhance Contrast” para determinar el número de píxeles que se van a saturar, es decir, hacerlos más intensos. Sabiendo que se modificará la intensidad de color, también usamos “Normalize” para recalcular los valores de gris de la imagen y volverlos a ubicar en el rango de 0 a 255 (Figura 10).

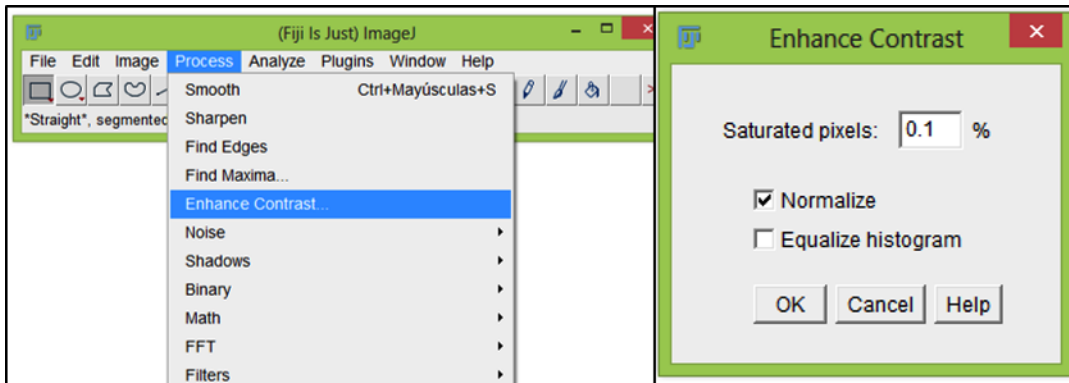


Figura 10: Opción “Enhance Contrast” del programa ImageJ.

4.5. Ajustar el umbral

Los valores del umbral inferior y superior, segmentando la imagen de escala de grises en células (u objetos) de interés y fondo se pueden fijar: el umbral inferior, por debajo del cual el sistema de captación no resulta estimulado, y del cual no tenemos imagen visible sino una pantalla en negro, y el umbral superior, por encima del cual es indiferente que la intensidad de luz sea mayor que dicho límite (Pertusa, 2010). La opción “Auto Threshold” de “Adjust” ajusta de forma automática (Figura 11). Con la opción “White objects on black background” la imagen tendrá únicamente dos valores posibles para cada píxel, 0 y 255 (en una escala de 8 bits) que representan el blanco y el negro respectivamente. Este procedimiento se lo conoce como “Inverting LUT” debido a que los valores para blanco y negro están invertidos. Una LUT o “Look Up Table” es un método por el cual podemos variar las características de una imagen al retocar sus píxeles (pseudocolorear) ya que hay una tabla de valores que modifican los colores de entrada para conseguir una salida determinada.

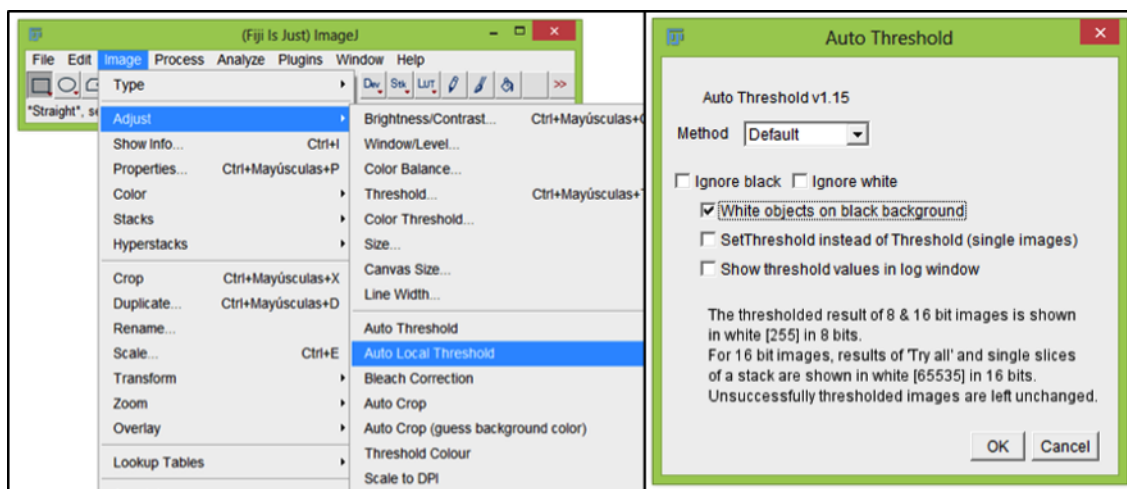


Figura 11: Opción “Auto Threshold” del programa ImageJ.

4.6. Convertir la imagen a binario

Se convierte una imagen a blanco y negro (Figura 13). Antes de este proceso, los valores de los píxeles estaban representados entre un rango de 0 y 255 en la escala de niveles de gris, sin embargo los valores de gris no son relevantes en esta etapa del proceso, mientras que sí lo es el hecho de que se encuentren en ON u OFF ya que cualquier operación que se realice en los píxeles quedarán clasificadas en dos categorías. Este procedimiento consiste en asignar dos nuevos valores a los niveles de gris con que se representa la imagen binaria, 1 o 0 u ON y OFF. A partir de ahora los niveles de los píxeles no se verán como valores extremos de la escala de niveles de gris, sino como píxeles de interés o sin interés (Pertusa, 2010).

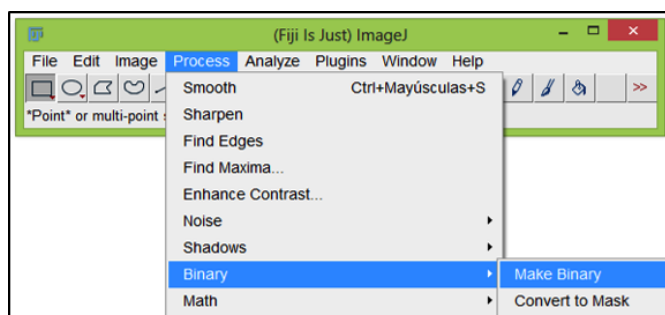


Figura 12: Opción “Make binary” del programa ImageJ.

4.7. Cerrar objetos-células

Se realiza la operación de cierre que encadena dos operaciones, dilatación y erosión. La primera es una dilatación en la que se agregan píxeles nuevos a uno ya existente por todo su alrededor y luego se ejecuta una erosión, donde se eliminan los píxeles que no tiene vecinos en su periferia (Figura 13).

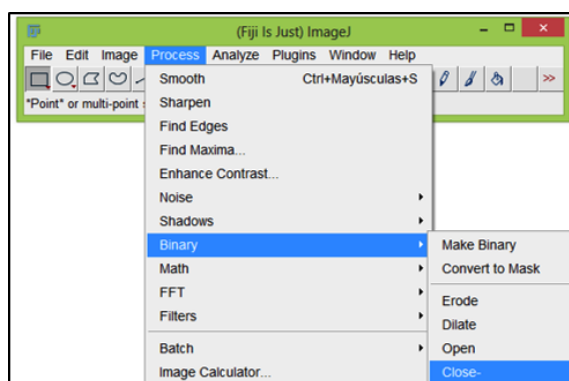


Figura 13: Opción “Close-” del programa ImageJ como subopción de “Binary”.

4.8. Rellenar agujeros

Se trata de una dilatación condicionada, únicamente se dilatan los píxeles que delimitan las regiones internas de los objetos, de aquellas células que necesitan ser rellenadas para ser consideradas correctamente (Figura 14).

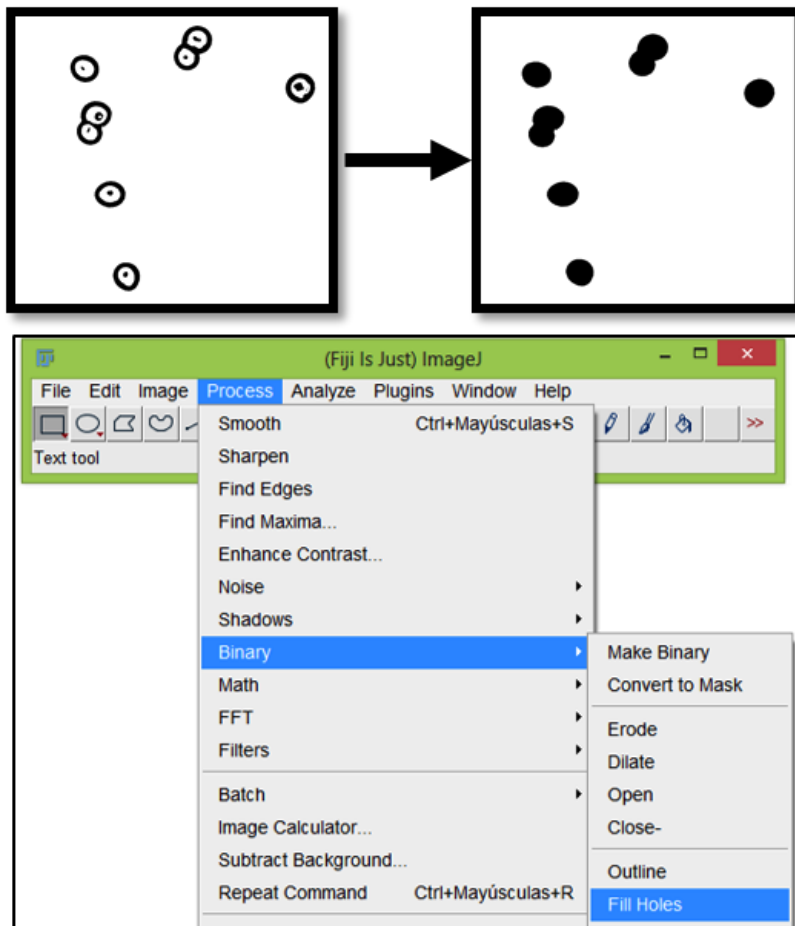


Figura 14: Opción “Fill Holes” del programa ImageJ como subopción de “Binary”.

4.9. Separar células

Los objetos que se encuentran conectados y que deberían estar separados se pueden separar erosionando la línea de píxeles que forma el límite de ambas células (Figura 15). Se eliminan aquellas porciones que se encuentran entre dos partículas contiguas, reconstruyendo las partículas desde sus centros, pero sin adicionar los píxeles que corresponden a las capas comunes (Pertusa, 2010).

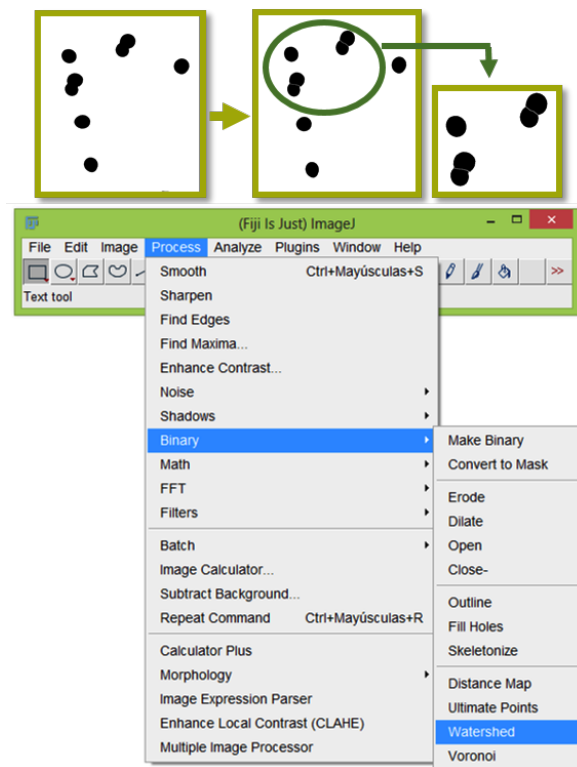


Figura 15: Opción “Watershed” del programa ImageJ como subopción de “Binary”.

4.10. Cerrar células manualmente

En ocasiones el programa ImageJ de forma automática separaba las células madres y las gemas (células hijas) sin que en la imagen original se visualizará dicha separación. En esos casos se procedió a realizar un cierre de células de forma manual (Figura 16).

