UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

INFLUÈNCIA DE LES CONDICIONS DE CREIXEMENT EN LA MIDA CEL·LULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

Treball final de grau

Enginyeria de sistemes biològics

Autora: Jéssica Ferreira Vicente

Tutores: Rosa Carbó

Marta Ginovart

9 / gener / 2015

Resum

En aquest projecte s'estudia la influència del medi en la morfologia del llevat *Saccharomyces cerevisiae* creixent en cultiu tancat. En les mateixes condicions de temperatura (27°C) i agitació constant s'assagen tres diferents concentracions inicials de glucosa (150, 200 i 250 g/L). Es posa a punt la tècnica experimental de preparació cel·lular i de medi per la posterior captura de les imatges; es desenvolupa i aplica un mètode d'anàlisi d'imatges automatitzat, tot explorant les possibilitats del programa ImageJ, per a obtenir paràmetres morfològics de les cèl·lules. Es procedeix a fer l'anàlisi exploratòria de les dades obtingudes. Els resultats mostren que per a 150 g/L de glucosa, la mitjana de l'àrea de les cèl·lules és la més elevada, mentre que per a 250 g/L, la mitjana és la més baixa.

Resumen

En este proyecto se estudia la influencia del medio en la morfología de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* creciendo en cultivo cerrado. Con las mismas condiciones de temperatura (27°C) y agitación constante se ensayan tres diferentes concentraciones iniciales de glucosa (150, 200 i 250 g/L). Se pone a punto una técnica experimental de preparación celular y de medio para la posterior captura de las imágenes; se desarrolla y aplica un método de análisis de imagen automatizado, explorando las posibilidades del programa ImageJ, para obtener parámetros morfológicos de las células. Se procede a hacer el análisis exploratorio de los datos obtenidos. Los resultados muestran que para 150 g/L de glucosa, la media del área de las células es la más elevada, mientras que para 250 g/L, ésta es la más baja.

Abstract

Influence of the culture medium on the morphology of *Saccharomyces cerevisiae* growing in batch culture is studied. Under the same conditions of temperature (27°C) and constant shaking three different initial glucose concentration (150, 200 i 250 g/L) are investigated. An experimental technique of cell and medium culture preparation is established in order to perform an image acquisition and a subsequent image analysis. A method using automatic image analysis to obtain cell morphology parameters is developed and applied using ImageJ software. Exploratory analysis is done with the resulting data. The highest average cell area was found for 150 g/L of glucose while for 250 g/L this value is the lowest.

Sumari

Índex de figures 5

Índex de taules 7

Agraïments 8

1. INTRODUCCIÓ 9

a. Saccharomyces cerevisiae 9

a.i. Biologia 9

a.ii. Aplicacions 11

b. Tractament d'imatges 14

b.i. Image J i Fiji 15

***2.* OBJECTIUS** 17

3. METODOLOGIA 17

a. Materials 17

a.i. Soca 17

a.ii. Obtenció i tractament de les imatges 18

b. Mètodes 18

b.i. Composició del medi 18

b.ii. Condicions de creixement 19

b.iii. Extracció de les mostres 19

b.iv. Captura de les imatges 20

b.v. Tractament de les imatges 21

b.vi. Anàlisi de les imatges 22

***b.vii.* Anàlisi estadística de les dades** 23

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ 24

a. Establiment dels paràmetres per a la captura de les imatges 24

b. Establiment de les accions o passos a fer en el tractament de les imatges 25

c. Anàlisi estadística de les dades 35

4. CONCLUSIONS 57

5. BIBLIOGRAFIA 58

Índex de figures

Figura 1. Influència de les concentracions de O_2 i de glucosa sobre el metabolisme de *S. cerevisiae*. 10
Figura 2. Cicle de reproducció del llevat. 11
Figura 3. Classificació dels vinagres segons la seva matèria primera..... 13
Figura 4. Imatge física i el seu equivalent en digital.. 15
Figura 5. Captura de pantalla de l'inici del programa ImageJ amb el paquet Fiji. 16
Figura 6. Captura de pantalla del programa Perfect Image V7.7. 18
Figura 7. Exemple d'imatge amb escala. 20
Figura 8. Captura de pantalla del programa ImageJ. 21
Figura 9. Captura de pantalla de la finestra emergent de la funció Analyze Particles. 23
Figura 10. Diferents opcions de relació RGB.. 24
Figura 11. Exemple d'una imatge extreta amb la relació de colors RGB [1,1.2,3.5] 25
Figura 12. Diverses proves d'extracció de fons. 26
Figura 13. Proves de diferents mètodes d'ajust de *Threshold*. 27
Figura 14. Imatge d'una cèl·lula oberta i resultat després d'executar el comandament *Close*... 27
Figura 15. Imatge en binari de les cèl·lules i el resultat d'aplicar el comandament *Fill Holes* per omplir les partícules. 28
Figura 16. Imatge amb totes les partícules omplertes i resultat d'aplicar la funció *Watershed*. 28
Figura 17. Partícules analitzades i taula de resultats. 29
Figura 18. Primeres macros inserides en el programa ImageJ..... 29
Figura 19. Resultat d'aplicar la segona macro. 30
Figura 20. Captura de pantalla de la macro del programa ImageJ..... 31
Figura 21. Imatges dels passos seguits pel programa ImageJ.. 32
Figura 22. Resultat d'aplicar la segona macro 33
Figura 23. Dues possibles maneres d'analitzar imatges amb brutícia de fons..... 34
Figura 24. Histogrames de l'àrea separats per la variable temps per a la concentració inicial de 150 g/L de glucosa..... 37
Figura 25. Histogrames de l'àrea separats per la variable temps per a la concentració inicial de 200 g/L de glucosa..... 38
Figura 26. Histogrames de l'àrea separats per la variable temps per a la concentració inicial de 250 g/L de glucosa..... 39
Figura 27. Informe de resum de l'histograma de l'àrea per a les mostres de 150 g/L de glucosa al temps 5,75 h. 40
Figura 28. Informe de resum de l'histograma de l'àrea per a les mostres de 150 g/L de glucosa al temps 12 h. 41
Figura 29. Informe de resum de l'histograma de l'àrea per a les mostres de 150 g/L de glucosa al temps 16 h. 42
Figura 30. Informe de resum de l'histograma de l'àrea per a les mostres de 150 g/L de glucosa al temps 23,75 h. 43
Figura 31. Informe de resum de l'histograma de l'àrea per a les mostres de 150 g/L de glucosa al temps 33,75 h. 44
Figura 32. Histograma de la distribució de la circularitat pels tres assajos diferents 46