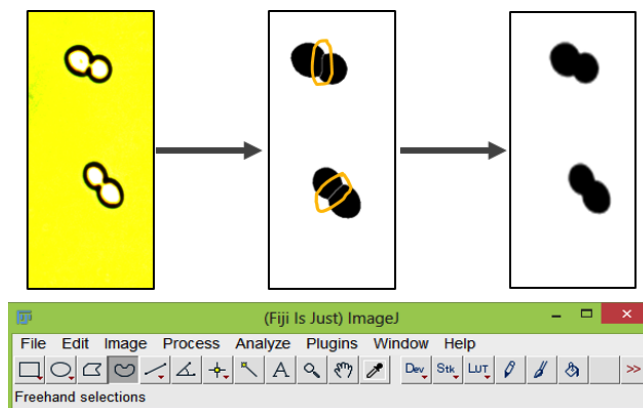


Figura 16: Opción “Freehand Selection Tool” del programa ImageJ.

Se pueden escoger diferentes variables morfológicas para medir o cuantificar las células (Figura 17) y los resultados se obtienen del programa directamente en micras (μm) ya que la calibración se realizó previamente. De entre las diversas opciones que se pueden escoger, los parámetros morfológicos medidos (directos) y utilizados en este trabajo son el área de la super-

ficie seleccionada y su perímetro o longitud del contorno exterior de la superficie seleccionada, así como el diámetro mayor y el diámetro menor de la elipse que ajusta a la célula. De entre los descriptores de forma que se pueden obtener a partir de estos parámetros directos se utilizó la “Circularidad” y la “Elongación” (o Relación de aspecto).

La circularidad es una medida de cuánto se acerca la superficie seleccionada a un círculo y utiliza el área y el perímetro (con valores de 1 a 0, donde el valor 1 indica un círculo).

$$\text{Circularidad} = 4\pi * (\text{Área}/\text{Perímetro}^2)$$

La relación de aspecto (AR) o elongación es el cociente entre las longitudes de los ejes mayor y menor de la elipse que se ajusta a la superficie seleccionada (con valores mayores a 1, donde 1 indica un círculo).

$$\text{Elongación} = \text{Diámetro}_{\text{máx}}/\text{Diámetro}_{\text{mín}} = (\text{Eje mayor})/(\text{Eje menor})$$

Con la cuantificación de los parámetros escogidos y los ficheros de datos obtenidos se puede iniciar el análisis correspondiente (Figura 17).

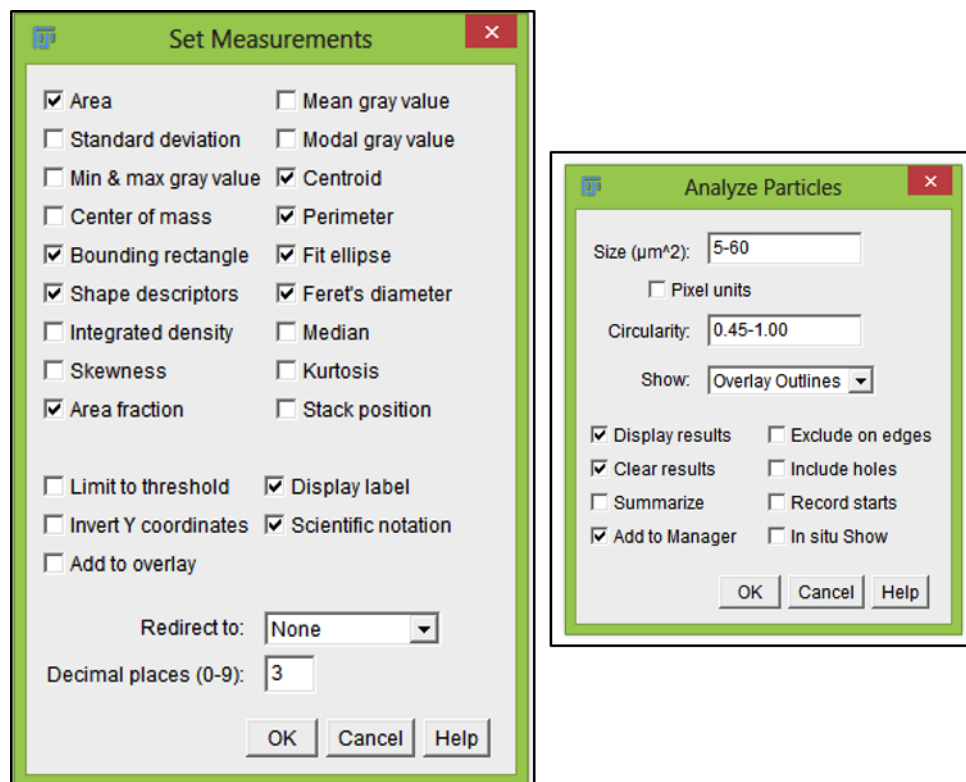


Figura 17: Opción “Set Measurements” de “Analyze” del programa ImageJ con los parámetros morfológicos disponibles y seleccionados, y la opción “Analyze Particles” en que se puede fijar el rango de área o el de la circularidad de las células que se van a medir, y donde se puede escoger la manera de mostrar y guardar los resultados numéricos obtenidos.

5. Análisis de datos a nivel de población microbiana y a nivel individual de célula de levadura

La modelización, desde su definición más amplia, es una herramienta muy necesaria para representar, analizar y discutir cuestiones relacionadas con sistemas biológicos. La modelización matemática clásica fundamentada en funciones continuas, funciones derivables, ecuaciones diferenciales, métodos de optimización, ajuste de funciones, junto con la modelización estadística, son metodologías de modelización que habitualmente se presentan y se aplican en el ámbito académico a distintos niveles (Barquero, Bosch & Gascón, 2011). Para investigar los sistemas microbianos que estudiamos en el presente trabajo (sistemas formados por levaduras creciendo en medio líquido y en condiciones distintas según sea la concentración de oxígeno), todas las herramientas mencionadas son necesarias, y se pueden complementar unas a otras, proporcionando información adicional y complementaria.

Es evidente que para llevar a cabo cualquier proceso de modelización, en primer lugar es fundamental estructurar el contexto que se investiga y conocer los elementos implicados en el sistema a representar, para después poder matematizar e interpretar los resultados de esta matematización. En relación al sistema que nos ocupa en este trabajo (conjunto de células creciendo en un entorno con glucosa y oxígeno), es evidente que se puede investigar desde diferentes perspectivas, lo cual da lugar a diferentes metodologías de modelización, ya que tenemos la posibilidad de tratar con diferentes tipos de observaciones para un mismo sistema. Se dispone de observaciones macroscópicas del sistema, variables que nos informan sobre la evolución temporal de la población microbiana, y se dispone de observaciones microscópicas de los elementos que se encuentran en el sistema, variables individuales que nos permiten conocer características específicas de los microorganismos que configuran esta población. El estudio del sistema se llevará a cabo conjugando y comparando resultados sobre parámetros cinéticos de modelos ajustados, modelos dinámicos continuos a nivel poblacional, y modelos relacionados con distribuciones de variables individuales de los elementos que configuran esta población.

En la primera etapa del proceso de modelización se abordará el estudio de las poblaciones microbianas entendidas como un todo (con una variable global que depende del tiempo y que nos informa sobre su tamaño), y en la segunda etapa del proceso de modelización se abordará el estudio de variables individuales (con propiedades o características particulares) de las células que forman estas poblaciones. En esta segunda etapa se tomará en consideración y se interpretará la información conseguida en la primera etapa. Los procesos de modelización implicados en cada una de estas dos etapas requieren de la respectiva identificación de los objetos a inspeccionar y de la selección de variables a controlar.

Así pues, para el análisis de los datos obtenidos se distinguen dos metodologías diferentes: aquella que está relacionada con la modelización del crecimiento de la población microbiana y de los parámetros cinéticos que caracterizan dicha evolución temporal, y aquella que está relacionada con el tratamiento estadístico de los datos obtenidos con el análisis de imágenes en relación al área, perímetro, diámetro o eje menor, diámetro o eje mayor, circularidad y elongación de las células individuales de levaduras que forman la población.

Se han realizado tanto resúmenes numéricos (estadística descriptiva) como resúmenes gráficos (diagrama de cajas, histogramas y diagramas de dispersión) para sintetizar y ofrecer de forma rápida y sencilla la información conseguida para las dos condiciones de crecimiento microbiano.

5.1. Modelo de crecimiento microbiano de Buchanan

Con los resultados de las cuatro réplicas del número de células de levadura de los dos experimentos según el medio de cultivo, aerobio y microaerófilo, que se obtuvieron en el trabajo experimental antes mencionado (Rivas & Pérez, 2012) se hizo el ajuste del modelo de crecimiento microbiano lineal a trozos de Buchanan (Buchanan et al., 1997). Es un modelo simple pero suficientemente bueno para los propósitos de este trabajo, ya que es uno de los modelos que permite obtener las estimaciones de los parámetros cinéticos involucrados en la definición de las tres fases del crecimiento microbiano.

Los modelos conocidos como modelos primarios de crecimiento microbiano están constituidos por expresiones matemáticas que describen el cambio del número de microorganismos con el tiempo (evoluciones temporales de la población), bajo unas condiciones particulares del entorno y del cultivo. Buchanan desarrolló un modelo primario simple, un modelo lineal a trozos, que identifica las tres fases principales que se pueden identificar en una curva típica de crecimiento microbiano en medio líquido y cultivo cerrado: fase de adaptación, fase exponencial y fase estacionaria (Figura 18). Durante la fase de adaptación, se asume que las células no se dividen, puesto que se están adaptando al nuevo entorno. Por este motivo la tasa específica de crecimiento es igual a cero ($\mu = 0$). Una vez adaptadas, las células comienzan a crecer hasta una velocidad que es la velocidad máxima que puede alcanzar el microorganismo en un ambiente específico. Durante la fase exponencial se asume que la tasa específica de crecimiento es una constante y asume el valor máximo ($\mu = k$), donde el logaritmo de la población de células aumenta linealmente con el tiempo. Una vez alcanzada la fase estacionaria, no hay incremento en la población de células y la tasa específica de crecimiento vuelve a ser cero ($\mu = 0$). Las tres fases del modelo se describen como:

Fase de adaptación: Para $t \leq t_{lag}$, $N_t = N_0$

Fase exponencial: Para $t_{lag} \leq t \leq t_{m\acute{a}x}$, $N_t = N_0 + \mu(t - t_{lag})$

Fase estacionaria: Para $t \geq t_{m\acute{a}x}$, $N_t = N_{m\acute{a}x}$.

donde: N_t es el logaritmo de la densidad de población a tiempo t (Log ufc/mL); N_0 es el logaritmo de la densidad de población inicial (Log ufc/mL); $N_{m\acute{a}x}$ es el logaritmo de la densidad de población máxima mantenida por el ambiente (Log ufc/mL); t es el tiempo transcurrido (h); t_{lag} es el tiempo en que finaliza la fase de adaptación (h); $t_{m\acute{a}x}$ es el tiempo en el que se alcanza la máxima densidad de población (h); μ es la tasa específica de crecimiento (Log ufc/mL h^{-1}). El modelo describe la evolución de la población a partir de la transformación en base 10. Este modelo proporciona un método matemático para el ajuste de curvas de crecimiento y se aproxima bien a la manera en que los microbiólogos tradicionalmente han estimado gráficamente los parámetros cinéticos de crecimiento. Una representación gráfica del modelo se puede observar en la Figura 18.

5.2. Análisis de datos

El modelo lineal de Buchanan (Buchanan et al., 1997) fue estudiado y ajustado a los datos experimentales con el paquete nlsMicrobio (Baty & Delignette-Muller, 2013) del programa estadístico R (R Core Team, 2013). Se obtuvo una estimación puntual de todos los parámetros cinéticos involucrados en la definición de este modelo que permitió identificar y caracterizar las tres fases de crecimiento (adaptación o lag, exponencial o log y estacionaria) para cada una de las 8 evoluciones temporales disponibles (4 réplicas para las dos condiciones de crecimiento). Con el objetivo de comparar la influencia del medio sobre los parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos con los ajustes realizados al modelo de Buchanan (aerobio versus microaerófilo), se

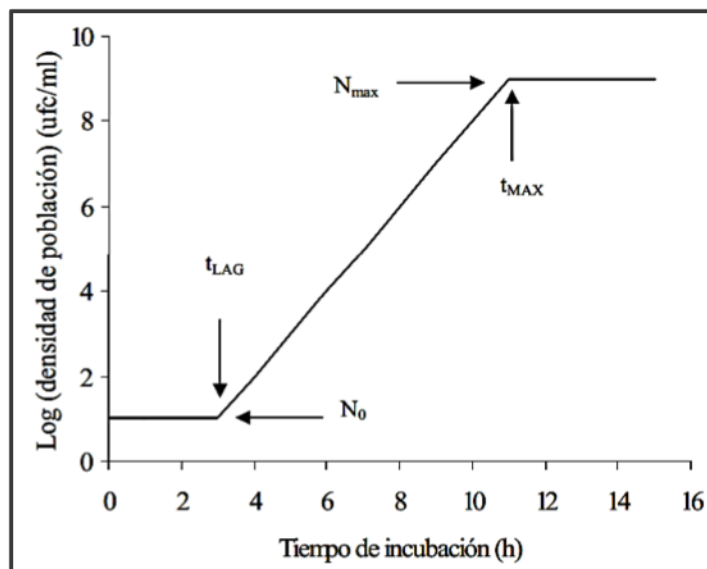


Figura 18: Representación gráfica del modelo lineal en tres fases y sus parámetros cinéticos (Modificado a partir de Buchanan et al., 1997).

utilizó la prueba t de *Student* para la comparación de dos medias para muestras independientes, asumiendo o no la igualdad de desviaciones típicas, según fuera el resultado del test de Bonett correspondiente a la comparación de varianzas. Se utilizó el programa estadístico Minitab® 17 (2014). El nivel de significación se fijó en el 5 %.

Para analizar los datos morfológicos obtenidos se realizaron resúmenes gráficos y calcularon resúmenes numéricos de las variables morfológicas directas área, perímetro, diámetro menor y diámetro mayor, y de las variables derivadas de forma circularidad y elongación de las células de levadura. Se agruparon los datos por tiempos de muestreo, y por condiciones de crecimiento (aerobio o microaerófilo). Se completó el análisis de estos datos con la comparación e interpretación de los resultados atendiendo a las tres fases identificadas con el modelo de Buchanan.

6. Resultados y discusión

6.1. Macros en el programa ImageJ y células analizadas

Una herramienta útil para automatizar las mediciones, el análisis y el procesamiento del conjunto de imágenes es la “macro”, ya que permite personalizar las tareas repetitivas según las necesidades del usuario y del tipo de imagen y objeto que se estudia.

La secuencia presentada anteriormente en relación al tratamiento de imágenes, se ha implementado en una macro instalada en el propio programa ImageJ (Figura 19) con el propósito de realizar el análisis de todas las imágenes obtenidas de la forma más automática posible (fijar la escala, introducir valores fijos de algunos parámetros, mejorar contraste de la imagen, etc), obteniendo células mejor definidas y sin suciedad a su alrededor. Después de realizar diversas pruebas para realizar el ajuste del umbral, se crearon 3 macros con 3 métodos diferentes para la opción “Auto Threshold”. El método más utilizado fue “Default”, aunque dependiendo de la imagen se aplicó “Intermodes” o “Yen” ya que definían mejor las células de interés, las dejaban más cerradas y se apreciaba menos ruido. No obstante, una vez ejecutada la macro, el usuario debe comprobar que:

- ✓ Todas las partículas analizadas sean las células de interés, ya que el programa no distingue si es una célula u otro objeto (por ejemplo, burbujas de aire, manchas de tinta, partículas suspendidas, etc.). Es conveniente antes de realizar el análisis de imágenes afinar el rango de área con el objetivo de analizar células a partir de un valor determinado, excluyendo así las partículas que no interesan. Si estas partículas eran del tamaño de nuestras células, se borran manualmente, para que no figurasen en la tabla de resultados generada.
- ✓ Las células madres y las gemas estén unidas en el caso de que en la imagen original lo estén, ya que la función “Watershed” las separa de forma automática sin contemplar si la célula está en estado de gemación. En este caso se constató la necesidad de un cierre manual de células.
- ✓ Los bordes de la célula estén cerrados. Aunque antes se haya ejecutado la función “Close”, las células pueden no llegar a cerrarse totalmente, en este caso, se podría repetir la misma operación una vez más o borrar la célula directamente debida a su gran apertura.

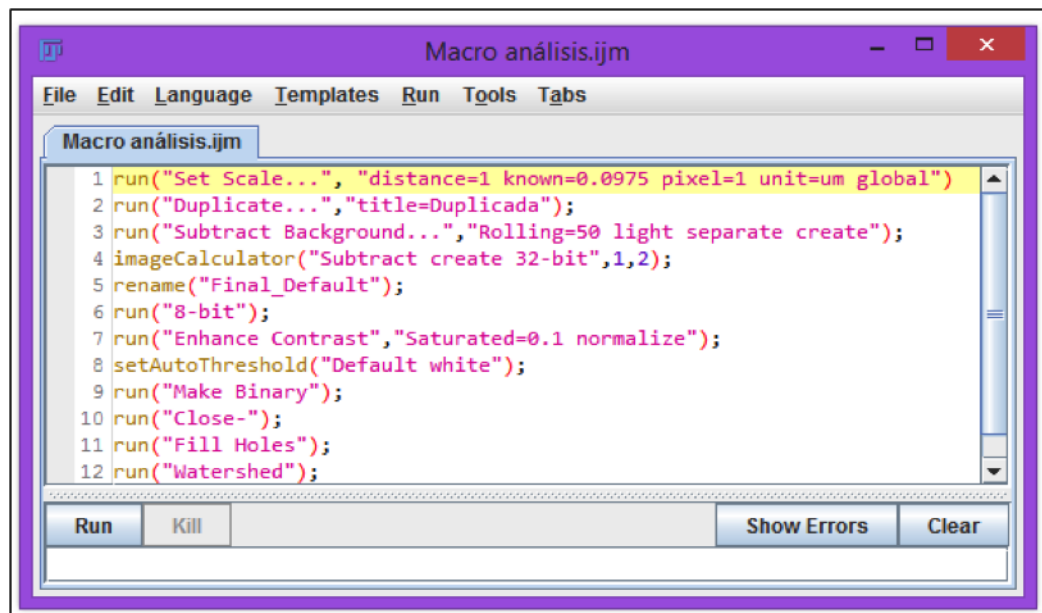
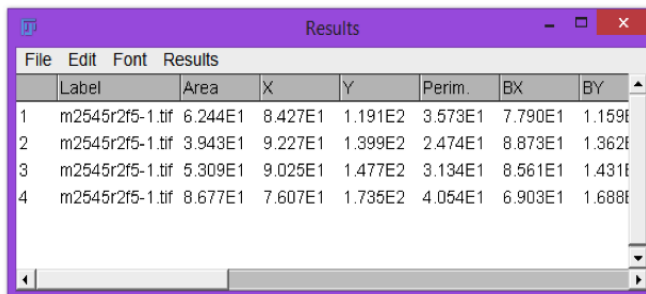


Figura 19: Macro creada e instalada en el programa ImageJ para el tratamiento automatizado de imágenes.

En la Figura 20 se muestra una captura de pantalla del tipo de resultados que se consigue con el programa ImageJ, y que se pasaron a una hoja de cálculo o paquete estadístico para su posterior análisis después de haber verificado que se corresponden correctamente con las células identificadas.



	Label	Area	X	Y	Perim.	BX	BY
1	m2545r2f5-1.tif	6.244E1	8.427E1	1.191E2	3.573E1	7.790E1	1.159E1
2	m2545r2f5-1.tif	3.943E1	9.227E1	1.399E2	2.474E1	8.873E1	1.362E1
3	m2545r2f5-1.tif	5.309E1	9.025E1	1.477E2	3.134E1	8.561E1	1.431E1
4	m2545r2f5-1.tif	8.677E1	7.607E1	1.735E2	4.054E1	6.903E1	1.688E1

Figura 20: Ejemplo de un subconjunto de células analizadas y de los resultados que se obtiene con el programa ImageJ.

Las Tablas 1 y 2 muestran el número de células analizadas en cada repetición experimental, en función del tiempo, así como los totales por réplicas y por tiempos de muestreo, para cada una de las condiciones de crecimiento, aerobio y microaerófilo, respectivamente. En el medio aerobio se analizaron un total de 7694 células, mientras que el medio microaerófilo fueron 2317 células.

Tiempo (h)	R1	R2	R3	R4	Total
4.5	40	26	32	35	133
6	32	31	36	24	123
7.5	47	80	45	107	279
9	67	82	56	59	264
12	39	34	31	51	155
13.5	43	49	35	40	167
15	35	77	69	12	193
16.5	58	41	38	77	214
18	62	142	138	80	422
19.5	207	121	150	202	680
21	152	127	106	185	570
22.5	269	197	154	163	783
24	254	156	69	171	650
25.5	162	172	132	204	670
27	128	276	245	127	776
35	104	73	96	215	488
36.5	102	78	181	97	458
47.75	183	161	183	142	669
	1984	1923	1796	1991	7694

Tabla 1: Tabla de recuento de células analizadas correspondientes a los distintos tiempos de muestreo y para las 4 réplicas (R1, R2, R3, R4) con condiciones aerobias.

Tiempo (h)	R1	R2	R3	R4	Total
1.5	18	13	10	15	56
3	11	9	16	0	36
4.5	16	11	15	12	54
6	15	15	13	21	64
7.5	22	13	21	16	72
9	17	17	23	21	78
10.5	15	17	24	18	74
11.75	19	23	18	25	85
12.25	9	9	7	14	39
13.5	16	15	16	14	61
15	17	25	40	24	106
16	17	30	28	33	108
16.5	43	32	26	26	127
19.5	29	48	42	35	154
21	60	31	35	36	162
22.5	27	33	38	35	133
24.25	52	48	24	33	157
25.75	64	80	23	20	187
27.25	22	64	36	44	166
	567	627	554	569	2317

Tabla 2: Tabla de recuento de células analizadas correspondientes a los distintos tiempos de muestreo y para las 4 réplicas (R1, R2, R3, R4) con condiciones microaerófilas.

6.2. Modelización de las evoluciones temporales de las poblaciones de levaduras

Con los datos de crecimiento poblacional obtenidos (Rivas & Pérez, 2012), para cada uno de los ensayos experimentales se realizó el ajuste al modelo de Buchanan a los datos transformados con el logaritmo en base 10, describiendo las tres fases principales de la evolución temporal (fase de adaptación o lag, fase exponencial o log, y fase estacionaria). Se obtuvieron las representaciones gráficas del modelo de Buchanan así como los parámetros finales estimados mediante el proceso de iteración para el ajuste planteado. La inspección visual del modelo lineal (a trozos) ajustado y representado conjuntamente con cada uno de los 8 conjuntos de datos experimentales, junto con la información que genera el paquete `nlsMicrobio` del programa estadístico R en relación al número de iteraciones efectuadas para la convergencia del algoritmo, a la tolerancia alcanzada, y a la suma de cuadrados residual, permiten afirmar que en los 8 casos la calidad del ajuste fue muy buena. Por otra parte, el tipo de modelo escogido para el crecimiento de la población resultó apropiado para todos los datos analizados, ya que todos los cultivos microbianos mostraron de forma clara las distintas fases de crecimiento que el modelo de Buchanan presupone (adaptación, exponencial y estacionaria) en el tiempo muestreado.

Las Figuras 21 y 22 muestran dos ejemplos de este tipo de modelo ajustado, donde se pueden observar el rol que tienen los distintos parámetros implicados en el modelo ajustado: *lag* corresponde a la duración de la fase lag o el tiempo en el que se produce el cambio de fase lag a fase log (h); *mm_{max}* es la tasa máxima de crecimiento (Log ufc/mL h⁻¹); *Log10N0* es el

logaritmo de la población inicial (Log ufc/mL); y $Log_{10}N_{máx}$ es el logaritmo de la población máxima (Log ufc/mL).