Figura 33. Gràfica de dispersió relacionant l'alçada amb l'amplada per cada temps per l'assaig de 150 g/L de glucosa..... 47
Figura 34. Gràfica de dispersió relacionant l'alçada amb l'amplada per cada temps per l'assaig de 200 g/L de glucosa..... 48
Figura 35. Gràfica de dispersió relacionant l'alçada amb l'amplada per cada temps per l'assaig de 250 g/L de glucosa..... 49
Figura 36. Gràfica de dispersió relacionant les mesures dels diàmetres major i menor per cada temps per l'assaig de 150 g/L de glucosa..... 50
Figura 37. Gràfica de dispersió relacionant les mesures dels diàmetres major i menor per cada temps per l'assaig de 200 g/L de glucosa..... 51
Figura 38. Gràfica de dispersió relacionant les mesures dels diàmetres major i menor per cada temps per l'assaig de 250 g/L de glucosa..... 52
Figura 39. Gràfica de dispersió relacionant l'alçada amb l'amplada per l'hora 22 de l'assaig de 200 g/L de glucosa..... 53
Figura 40. Gràfica de dispersió relacionant les mesures dels diàmetres major i menor per l'hora 22 de l'assaig de 200 g/L de glucosa. 54
Figura 41. Histogrames de la distribució del diàmetre menor i major segons l'assaig ajustats i amb línies de referència a les marques de 4 i 8 µm..... 55
Figura 42. Histograma de l'elongació per cada concentració de glucosa inicial (150, 200 i 250 g/L). 56

Índex de taules

Taula 1. Descripció dels paràmetres morfològics mesurats. 22
Taula 2. Recompte del nombre de cèl·lules totals. 35
Taula 3. Classificació segons els nous grups de temps. 35
Taula 4. Valor de la mitjana i desviació estàndard de l'àrea en el temps 40,25 de l'experiment. 44
Taula 5. Resultats de l'ajust de la recta de regressió. 54
Taula 6. Estadístics bàsics de la mida dels diàmetres major i menor segons l'assaig 55

Agraïments

Gràcies a les meves tutores per haver tingut tanta paciència amb mi i haver-me ajudat tant amb el treball.

1. INTRODUCCIÓ

a. Saccharomyces cerevisiae

a.i. Biologia

Saccharomyces cerevisiae, també conegut com a llevat de la cervesa o del pa, és un fong del grup dels ascomicets. És un organisme unicel·lular eucariota, de forma arrodonida que es reprodueix per gemmació.

Els sucres són la seva principal font de carboni i d'energia; el llevat és capaç de fermentar la sacarosa (glucosa i fructosa), galactosa, manosa i hexoses en general. Pel contrari no fermenta maltosa, lactosa ni pentoses. Pel que fa al nitrogen, aquest element constitueix el 10% de la matèria seca (Cáceres i Reyna, 2002), les principals fonts són les sals d'amoni i l'acetat d'amoni, i segons si es vol un creixement moderat o òptim necessita font suplementària d´aminoàcids . Segons l'aplicació a la qual va destinat el microorganisme, pa, cervesa o vi, els productes desitjats de la fermentació són diferents. Per exemple, si es vol fer pujar la massa de pa, el llevat ha de produir CO_2, en canvi, si el que es vol és vi o cervesa, l'interès de *Saccharomyces cerevisiae* està en la producció d'etanol. Per contraposició, si el que es desitja és obtenir biomassa com per exemple en la producció de proteïna unicel·lular o també d'estàrters, la fermentació alcohòlica no interessa i per tant el microorganisme ha de viure en un medi ric en oxigen i també en nutrients, per tal que el creixement sigui òptim.

Aquests diferents productes i l'optimització de la producció s'aconsegueixen mitjançant la variació de les condicions de cultiu i la concentració de nutrients.

El llevat resisteix temperatures d'entre 0 i 40°C, essent l'òptima entre els 28 i els 35°C, i el pH intern es troba entre 5.8 i 6.3, mentre que el pH extern pot estar entre 3 i 7, és a dir, és un organisme acidòfil.

Quan es cultiva en medi líquid amb glucosa com a font de carboni, *S. cerevisiae* mostra cinc fases de creixement ben definides, que són la fase de latència (o fase lag), la fase de creixement exponencial (o log), la fase diàuxica, la postdiàuxica i la fase estacionària. La fase lag és la primera fase, es dóna en el moment en què s'inocula el microorganisme i és aquella en la qual el nombre de cèl·lules viables no creix ni decreix. Segons les condicions en les quals es troba l'inòcul inicial serà més llarga o més curta; per exemple, si el cultiu es fa a partir d'un llevat en fase de creixement exponencial la fase de latència serà molt curta. La segona fase és la logarítmica, en aquesta fase l'organisme es divideix produint un creixement exponencial del cultiu i assolint la velocitat màxima de duplicació; durant aquesta fase les cèl·lules duen a terme el metabolisme fermentatiu, tot produint etanol. En disminuir la concentració de glucosa, les cèl·lules travessen per un canvi diàuxic, què és un breu període de temps en el qual no hi ha divisió i la cèl·lula canvia d'un metabolisme fermentatiu a un respiratori. En la fase postdiàuxica, el creixement es duu a terme en un ràtio molt més baix, les cèl·lules fan servir com a font de carboni l'etanol produït en la fase exponencial i incrementen la seva resistència a l'estrès gradualment (Folch-Mallol et al., 2004).

Com a resultat de la mancança de font de carboni al medi, les cèl·lules responen a l'estrès tot aturant el creixement i entrant en un estat de no-proliferació conegut com a fase estacionària o G_0. En aquesta fase les cèl·lules mantenen la viabilitat per períodes extensos sense afegir nutrients però retenen l'habilitat de prosseguir amb el creixement, que es torna a posar en funcionament de manera ràpida en el cas que els nutrients apropiats estiguin disponibles (Werner-Washburne et al, 1993). Durant aquesta fase, les cèl·lules assoleixen el màxim nivell de resistència a l'estrès acumulant carbohidrats de reserva com la trehalosa i el glucogen i fent més gruixuda i resistent la seva membrana cel·lular (Folch-Mallol et al., 2004).

Quan s'introdueix un cabal d'aire al cultiu cel·lular, la producció d'etanol disminueix i el microorganisme fa servir principalment el metabolisme respiratori; i es poden dur a terme totes les fases de creixement exclusivament amb la respiració.

És imprescindible controlar l'alternança entre el metabolisme fermentatiu i respirador, si el que es vol és produir diòxid de carboni o alcohol, s'ha d'afavorir el metabolisme fermentatiu, en canvi, si el que es desitja és obtenir massa de llevat o qualsevol altre producte cel·lular, les condicions més favorables es troben al metabolisme respirador. En condicions més restrictives, el llevat es comporta com molts altres fongs del grup dels ascomicets, formant ascòspores per donar lloc a formes resistents i de major variabilitat genètica. Per tal de controlar aquesta producció, s'ha de variar la disponibilitat de glucosa i d'oxigen tal com es mostra a la Figura 1.

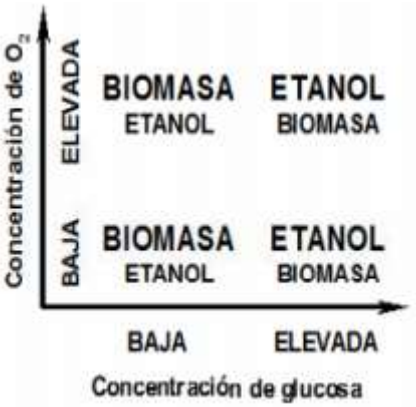


Figura 1. Influència de les concentracions de O_2 i de glucosa sobre el metabolisme de *S. cerevisiae*. En un procés de producció de biomassa es requereix establir baixes concentracions de glucosa i procurar una elevada concentració d'oxigen dissolt, així com per produir el màxim etanol caldrà una elevada concentració de glucosa i baixa concentració d'oxigen al medi. (Hernández-Oropeza et al, 2011)

El *S. cerevisiae* es pot reproduir tant de manera sexual com asexual segons les condicions en què es troba. Si les condicions són adverses, la cèl·lula diploide forma espores (4 espores, 2 de tipus a i 2 de tipus α), que són més resistents i incrementen la diversitat de la població, ja que els nous individus ja no seran clons. Les espores de diferent tipus[1] s'uneixen per formar un zigot que es desenvoluparà fins formar una cèl·lula diploide que es podrà reproduir asexualment, és a dir, per gemmació. La gemmació és un tipus de reproducció asexual que es

[1] Els tipus de les espores vénen difereixen per la presència de l'al·lel a o α, que determinen el tipus sexual.

tracta d'una divisió asimètrica que s'inicia amb la formació d'una prominència anomenada gemma sobre l'individu progenitor. Aquesta gemma creix fins assolir una mida crítica i es separa de la cèl·lula inicial, formant un nou individu. Tot aquest cicle es pot veure a la Figura 2.