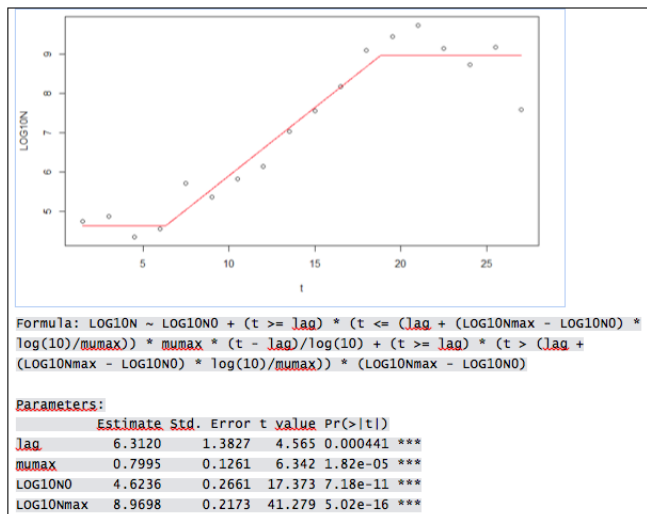


Figura 21: Ejemplo de crecimiento (datos de la Réplica 1 en condiciones aerobias) ajustado al modelo lineal a trozos de Buchanan y el conjunto de estimaciones de los parámetros cinéticos correspondientes, proporcionado por el paquete nlsMicrobio del programa estadístico R.

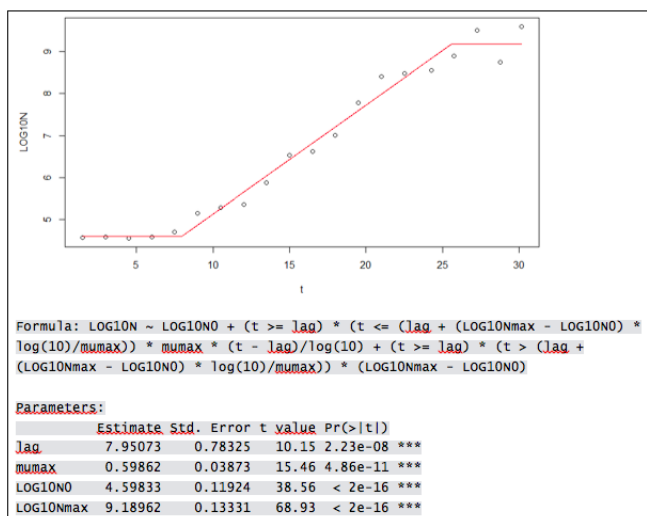


Figura 22: Ejemplo de crecimiento (datos de la Réplica 2 en condiciones microaerófilas) ajustado al modelo lineal a trozos de Buchanan y el conjunto de estimaciones de los parámetros cinéticos correspondientes proporcionado por el paquete nlsMicrobio del programa estadístico R.

Una vez estimados los parámetros del modelo de Buchanan para cada uno de las réplicas experimentales se procedió a realizar los cálculos para obtener los tiempos en que finalizaba la fase exponencial y empezaba la fase estacionaria ($t_{máx}$), substituyendo los valores correspondientes de las estimaciones en la expresión matemática del modelo lineal a trozos de Buchanan, como muestra la Figura 23. También a partir de esta información se puede estimar la duración de la fase exponencial como la diferencia entre el tiempo de entrada en la fase estacionaria y la duración de la fase de adaptación o salida de la fase lag.

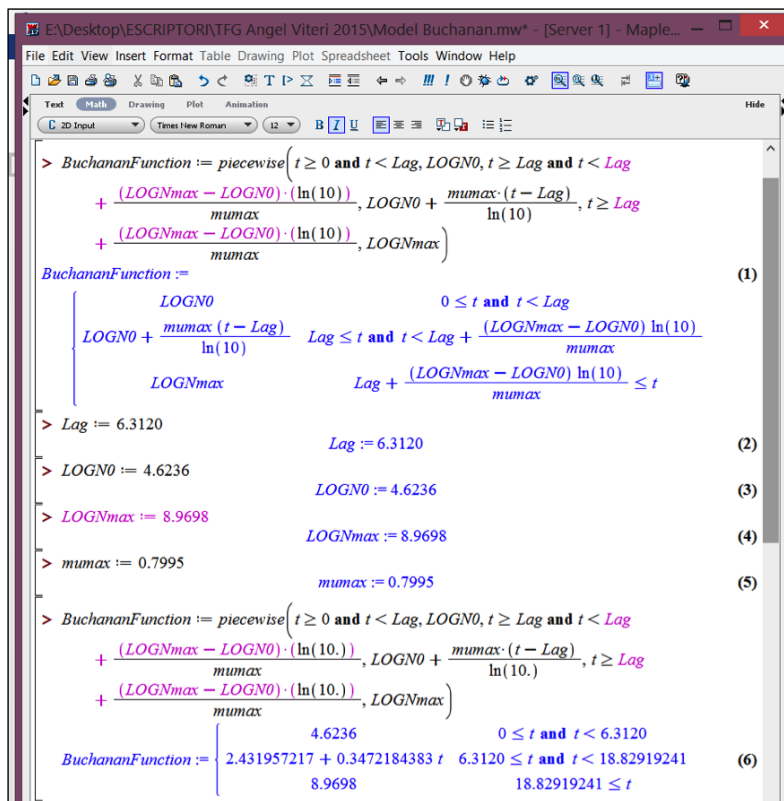


Figura 23: Ejemplo de cálculo del tiempo en que se produce el cambio de fase exponencial a fase estacionaria (18.829 h) a partir de las estimaciones del modelo de Buchanan ajustado a los datos de la réplica 1 en condiciones de crecimiento aerobias.

Se caracterizaron las 8 evoluciones temporales del crecimiento poblacional de levaduras a partir de las estimaciones proporcionadas por el ajuste al modelo de Buchanan de los parámetros involucrados en su expresión y con la información obtenida a partir de cálculos derivados. Se consiguieron las duraciones de la fase de adaptación (fase lag), las tasas máximas de crecimiento, los logaritmos de las poblaciones iniciales y de las poblaciones finales, los tiempos de cambio de la fase exponencial a la fase estacionaria, y las duraciones de las fases exponenciales. Cada uno de estos parámetros es de interés microbiológico para aplicaciones específicas. Por otra parte, estos parámetros cinéticos nos ayudarán en la interpretación de las distribuciones de parámetros morfológicos de las células de levadura conseguidas con el análisis de imágenes digitales.

6.3. Influencia de las condiciones aerobias y microaerófilas sobre parámetros cinéticos de crecimiento poblacional

Se compararon los parámetros cinéticos correspondientes a las dos condiciones de crecimiento (aerobio y microaerófilo) mediante el test *t* de Student para la comparación de muestras independientes de acuerdo con la suposición previa, o no, de igualdad de varianzas. Los parámetros que se comparan son los que se muestran en la Figura 24: el número inicial de células (Log10(N0)), el tiempo en que se produce el cambio de la fase de latencia a exponencial que coincide con la duración de la fase de latencia (t Lag-Exp), la tasa máxima de crecimiento específico (μ máx), el número final de células (Log10(Nmáx)), el tiempo en que se produce el cambio de fase exponencial a estacionaria (t Exp-Estac), y las duraciones de la fase de exponencial (Duración Exp), que se consiguen restando las duraciones de la fase de adaptación a los tiempos en que la

población entra en la fase estacionaria. En relación a la igualdad de las medias de los parámetros estudiados, con los datos recogidos se puede concluir que las tasas máximas de crecimiento en las dos condiciones, aerobia y microaerófila, son significativamente distintas (valor $p = 0.016$), siendo esta tasa de crecimiento mayor en el caso aerobio; así como los tiempos en que se produjo el cambio de fase exponencial a fase estacionaria también son significativamente distintos (valor $p < 0.001$), siendo este tiempo mayor para el caso microaerófilo. Respecto a la duración de la fase exponencial, se han observado diferencias significativas entre las dos condiciones de crecimiento, aerobio y microaerófilo (valor $p < 0.001$), siendo esta duración mayor en el caso microaerófilo. Para el resto de parámetros estudiados, población inicial, población final y duración de la fase de adaptación (o lag) no se puede concluir que las diferencias sean significativas al 5% (valores p iguales a 0.259, 0.747 y 0.086, respectivamente). Por tanto, se mantiene la igualdad de valores medios poblacionales para estos parámetros en las dos condiciones de crecimiento.

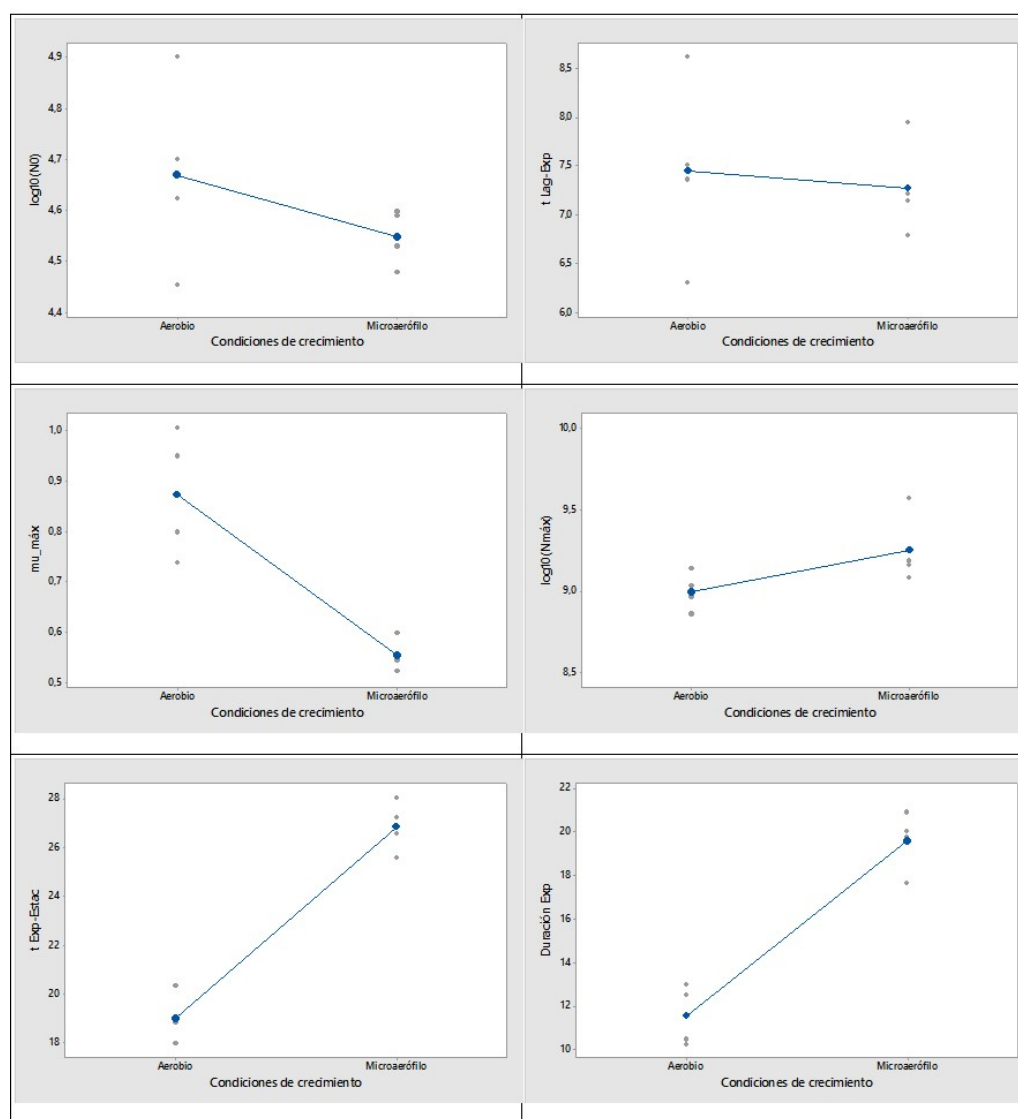


Figura 24: Parámetros cinéticos obtenidos para las evoluciones temporales de las poblaciones de levadura con el modelo de Buchanan según las dos condiciones de crecimiento.