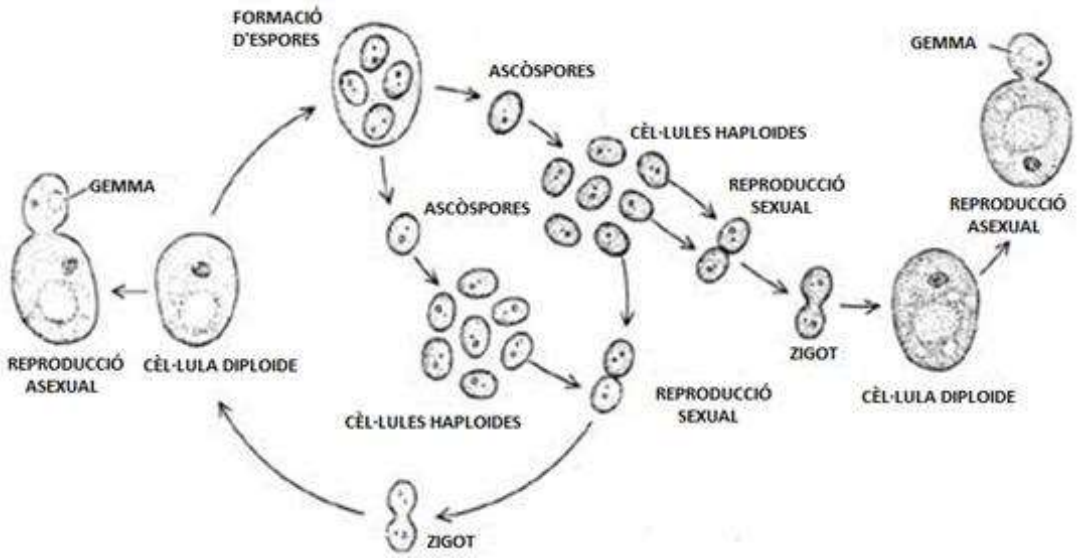


Figura 2. Cicle de reproducció del llevat. Font: Las Levaduras (http://laslevaduras.mex.tl/788496_REPRODUCCI-N.html) [Imatge modificada]

Per iniciar la gemmació cal que la cèl·lula mare arribi a una mida crítica i dupliqui el seu ADN, aquesta mida crítica no és sempre la mateixa, sinó que s'incrementa lleugerament segons l'edat genealògica, mentre que la mida crítica de la cèl·lula filla és sempre la mateixa per separar-se de la cèl·lula mare (Lord i Wheals, 1980 i Porro et al., 2003).

El creixement de *S. cerevisiae* és asíncron[2], dues cèl·lules de la mateixa mida no tenen necessàriament la mateixa edat ni es troben al mateix estadi del cicle (Cipollina et al.,2005).

Pel que fa a la mida cel·lular, generalment les cèl·lules creixen més lentament en medi pobre i entren més petites a la fase inicial.

a.ii. Aplicacions

El llevat s'ha utilitzat durant més de 9000 anys, a les antigues civilitzacions de la Xina, Iran i Egipte ja es produïen begudes fermentades, tot i que es desconeixia la raó científica de les transformacions. A partir de la invenció del microscopi el llevat va començar a ser observat com a ésser viu. Al segle XIX, més concretament, el 1897, els germans Hans i Edward Buchner van moldre llevat per pa i van afegir una gran quantitat de sucre per evitar la possible contaminació, descobrint així que el sucre fermentava de manera ràpida. Per primer cop s'havia descobert un model per l'estudi de la fermentació alcohòlica. Aquest descobriment va atraure l'atenció de bioquímics, que van començar a analitzar cada un dels passos que portaven a la producció d'etanol i de diòxid de carboni a partir de glucosa. Aquest treball va

[2] Creixement asíncron: cada microorganisme del cultiu es troba en un punt diferent del cicle cel·lular, és a dir, en un moment determinat es troben cèl·lules que acaben de dividir-se, altres que estan replicant el seu ADN, altres que estan creixent, etc.

donar com a resultat el descobriment i descripció del metabolisme del carboni, vies que coneixem i estudiem actualment. Així, des de finals del segle XIX es va reconèixer la utilitat de *Saccharomyces cerevisiae* com a model biològic en la investigació, per una banda per la facilitat d'obtenció de grans quantitats d'aquest microorganisme i per l'altra pel seu cicle de vida.

A partir d'aquest moment, *S. cerevisiae* va esdevenir un dels organismes més importants, ja no solament per la producció de begudes alcohòliques i pa, sinó com a model biològic. El seu genoma es va desxifrar al 1996, aconseguint per primer cop l'estructura del genoma d'una cèl·lula eucariota, aquest consta de 12 milions de bases organitzades en 16 cromosomes.

Aquest llevat està molt present a la indústria alimentària, una de les aplicacions més conegudes és per fer pa. El pa es va descobrir accidentalment al deixar passar un temps abans de posar la barreja de gra mòlt amb aigua o llet al forn. La tecnologia de la panificació va tenir un gran avanç durant el segle XVIII, quan es va començar a produir industrialment el llevat. La funció del llevat durant la fabricació del pa és generar diòxid de carboni a partir dels sucres afegits a la massa o dels que procedeixen de la farina i a més per la seva alta composició proteica aporta valor nutritiu i també sabor del producte final juntament amb altres components i microorganismes.

Pel que fa a les begudes, *S. cerevisiae* està present en la producció de cervesa i vi, entre d´altres. La cervesa es fa a partir de malta[3], podent afegir adjunts com l'arròs, el blat de moro o el blat, el llúpol, que aporta aroma, gust amarg a la cervesa i inhibeix el creixement de microorganismes no desitjats, aigua i llevat. La matèria primera del vi és el raïm i segons el tipus de vi s'escull el tipus d'aquest i també la soca de llevat més adequada. La resta d'ingredients i els procediments varien també.

[3] Malta: són els grans d'ordi sotmesos a la germinació i ulterior dessecació i torrats en condicions tecnològicament adequades, també pot ser malta de cereals (mateix procediment però amb cereals diferents a l'ordi) (BOE, 1996)

Un altre producte alimentari molt important a la indústria és el vinagre, tenint diferents opcions de matèries primeres, com es pot apreciar a la Figura 3.

LA CLASIFICACIÓN DE LOS VINAGRES, CON BASE EN LA MATERIA PRIMA

Nombre del vinagre	Materia prima	Método de obtención
Vinagre de vino	Vino	Fermentación acética del vino obtenido por fermentación alcohólica del jugo de uvas
Vinagre de malta	Malta de cebada	Fermentación alcohólica de la malta de cebada y posterior fermentación acética del producto
Vinagre de vino de fruta	Vinos de frutas	Fermentación acética de los vinos obtenidos por fermentación alcohólica del jugo de frutas diferentes de la uva
Vinagre de sidra	Jugo de manzana	Fermentaciones alcohólica y acética del jugo de manzana
Vinagre de espíritu	Alcohol destilado	Fermentación acética del alcohol destilado
Vinagre de frutas	Frutas	Fermentaciones alcohólica y acética de un tipo de fruta madura

Figura 3. Classificació dels vinagres segons la seva matèria primera. Font: Hernández Peñaranda, 2003.