6.4. Análisis descriptivo de los parámetros morfológicos de las células de levadura

Los parámetros morfológicos a analizar (Figura 17) se han clasificado en dos grupos: variables originales y variables derivadas. Las variables originales son aquellas cuyo valor no depende de ninguna otra variable, mientras que las variables derivadas (o descriptores de forma) son función de las variables originales. Las variables originales que se han analizado con el programa ImageJ a partir del protocolo diseñado son cuatro: área, perímetro, diámetro mayor y diámetro menor de la elipse que ajusta la célula. Las variables derivadas que se analizaron son dos: la circularidad (que depende de la relación entre área y perímetro) y la relación de aspecto o elongación (que dependen de los diámetros mayor y menor). En este trabajo mostraremos algunos de los resultados obtenidos en relación al conjunto de estas variables, pero por razones de espacio no será posible presentar todas las distribuciones conseguidas para las 8 réplicas estudiadas.

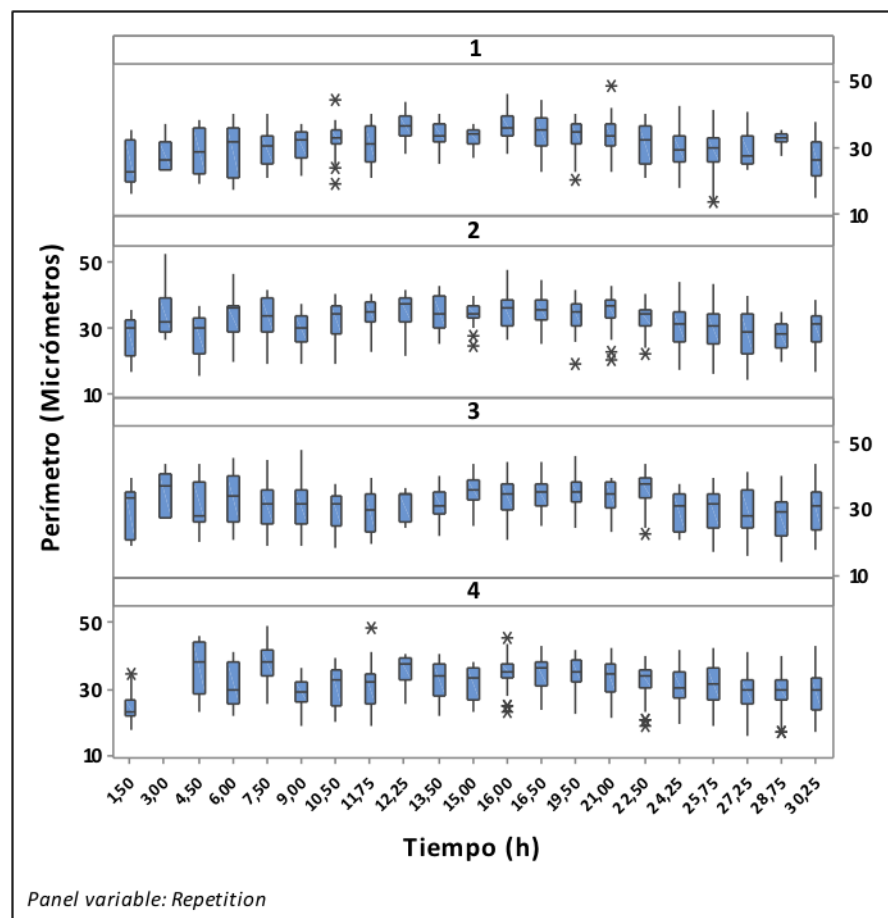


Figura 25: Diagramas de caja del perímetro de las células de levadura según los tiempos de muestreo, con sus valores atípicos representados con un asterisco, para las cuatro réplicas correspondientes a la condición de crecimiento microaerófilo.

Antes de proceder al análisis estadístico de los resultados obtenidos fue necesario depurar el conjunto de datos y eliminar valores atípicos que detectaron los diagramas de caja o boxplots. La Figura 25 presenta un ejemplo de estos diagramas de caja con valores atípicos originales o iniciales antes de la depuración, destacados con asteriscos. Para condiciones de crecimiento aerobio, y con las variables área, perímetro, diámetro mayor y diámetro menor se eliminaron un total de 313 datos atípicos mientras que para las microaerófilas unos 90 datos atípicos, lo cual

representó un 4.1 % (313/7694) y 3.9 % (90/2317) respectivamente de los datos conseguidos.

Con los diversos conjuntos de datos depurados se procedió a la representación gráfica y caracterización de las distribuciones de valores para las diferentes variables (área, perímetro, diámetro mayor y diámetro menor de la elipse que ajusta la célula, circularidad y elongación) según los tiempos de muestreo, para cada una de las réplicas de las dos condiciones de crecimiento ensayadas (aerobio o microaerófilo). Por limitaciones de espacio no es posible exponer todos estos resultados, por lo que se escogerán algunos de ellos para ilustrar el tipo de información que se ha conseguido. Por ejemplo en la Figura 26, se presentan los histogramas para cada una de las réplicas de la variable área correspondiente al crecimiento en condiciones aerobias. Podemos observar que, durante las primeras horas correspondientes a la fase de adaptación (aproximadamente entre 6 y 9 horas según sea la réplica como muestran las estimaciones del parámetro cinético “t Lag-Exp” en la Figura 24), las áreas de las células están agrupadas principalmente en valores bajos y con distribuciones similares, en forma aproximadamente normal o de campana de Gauss (distribuciones unimodales y aproximadamente simétricas).

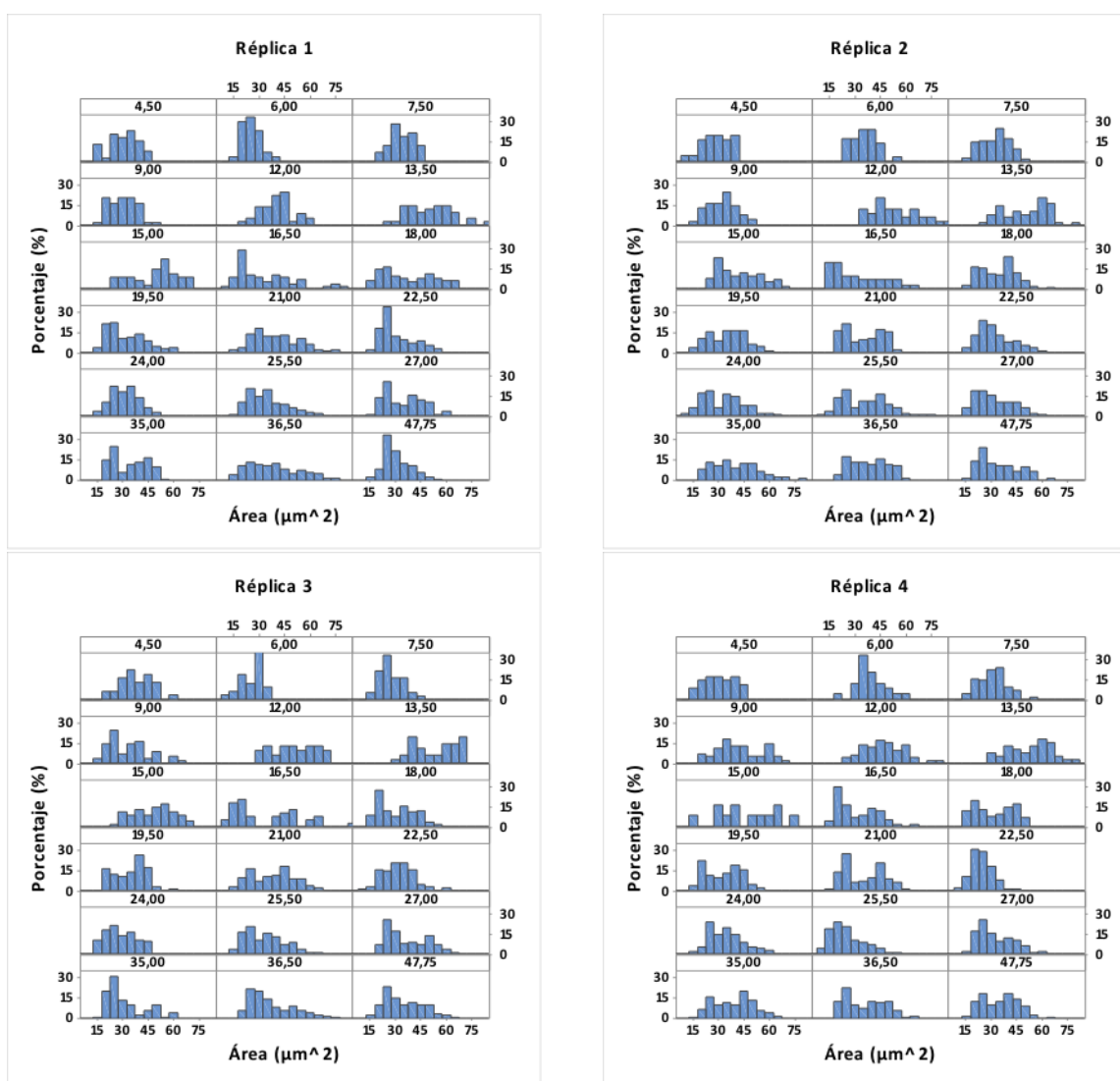


Figura 26: Histogramas de la variable área para las cuatro réplicas del crecimiento aerobio.

A partir de las 9 h y hasta las 18-20 h, que se corresponde con tiempos de muestreo don-

de la población se encuentra creciendo de forma exponencial según sea la réplica de acuerdo con las estimaciones del parámetro cinético “t Exp-Estac” (Figura 24), las áreas de las células aumentan llegando a alcanzar valores máximos, dejando de tener una distribución simétrica y pasando a conseguir distribuciones más irregulares, con un rango mayor, distribuciones sesgadas, asimétricas, y bimodales en la mayoría de los casos. Observamos también algunas distribuciones en peine, decrecientes. Se constata que en estos muestreos, que corresponden a la fase exponencial, el valor del área de las células cambia de forma muy notable, así como las distribuciones de esta variable. Ya en el muestreo correspondiente a las 21h, donde la población de levaduras en todas las réplicas ha salido del crecimiento exponencial y ha entrado en la fase estacionaria, las distribuciones de los valores de las áreas de las células se desplazan a valores inferiores, valores más bajos. Las distribuciones se caracterizan por ser aproximadamente rectangulares en algunos casos, con frecuencias más altas y más bajas alternándose, en donde no existe ningún valor modal claramente diferenciado, mientras que en otros casos pasa por ser una distribución sesgada a la derecha. Considerando que no se han detectado diferencias muy importantes entre el comportamiento observado para estas 4 réplicas, la Figura 27 presenta el histograma del área de las células de levadura combinando los datos provenientes de las cuatro réplicas. Al tratarse de un conjunto mayor de datos, se puede apreciar de forma mucho más incuestionable y clara los cambios comentados anteriormente sobre las distribuciones, evidenciando los cambios en las tendencias centrales de estas distribuciones según fase de crecimiento, cambios en la variabilidad o rango de las distribuciones, así como en la forma de las distribuciones.

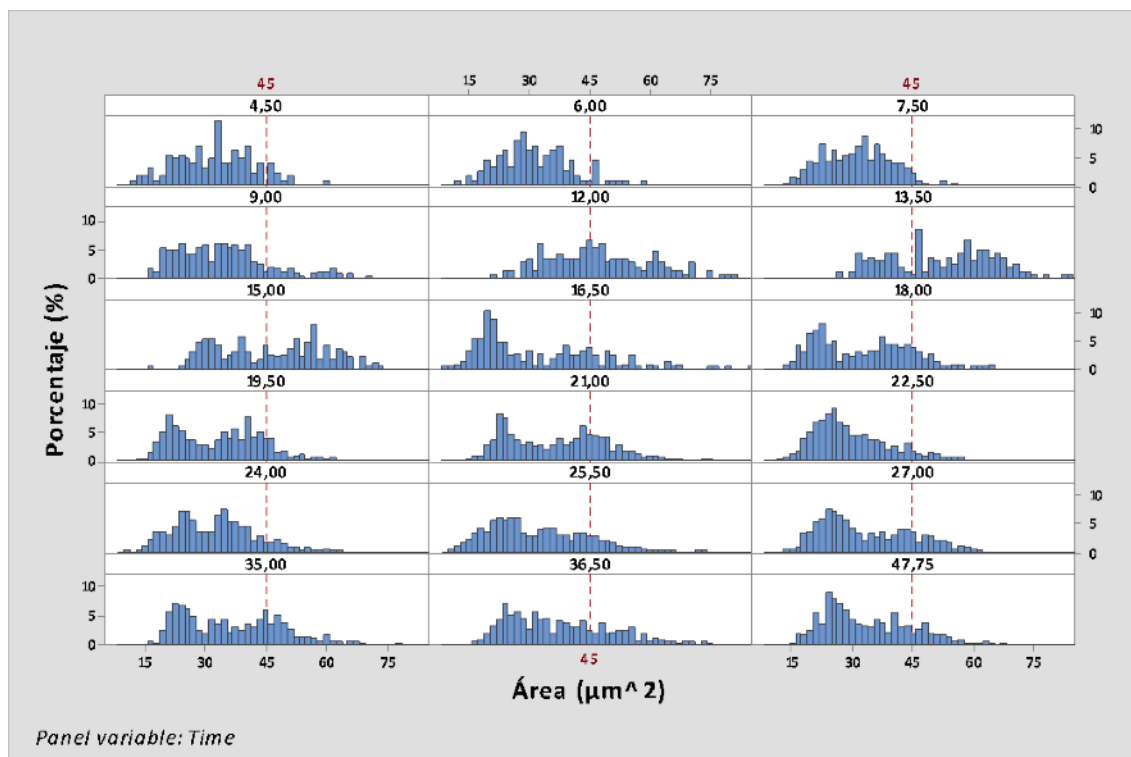


Figura 27: Histograma de la variable área para todos los datos combinados de las cuatro réplicas del crecimiento aerobio.

Los diámetros máximos y mínimos nos ayudarán a caracterizar las células según el estado individual en el que se encuentra, nos indicarán el calibre de las células para poder dar una información más exhaustiva sobre su gemación y elongación.

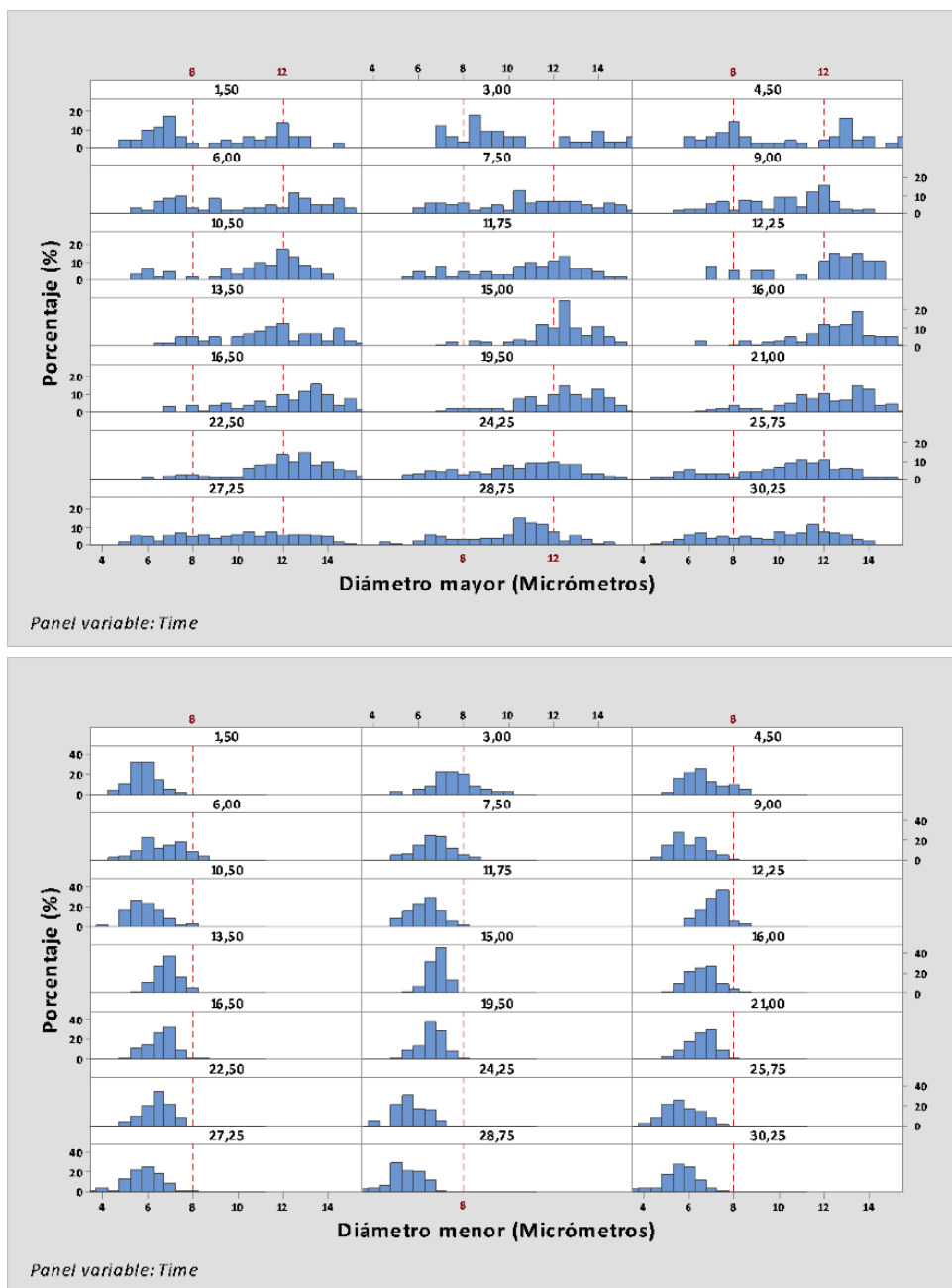


Figura 28: Histogramas de la variable diámetro mayor y diámetro menor para el conjunto de datos de todas las réplicas correspondientes al crecimiento en condiciones microaerófilas.

La Figura 28 muestra los histogramas de la variable diámetro mayor y diámetro menor para el conjunto de datos de todas las réplicas correspondientes al crecimiento en condiciones microaerófilas (después de haber estudiado de forma independiente cada una de las réplicas y constatar que no hay diferencias destacables entre ellas). En la parte superior de la Figura 28 vemos que los primeros muestreos hasta las 7.5 h, los diámetros máximos de las células están repartidos entre rangos bajos y medios, y su distribución es principalmente rectangular en donde a veces observamos ciertos rangos de valores sin ocupar, y con algún valor modal que destaca. Estos tiempos de muestreo corresponden a la fase de adaptación de la población (según las estimaciones del parámetro cinético “t Lag-Exp” en la Figura 24). Para los muestreos correspondientes a tiempos mayores de 7.5 h y hasta al periodo temporal aproximadamente de 24 a 25 h, las células cambian su diámetro mayor aumentando su valor de forma importante y manteniéndose entre rangos medios y altos (prácticamente no se observan células con valores en el rango inferior). Su distribución presenta diferentes formas, desde una disposición hacia la normalidad, mostrando una forma de campana que se va configurando, pasando por distribuciones en forma de peine creciente, y llegando a distribuciones aproximadamente rectangulares. Estos muestreos se corresponden a poblaciones creciendo de forma exponencial, mientras que para muestreos posteriores a estas horas la población ha dejado la fase exponencial y está entrando en la fase estacionaria (según estimaciones de los parámetros cinéticos mostrados en la Figura 24 para medio microaerófilo). En los últimos muestreos las células tienen diámetros mayores que ocupan aproximadamente todo el rango de valores desde 4 a 14 micrómetros, con una distribución mayoritariamente rectangular. La parte inferior de la Figura 28 que nos presenta las distribuciones de los diámetros menores de las células no se evidencian tantas variaciones en cuanto a valores, permaneciendo estos valores en un rango de 4 a 8 micrómetros aproximadamente. Se observa un cierto desplazamiento de las distribuciones hacia valores mayores que luego vuelve a retroceder. Respecto a los tiempos de muestreo correspondientes a la fase exponencial, los valores de los dos diámetros se separan de forma más notoria el uno del otro, hay una mayor distancia entre ambos debido muy probablemente al estado de gemación en el que se encuentran las células de levadura. Durante los tiempos finales, ya en la entrada de la fase estacionaria vemos que el diámetro menor reduce ligeramente su valor mientras que el diámetro mayor lo hace de una manera más notoria en algunas células, aunque no todas. La presencia de nuevas células procedentes de la reproducción que conviven con células que aún se encuentran gemando explicaría este comportamiento.

Considerando que la toma de muestras se fue realizando durante el crecimiento poblacional, y utilizando las estimaciones de los parámetros cinéticos conseguidos con el modelo de Buchanan ajustado, ha sido posible ubicar tanto los muestreos realizados para cada una de las 8 réplicas (4 en condiciones aerobias y 4 en condiciones microaerófilas) a una fase de crecimiento (adaptación, exponencial o estacionaria), como etiquetar cada imagen de célula de levadura analizada con la fase en la que se encontraba en ese momento. Así pues, las Tablas 3 y 4 muestran algunos estadísticos descriptivos (rango a través del valor máximo y mínimo, y media aritmética) para las variables morfológicas directas considerando la agrupación de todas las imágenes obtenidas por fases para cada una de las dos condiciones de crecimiento. No obstante, es indispensable y necesario acompañar estos resúmenes numéricos con las representaciones gráficas de los valores individuales a través de histogramas, ya que las formas de los histogramas son diversas según sea la variable representada y el tiempo al que pertenece (que a su vez pertenece a una de las fases de crecimiento). Ya se ha constatado que no siempre se obtienen distribuciones aproximadamente normales, por lo que algunos resúmenes numéricos pierden representatividad.

	Adaptación			Exponencial			Estacionaria		
	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media
Área (μm^2)	31.74	32.08	31.91	30.97	52.22	39.73	29.51	37.52	33.8
Perímetro (μm)	22.62	22.69	22.66	21.68	30.29	25.72	21.2	25.53	23.87
D. Mayor (μm)	6.88	7.1	6.99	6.8	10.52	8.69	6.81	8.71	8
D. Menor (μm)	5.63	5.82	5.73	5.09	6.29	5.7	5	5.56	5.34

Tabla 3: Valores mínimos, máximos y medias aritméticas de las cuatro medias obtenidas de cada una de las réplicas por fase de crecimiento para las variables morfológicas originales correspondientes al medio aerobio.

	Adaptación			Exponencial			Estacionaria		
	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media
Área (μm^2)	41.91	64.08	54.76	46.85	66.18	58.21	43.71	46.78	45.32
Perímetro (μm)	26.7	32.25	30.46	29.5	35.17	32.82	28.27	29.27	28.84
D. Mayor (μm)	9.09	10.73	10.24	10.15	12.43	11.46	10.15	12.43	11.46
D. Menor (μm)	5.84	7.57	6.66	5.69	7.01	6.39	5.55	5.92	5.69

Tabla 4: Valores mínimos, máximos y medias aritméticas de las cuatro medias obtenidas de cada una de las réplicas por fase de crecimiento para las variables morfológicas originales correspondientes al medio microaerófilo.

La circularidad y elongación son variables consideradas como estimadores de forma mientras que el resto de medidas como área, perímetros o diámetros son variables consideradas como estimadoras de tamaño. Para saber si una célula de levadura, con una forma ovoide, está en proceso de gemación, se puede analizar la variable elongación. La elongación es un descriptor de forma que nos da información sobre la deformación de la células y se define como la relación entre el diámetro mayor y diámetro menor. Para diferenciar entre una célula está que está gemando y otra que no, se puede tomar un valor de elongación de referencia igual 1.5 (Coelho et al., 2004). La Figuras 29 y 30 nos muestran histogramas de la variable elongación correspondientes a células creciendo en condiciones aerobias. En los histogramas correspondientes a los primeros (7.5-9 h) la elongación es mayoritariamente menor que 1.5 y esto nos indica que las células no presentan síntomas de actividad reproductiva. En los muestreos por encima de las 9 h y hasta aproximadamente las 21 h un número de células grande presentan una elongación mayor que 1,5 indicando que las células están gemando, y que van a generar células hijas a partir de las gemas. Este hecho está en concordancia con que estos muestreos corresponden al crecimiento exponencial de la población según los parámetros cinéticos estimados (Figura 24). En los últimos muestreos, más allá de las 21 h se mantiene la forma de la distribución claramente delimitando dos subpoblaciones diferentes: la de las células sin gemar, que claramente son mayoría (elongación < 1.5) y la de las células gemando, que constituyen una pequeña parte de la población (elongación > 1.5).