La producció del vinagre, a més de la fermentació alcohòlica duta a terme pel llevat *S. cerevisiae*, també passa per un procés d'oxidació acètica en la qual s'obté àcid acètic mitjançant l'activitat de bacteris acètics, sobretot del gènere *Acetobacter*.

El mateix alcohol que trobem en begudes com la cervesa i el vi no només té com a funció l'elaboració de begudes, sinó que també és un producte fonamental per a altres indústries, com són la química, la farmacèutica, la medicinal i la cosmètica, on l'etanol es fa servir com a matèria primera i com a auxiliar. Hi ha moltes maneres d'obtenir etanol, una de les més importants és a partir del gas etè (etilè), que és un subproducte a les refineries de petroli. Degut a la disminució de les reserves del petroli el seu cost s'ha incrementat i el seu mercat ha patit diverses crisis al llarg de la història. Arran d'aquesta problemàtica amb un recurs limitat i tenint en compte que a més, el procés de extraure'l, refinar-lo, transportar-lo i fer-lo servir com a combustible és molt contaminant, es va començar a buscar altres alternatives més respectuoses amb el medi ambient i que tingués menys problemàtica en termes econòmics. Cada cop ha anat adquirint més importància l'elaboració d'alcohol per fermentació.

Un bon exemple de producció i aplicació d'etanol el trobem a Brasil, on després de la crisi del petroli de 1973, el govern, juntament amb empreses privades, va crear un programa nacional per a fabricar alcohol per fermentació del sucre de canya i construir motors compatibles amb aquest combustible. Avui dia, més de la meitat de vehicles funcionen amb aquest combustible, n´hi ha que funcionen tant amb benzina com amb etanol, i fins i tot amb la barreja dels dos. Més països segueixen aquest exemple, als Estats Units també s'utilitza etanol, però no és tan comú que els vehicles funcionin exclusivament amb aquest combustible, sinó com a component d'una barreja amb la benzina.

Per altra banda, el llevat com a biomassa també té les seves aplicacions, com és el suplement alimentari tant humà com animal en forma de PUC (Proteïna Unicel·lular) o *single cell protein* (SCP). El procés de producció de PUC consisteix en obtenir grans quantitats de biomassa de

microorganismes unicel·lulars, que poden ser bacteris, llevats, algues unicel·lulars o fongs filamentosos; aquesta obtenció es duu a terme en bioreactors on s'inoculen els microorganismes, se'ls aporta un substrat i les condicions adequades per a la seva reproducció. Aquesta idea va sorgir com a opció per a cobrir la manca d'aliment a escala mundial ja que la seva velocitat de reproducció és molt elevada com també ho és la seva productivitat; es pot fer créixer en substrats barats, inclús amb residus agroindustrials i a més la seva producció no depèn dels factors estacionals o climàtics, donat el sistema de producció en fermentadors i quimiòstats. Durant la Primera Guerra Mundial, a Alemanya va créixer l'interès en la producció de PUC a causa de la mancança d'aliments; la producció es va centrar en *S. cerevisiae* i va arribar a reemplaçar fins el 60% de la proteïna importada abans de la guerra (Chacón, 2004). Un cop finalitzat el conflicte, l'interès va decréixer (Israelidis, 2003). A l'arribada de la Segona Guerra Mundial es reactiva l'interès en la biomassa microbiana. Només als Estats Units es van produir 15.000 tones anuals de PUC, que va ser incorporada a la dieta en forma de sopes i salsitxes (Israelidis, 2003).

Aquest ésser viu és un dels microorganismes més utilitzats en la indústria, tant per produir pa com begudes alcohòliques (cervesa, vins i cava) i també s'utilitza com a model als laboratoris, en investigació i fins i tot hi ha soques que produeixen etanol com a combustible (Park et al., 2014). Avui dia, s'utilitza com a suplement nutricional tant per humans com per animals. Es comercialitza com a llevat de cervesa tant com a complement per posar en amanides com en pastilles i es recomana en dietes degut al seu contingut en proteïna, vitamina B i minerals com el crom o el zinc.

b. Tractament d'imatges

El tractament d'imatges o processament digital d'imatges és la manipulació d'aquestes mitjançant un ordinador amb un objectiu, obtenir informació a partir d'una imatge determinada. Per tal de complir aquest objectiu, el tractament d'imatges permet millorar la qualitat de la imatge o modificar-la. És una disciplina relativament recent que en els últims anys ha anat creixent de manera molt ràpida, en part degut a l'increment dels coneixements tecnològics adquirits i en part per la reducció dels costos del material utilitzat en el processament. Cada cop més es desenvolupen eines i programes per tal de poder afinar en el tractament i obtenir resultats més precisos, així com per fer aquesta eina més accessible als usuaris sense la necessitat de tenir un coneixement ampli de la matèria.