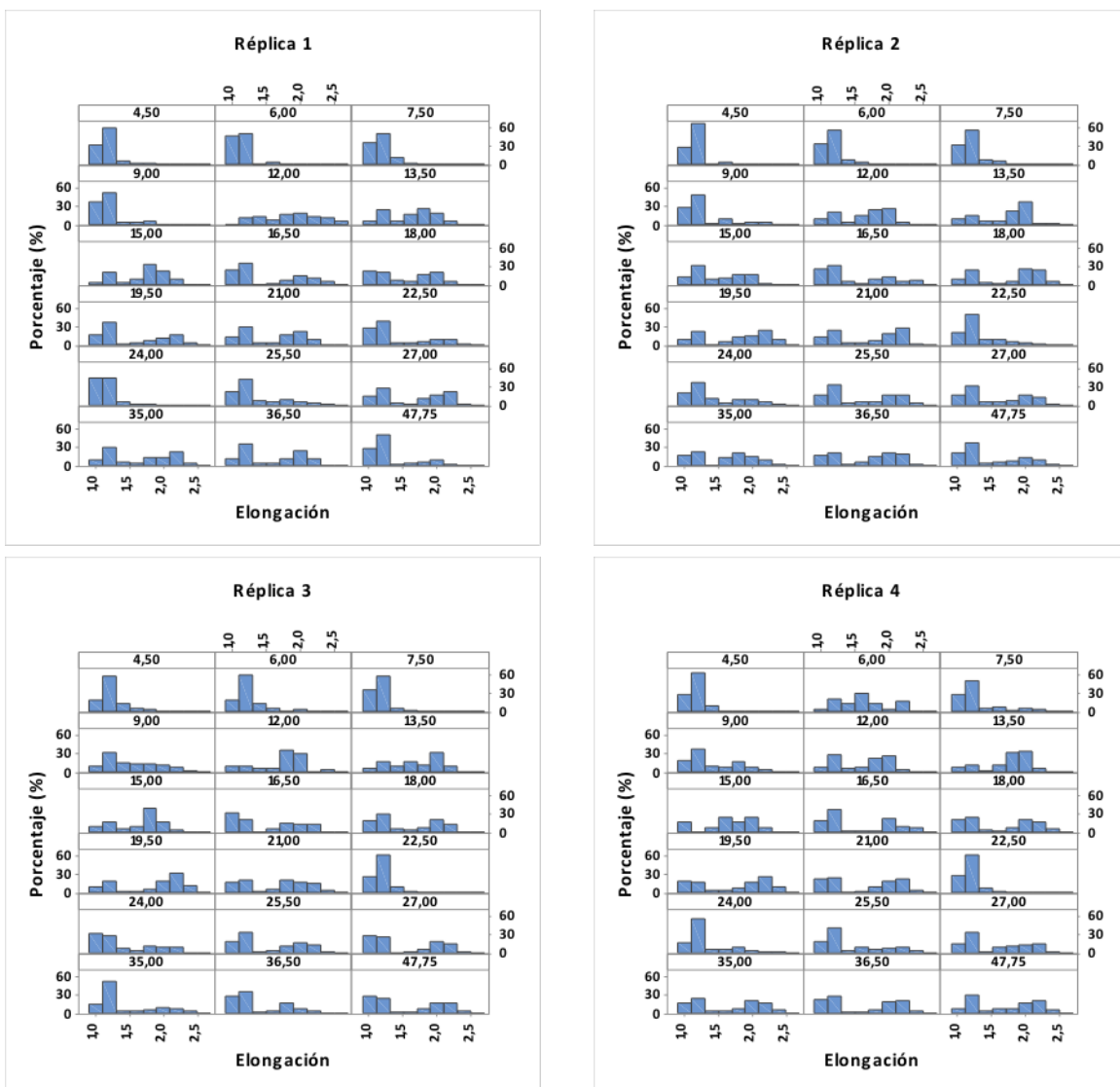


Figura 29: Histogramas de la variable elongación para las cuatro réplicas del crecimiento aerobio.

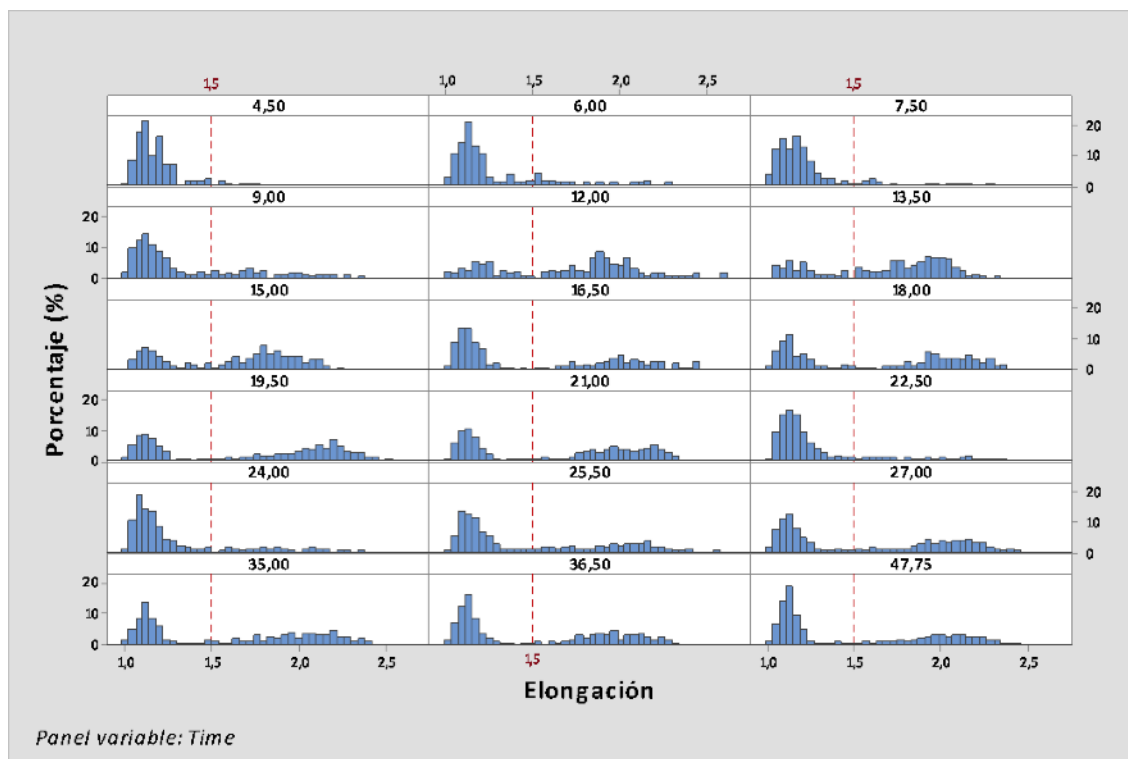


Figura 30: Histograma de la variable elongación para todos los datos combinados de las cuatro réplicas del crecimiento aerobio.

También para analizar la forma de las células de levadura se puede estudiar la variable circularidad (que relaciona el área con el perímetro del objeto), una medida que nos indica cómo un objeto se aproxima a un círculo (recordar que la circularidad en ImageJ toma valores entre 0 y 1, en donde el valor 1 representa un círculo perfecto). Las Figuras 31 y 32 muestran los histogramas de la variable circularidad para condiciones de crecimiento microaerófilo. Podemos observar que en los primeros muestreos hasta aproximadamente por debajo de las 7.5 h, las células presentan unos valores de circularidad repartidos entre dos grupos, al entorno de 0.6 y de 0.85, encontrándose algunas células con valores bajos y otra con valores altos. A partir del muestreo correspondiente a las 7.5 h (en que se acaba la fase de adaptación y se entra en la fase exponencial como informa la Figura 24) los valores de la circularidad disminuyen en general para la mayoría de las células, que se posicionan principalmente entre los rangos bajos de forma agrupada, posiblemente debido al proceso de gemación que están sufriendo estas células. Para muestreos más allá de las 24-25 h, la circularidad para algunas células aumenta ligeramente, aumenta el porcentaje de células con valores superiores, y otra vez se posicionan grupos de células alrededor de los valores de 0.6 y 0.85 aproximadamente, ya que hay nuevas células que se han formado y que ya no van a gemar, y otras que aún están gemando.

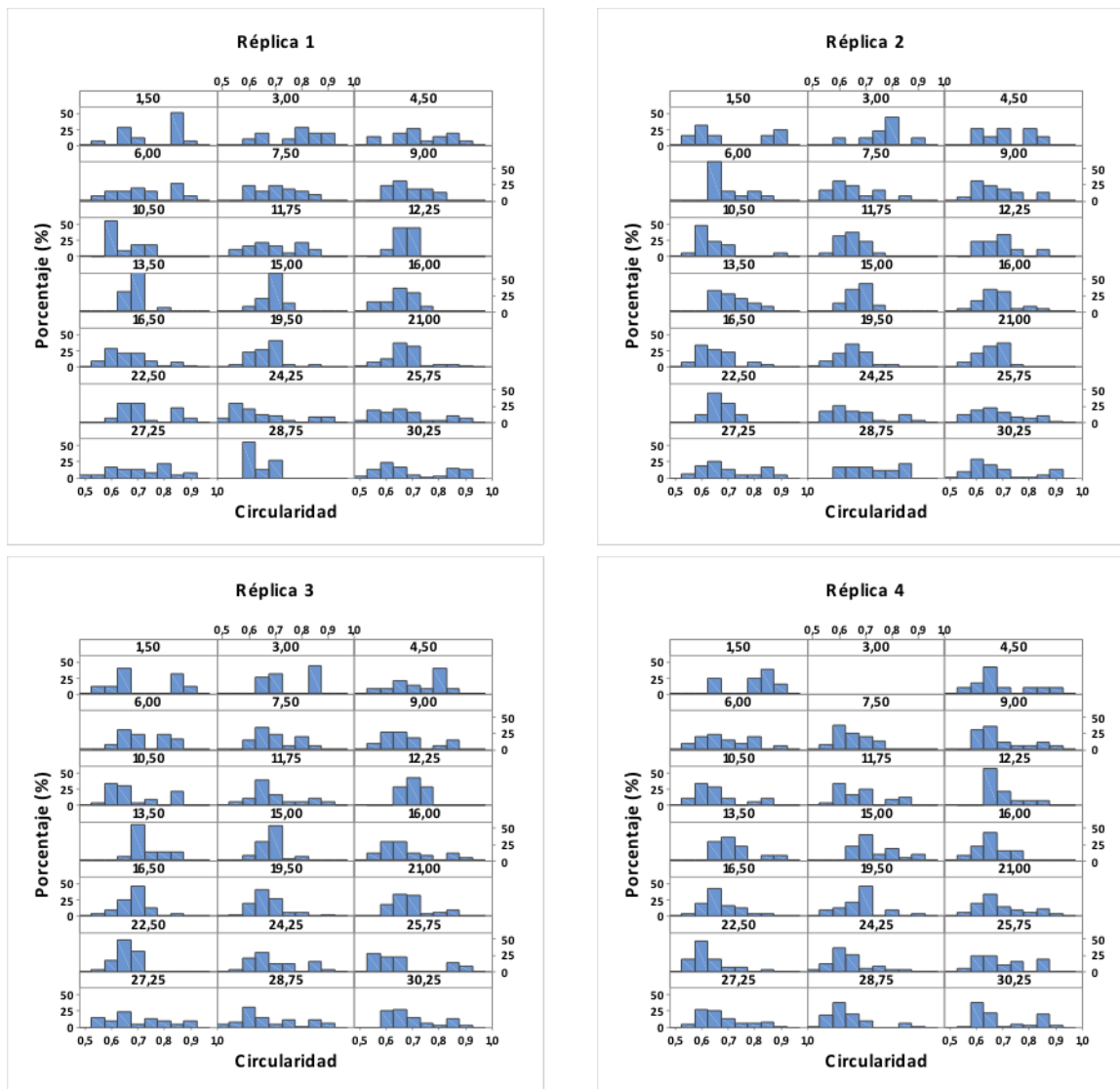


Figura 31: Histogramas de la variable circularidad para las cuatro réplicas del crecimiento microaerófilo.

El resto de resultados conseguidos con otras variables, y que no se muestran en este trabajo, refuerzan la idea de que combinar el conocimiento a nivel individual de una célula de levadura, obtenido con el uso de imágenes digitales, con información a nivel de población, que se puede obtener con modelos primarios de crecimiento y estimación de parámetros cinéticos involucrados, permite entender mejor los procesos biológicos y conectar diferentes observaciones experimentales. Es evidente que el modo de reproducción que utiliza este microorganismo en estas condiciones medioambientales, la gemación, tiene un efecto crucial en la evolución temporal del sistema, por lo que para poder avanzar en este estudio se debería considerar cómo separar información entre las células que están gemando y las que no.

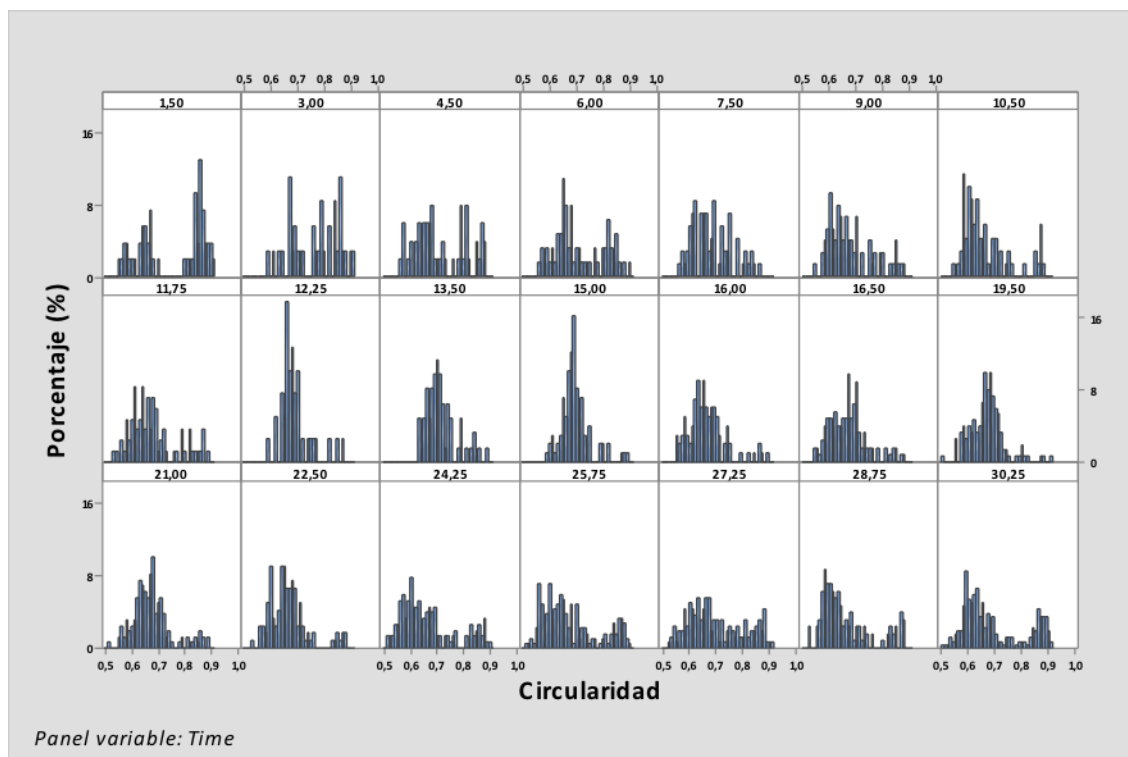


Figura 32: Histograma de la variable circularidad para todos los datos combinados de las cuatro réplicas del crecimiento microaerófilo.

7. Consideraciones finales

El trabajo realizado se ha llevado a cabo en el marco de un Trabajo Final de Grado de una titulación de Ingeniería de Biosistemas, y por tanto representa una actividad académica a nivel universitario que los estudiantes pueden realizar. Se han combinado conceptos, habilidades y destrezas distintas, tanto desde la utilización de conceptos y programas matemáticos y estadísticos, como conocimientos propios del sistema microbiológico formado por levaduras.

El logro de los objetivos metodológicos fijados para este trabajo, y que son importantes en el entorno académico, ha sido decisivo y muy valioso para facilitar la realización de este tipo de estudio en nuestro centro universitario, permitiendo conjugar intereses educativos (de enseñanza y aprendizaje) con intereses científicos (con la consecución de tareas propias de un grupo de investigación en el ámbito de las levaduras).




Se ha llevado a cabo el tratamiento de imágenes digitales de células de *Saccharomyces cerevisiae* creciendo en dos concentraciones de oxígeno diferentes que se obtuvieron de un trabajo experimental previo para poder realizar el análisis estadístico de un conjunto de parámetros morfológicos para esta levaduras. Se ha establecido un protocolo de trabajo para el tratamiento de imágenes digitales de levaduras mediante el programa libre ImageJ, ajustando parámetros correspondientes al tratamiento de imágenes y diseñando diferentes macros para automatizar el procedimiento, todo ello podrá ser utilizado para futuros trabajos académicos relacionados con este tema. Se ha constatado que la automatización del análisis de imágenes no siempre es el método más idóneo ni garantiza el análisis completo de todas las células, por lo que se ha realizado una revisión individualizada y manual de todas las células analizadas, supervisando y obteniendo los parámetros morfológicos correspondientes.











Se ha ajustado el modelo lineal a trozos de Buchanan a todas las evoluciones experimentales de estos crecimientos microbianos para poder obtener estimaciones de los correspondientes parámetros cinéticos, tiempos en que se producían los cambios entre fases de crecimiento (de fase de adaptación a fase exponencial, y de fase exponencial a fase estacionaria) y velocidades específicas de crecimiento, así como poblaciones iniciales y finales de células, en medios con dos concentraciones distintas de oxígeno. Las duraciones de la fase de exponencial para las réplicas aerobias han sido más cortas que las duraciones observadas en las réplicas microaerófilas, siendo las dos medias significativamente distintas al nivel de significación del 5%. También se han detectado diferencias significativas entre las dos velocidades específicas de crecimiento correspondientes a las dos condiciones de crecimiento, siendo menor la correspondiente a la condición microaerófila. No se han detectado diferencias significativas al nivel de significación del 5% entre condiciones de crecimiento para el tiempo de adaptación, para la población inicial y para la población final conseguida en la etapa estacionaria.



Tanto en condiciones de crecimiento aerobio como microaerófilo, los resúmenes numéricos de tendencia central obtenidos para las variables área, perímetro, diámetros mayor y menor, elongación y circularidad de las células de levadura necesitan ser acompañados por sus respectivas distribuciones, pues no siempre estas distribuciones han resultado ser distribuciones normales o aproximadamente normales. El análisis y la comparación de las distribuciones de estas variables morfométricas a lo largo de los diversos muestreos realizados y analizados han permitido conectar y relacionar la forma de las distribuciones y sus resúmenes numéricos con las tres etapas principales del crecimiento microbiano (fase de adaptación, fase exponencial y fase estacionaria). Se ha observado que estas distribuciones reflejan los cambios entre fases y caracterizan las distintas fases de crecimiento.

La modelización llevada a cabo de estas poblaciones de levaduras, se ha realizado desde dos perspectivas diferentes, desde un nivel microscópico (nivel individual, a nivel de célula con el análisis de las imágenes digitales), y desde un nivel macroscópico (nivel de población con los parámetros cinéticos implicados en el modelo lineal de tres fases de Buchanan). Este tipo de trabajo que conjuga diferentes aproximaciones para estudiar un sistema enriquece de forma muy importante todo el proceso de aprendizaje y enseñanza de los estudiantes en general (y de los estudiantes de ingeniería de biosistemas en particular), y permite avanzar en su investigación.

Referencias

-  [Arias P. \(2012\).](#)
Análisis genómico de la integridad celular en Saccharomyces cerevisiae.
Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid,
Departamento de Microbiología II.
-  [Bamforth C.W. \(2007\).](#)
Alimentos, fermentación y microorganismos.
1ª edición. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
-  [Baty F., Delignette-Muller M.L. \(2013\).](#)
*Package 'nlsMicrobio': Data sets and nonlinear regression models
dedicated to predictive microbiology.*

-  Barquero B., Bosch M., Gascón P. (2011).
Los recorridos de estudio e investigación y la modelización matemática en la enseñanza universitaria de las ciencias experimentales.
Enseñanza de las ciencias, 29, 339–352.
-  Bookstein F.L. (1997).
Morphometric tools for Landmark data: Geometry and Biology.
Reprinted edition. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press.
-  Buchanan R.L., Whiting R.C., Damert W.C. (1997).
When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three phase linear models for fitting bacterial growth curves.
Food Microbiology, 14, 313–326.
-  Carbó R., Ginovart M., Carta A., Portell X., del Valle L.J. (2015).
Effect of aerobic and microaerophilic culture in the growth dynamics of Saccharomyces cerevisiae and in training of quiescent and non-quiescent subpopulations.
Archives of Microbiology, 197, 991–999.
-  Cipollina C., Vai M., Porro D., Hatzis C. (2007).
Towards understanding of the complex structure of growing yeast populations.
Journal of biotechnology, 128, 393–402.
-  Coelho M.A.Z., Belo I., Pinheiro R., Amaral A.L., Mota M., Coutinho J.A.P., Ferreira E.C. (2004).
Effect of hyperbaric stress on yeast morphology: study by automated image analysis.
Applied Microbiology and Biotechnology, 66, 318–324.
-  Garzón S., Hernández C. (2009).
Estudio comparativo para la producción de etanol entre Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950.
Trabajo final de grado, Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnologías, Pereira.
-  Gaspar E., Oprean L., Lengyel E., Iancu R., Olosutean H. (2011).
Bio-technological characterization of the Saccharomyces bayanus yeast strains in order to preserve the local specificity.
Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 44, 383–388.
-  Groves J.D., Falsont P., Le Mairet M., Tanner M.J.A. (1996).
Functional cell surface expression of the anion transport domain of human red cell band 3 (AE1) in the yeast Saccharomyces cerevisiae.
Proceedings of the National Academy of Sciences, 93, 12245–12250.
-  Martínez Á., Sampedro A. (1994).
Técnicas de microscopía, manipulación y análisis: Proceso digital de imágenes microscópicas.
A Coruña, España: Universidade da Coruña, Servicio de Publicaciones.

-  [Pertusa J.F. \(2010\).](#)
Técnicas de análisis de imagen: Aplicaciones en Biología.
2ª edición. Valencia, España: Universitat de València.
-  [Portell X., Ginovart M., Carbó R., Vives-Regó J. \(2011\).](#)
*Differences in stationary phase cells of a commercial
Saccharomyces cerevisiae wine yeast grown in aerobic
and microaerophilic batch cultures assessed by electric particle analysis,
light diffraction and flow cytometry.*
Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 38, 141–151.
-  [Ribas J., Pérez A. \(2012\).](#)
Desarrollo de Saccharomyces cerevisiae en condiciones aeróbicas y microaerófilas.
Trabajo final de carrera, Universitat Politècnica de Catalunya,
Escola Superior de Agricultura de Barcelona.
-  [Rohlf F.J., Marcus L.F. \(1993\).](#)
A revolution in morphometrics.
Trends in Ecology & Evolution, 8, 129–132.
-  [Tibayrenc P., Preziosi-Belloy L., Ghommidh C. \(2011\).](#)
*Single-cell analysis of S. cerevisiae growth recovery after a sublethal
heat-stress applied during an alcoholic fermentation.*
Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 38, 687–696.
-  [Toro I.M.V., Manríquez S.G., Suazo G.I. \(2010\).](#)
*Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología
descriptiva a la morfometría cuantitativa.*
International Journal of Morphology, 28, 977–990.
-  [Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. \(2004\).](#)
Geometric Morphometrics for Biologists: Introduction.
San Diego, Estados Unidos: Elsevier Academic Press.

Modelling in Science Education and Learning
<http://polipapers.upv.es/index.php/MSEL>