Com que els ordinadors treballen amb dades numèriques, les imatges en ser digitalitzades són convertides en matrius on cada nombre és una petita regió anomenada element de la imatge o píxel. Cada píxel té un valor que indica el color o nivell de brillantor o foscor de la imatge en un punt determinat (Figura 4). El que es pot processar mitjançant l'ordinador no és la imatge en sí, sinó els valors dels píxels que la composen a partir de càlculs i operacions algebraiques i geomètriques. És a dir, després de digitalitzar la imatge, ja sigui mitjançant un escanejat d'una imatge revelada o amb la captura de la imatge amb una càmera digital, el resultat que entén l'ordinador és una matriu numèrica que indica el color a cada punt. Hi ha una àmplia varietat de programes disponibles per tal de tractar aquestes imatges. Inicialment l'única opció era mitjançant operacions amb la matriu, de manera que l'usuari havia de tenir amplis

coneixements matemàtics i també informàtics per poder fer qualsevol modificació en la imatge, però avui dia els programes són molt més accessibles i fàcils de manipular.

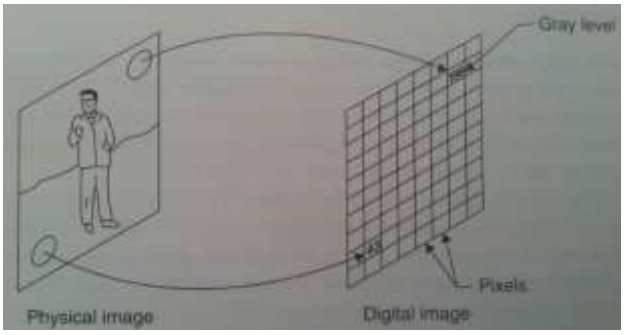


Figura 4. Imatge física i el seu equivalent en digital. Font: Castleman, 1996.

El processament digital d'imatges té moltes aplicacions, en camps completament diferents, des de la publicitat i la moda fins la recerca de nous materials o medicina. Ens centrem en la seva aplicació en fotografia científica, més concretament en microfotografia òptica. Aquest tipus de fotografia té per objectiu obtenir informació valuosa en forma d'imatges per a la investigació o el control de processos tant en la ciència, com la indústria o la educació.

La fotografia científica és un conjunt de tècniques diferents, i no hi ha molta informació disponible d'aquest tema, el que fa que no sigui fàcil conèixer totes les metodologies utilitzades pels professionals.

El processament digital d'imatges en biologia és molt útil per prendre mesures estalviant el màxim de temps possible, mentre que en alguns casos és l'única opció per obtenir bones estimacions de dades determinades, com per exemple mesures de partícules o de cèl·lules. La possibilitat d'automatitzar els processos d'anàlisi d'imatges no només ajuda a poder fer el tractament i anàlisi de manera ràpida, sinó també d'una manera més precisa i fiable, donant la possibilitat d'aplicar el mateix procediment a totes les imatges en el cas que sigui possible, és a dir, que tinguin les mateixes característiques. L'automatització permet objectivitat ja que el tractament no queda sotmès a criteris subjectius deguts a la persona que fa l'anàlisi o bé al moment en que l'executa. S'ha de tenir en compte que l'automatització només és possible per a imatges de les mateixes característiques, si no els resultats podrien no ser fiables.

b.i. Image J i Fiji

Per tractar imatges hi ha una gran diversitat de programes disponibles. Un dels més utilitzats en biologia és el Matlab®, ja que dóna molta llibertat d'actuació i permet a l'usuari crear els seus propis algorismes i fer anàlisis matemàtiques de la imatge. No obstant atenent a que MATLAB® és un programa comercial amb un llenguatge d'alt nivell i en un entorn interactiu per al càlcul numèric, la visualització i la programació, el seu maneig no es immediat. Cal també tenir en consideració que és un programa que no està dissenyat expressament per aquesta aplicació d'anàlisi d'imatges en biologia i que el seu preu és elevat.

Com una alternativa molt atractiva, es pot disposar avui en dia, de programari lliure especialitzat en el tractament i l'anàlisi, essent ImageJ un exemple. ImageJ és un programa de domini públic desenvolupat per l'Institut Nacional de la Salut (NIH) dels Estats Units que permet reproduir, editar, analitzar, desar i imprimir imatges de 8, 16 i 32 bits. També pot llegir altres formats i transformar-los en els formats anteriors. Pot mesurar distàncies i angles, calcular àrees, crear histogrames de densitat, dur a terme transformacions geomètriques i rotacions (http://imagej.nih.gov/ij/index.html).

L'usuari també té la possibilitat de dissenyar algorismes pel tractament i anàlisi de les imatges en diversos llenguatges de programació, com per exemple: Java, Javascript, Python, Ruby o Clojure, o simplement implementar una macro en llenguatge del propi programa ImageJ. Aquest programa ImageJ ha estat dissenyat amb una arquitectura oberta que proporciona extensibilitat mitjançant *plugins*[4] de Java. Aquests *plugins* poden ser desenvolupats per l'usuari segons les seves necessitats i permeten resoldre gairebé qualsevol problema de processament d'imatges o d'anàlisi. ImageJ disposa d'una extensa llibreria de *plugins* que mostren exemples de resolució d'aquests problemes (http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/#utilities).

Fiji (Figura 5) és un paquet de processament d'imatge afegit al programa ImageJ, que porta una sèrie de *plugins* instal·lats i organitzats en un menú ben estructurat i coherent. Aquest paquet està enfocat per a ser utilitzat en la recerca i té diversos avantatges per a un usuari, ja que és molt fàcil d'instal·lar i disposa d'una funció d'actualització automàtica. Es pot descarregar per internet a la seva pàgina oficial (http://fiji.sc/Fiji) i, com l'ImageJ, està obert a qualsevol usuari, alhora que permet als usuaris de contribuir amb *plugins*, tutorials i documentació diversa. El projecte Fiji cerca la millora de les eines pel processament i anàlisi de dades en les ciències naturals i per assolir aquest objectiu, col·labora en diversos projectes.

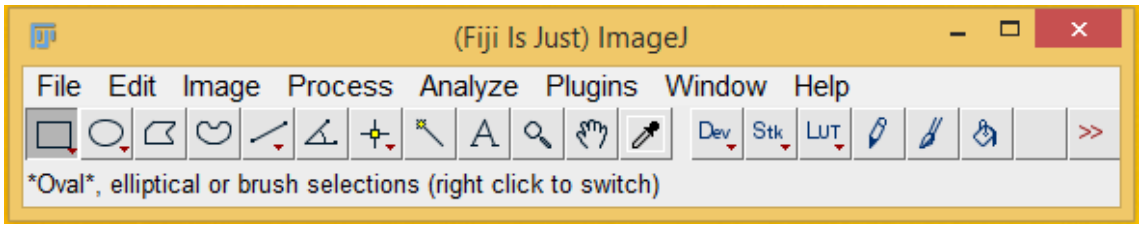


Figura 5. Captura de pantalla de l'inici del programa ImageJ amb el paquet Fiji.

[4] *Plugins:* també anomenats complements o extensions, són aplicacions que es relacionen amb una altra per tal d'aportar una funció específica nova. La paraula prové de l'anglès *plug-in* (endollable o connector).

2. OBJECTIUS

Aquest projecte té els següents objectius:

a) Posar a punt la tècnica experimental de preparació cel·lular i de medi per a la captura i tractament d'imatges digitals de les cèl·lules de llevat, possibilitant la distinció entre cèl·lules vives i cèl·lules mortes.

b) Establir un protocol de treball per adequar la metodologia d'anàlisi d'imatges digitals a aquestes cèl·lules de llevat mitjançant un programari lliure adient .

c) Avaluar els canvis morfològics i de mida de les cèl·lules que es produeixen durant les fases de latència, logarítmica i estacionària en l'evolució d'un cultiu de llevats tancat.

d) Estudiar la influència de les concentracions inicials de 150, 200 i 250 g/l de glucosa en les mides i morfologia de les cèl·lules de llevats creixent en el cultiu tancat.

3. METODOLOGIA

a. Materials

a.i. Soca

La soca emprada en aquest estudi és una soca deshidratada i seca de la marca comercial Vitilevure® anomenada *Saccharomyces cerevisiae DV10™*. Aquest microorganisme té una alta tolerància a l'alcohol (de fins 17%), la seva cinètica fermentativa és ràpida i el rang de temperatura és de 8 a 32°C. Resisteix pH baixos de fins 2,8-2,9 a dosis importants de SO_2, produeix poca escuma i poca acidesa volàtil. El DV10 està destinat a la producció de vi, especialment per la vinificació de vins sense gas amb gran potencial d'alcohol. Gràcies a les seves propietats enològiques i microbiològiques, s'adapta particularment a les condicions difícils dels llevats destinats a vins base per la producció de vins escumosos, generalment baixos en nitrogen. Els vins obtinguts a partir de la fermentació de *S. cerevisiae DV10* presenten qualitats organolèptiques equilibrades amb un discret caràcter afruitat.

a.ii. Obtenció i tractament de les imatges

Per obtenir les imatges s'ha fet servir un microscopi òptic Nikon Eclipse LV100 amb una càmera Infinity1 connectada a l'ordinador. El software emprat per captar les imatges és el Perfect Image V7.7 de Claravision. Aquest programa permet a l'usuari veure en directe la imatge del microscopi, indicar els augments que s'estan fent servir i després es pot prendre una fotografia en el moment desitjat mitjançant el botó "Snap" que s'observa a la Figura 6. S'ha de tenir en compte que el programa també dóna l'opció de fer canvis en les propietats de la imatge abans de prendre-la.

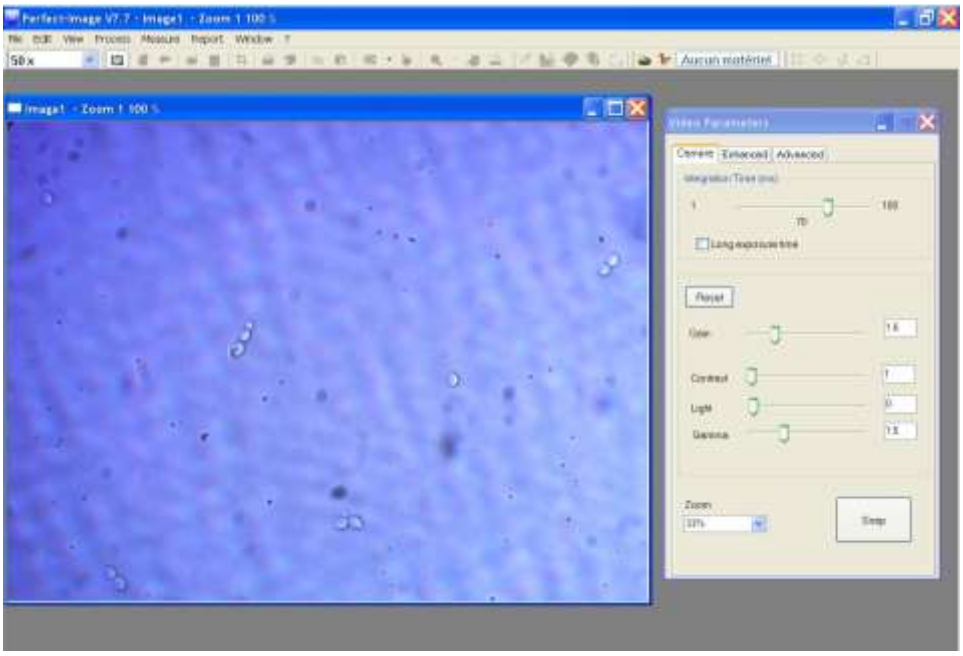


Figura 6. Captura de pantalla del programa Perfect Image V7.7.

b. Mètodes

b.i. Composició del medi

Per poder estudiar l'efecte de les diferents concentracions de glucosa es van dur a terme tres assajos, per triplicat, en un medi base al que se li va afegir les concentracions de 150, 200 o 250 g/l depenent de l'assaig. El medi base, anomenat Medi Glucosa Peptona (MGP) està compost per 3 g/l d'extracte de llevat, 3 g/l de peptona, glucosa segons l'assaig i aigua destil·lada.

Per a cada assaig es van preparar 2,1 L de medi, que es van disposar en tres ampolles pirex de 250 mL de capacitat amb tap de cotó amb 100 mL de medi i tres ampolles de 1000 mL amb 600 mL de medi. A l'interior dels recipients es va posar un imant i es van esterilitzar a 121°C, durant 15 min.

b.ii. Condicions de creixement

Primer es va preparar el precultiu per a cada repetició en els flascons amb 100mL de medi MGP i amb la concentració de glucosa específica de l'assaig. En condicions estèrils, es van sembrar 1-2 colònies de llevat en cada un dels flascons del precultiu i es va incubar durant 72h a 27°C i agitació constant. Un cop crescut, es va passar a la nevera per tal d'aturar el creixement d'aquestes cèl·lules que ja es trobaven en la fase estacionària; es van deixar un mínim de 24h en refrigeració (≤ 4°C).

L´estudi del creixement de *S.cerevisiae* es va realitzar en els flascons de 1000 mL amb 600 mL de medi. Per començar el cultiu, es van inocular 100µL de suspensió del precultiu en una ampolla amb 600mL de medi MGP. D'aquesta manera s'iniciava el cultiu en la fase de latència del microorganisme. Els cultius romanien a l'estufa a 27 ^{o}C amb agitació constant durant tota la durada de l'experiment (43 h).

b.iii. Extracció de les mostres

Es va realitzar un control cada 90 minuts (i durant les 43h que va durar l'experiment), que consistia en agafar 1mL de mostra de cada cultiu i barrejar amb 1mL de blau de metilè per tal de tintar de blau les cèl·lules mortes. Amb una pipeta Pasteur es va posar un gota de la mostra al portaobjectes i es va cobrir amb el cobreobjectes. Un cop realitzada la preparació, s'observava directament al microscopi per obtenir les fotografies abans que la mostra s'assequés. A partir de la mateixa dilució anterior (blau de metilé-suspensió de llevats) es realitzava una segona preparació per fer el recompte del nombre de cèl·lules. Per això, amb l´ajut de la pipeta Pasteur s´introduïa per capil·laritat entre cobreobjectes i càmera Neubauer la suspensió de llevats. La preparació s´observava al microscopi òptic a 400X i gràcies a la tinció es realitzava el recompte de cèl·lules vives i mortes per poder contextualitzar les imatges amb la fase del cultiu.

Per les hores inicials de l'experiment es va veure que la densitat de cèl·lules era molt baixa i s'obtenien poques cèl·lules a les imatges, i fins i tot mostres sense cap. Es va decidir centrifugar les mostres abans de realitzar la preparació pel microscopi a raó de concentrar les cèl·lules i obtenir millors resultats a les imatges.

b.iv. Captura de les imatges

Les mostres es van passar al microscopi i amb el programa Perfect Image V7.7 es van obtenir les imatges.

Es va tenir en compte que cal establir la quantitat d'augments del microscopi per tal que el programa pugui mesurar l'escala. Un cop mesurada l'escala, el programa imprimeix una escala a sota de la imatge tal com es pot apreciar a la Figura 7.

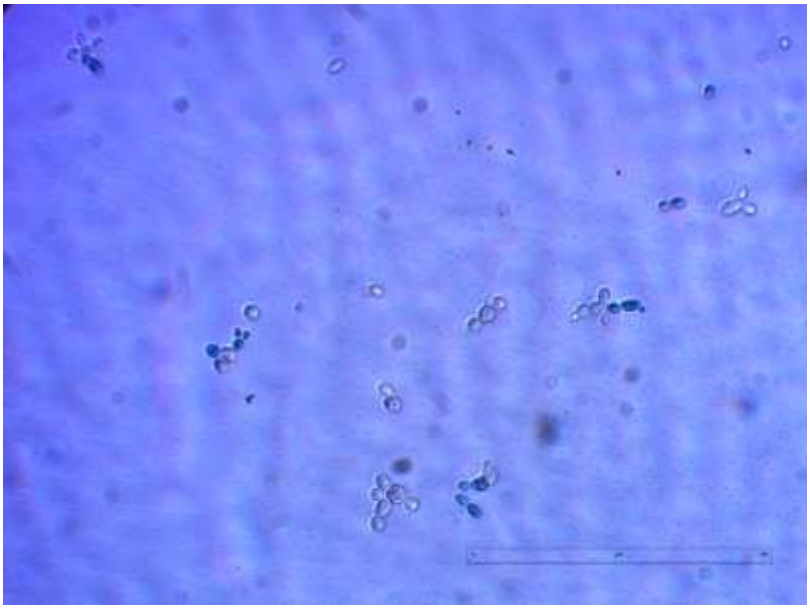


Figura 7. Exemple d'imatge amb escala.

b.v. Tractament de les imatges

El tractament de les imatges es duu a terme amb el programari lliure (Fiji is just)ImageJ; es tracta, com ja s'ha mencionat anteriorment, del programa ImageJ però porta integrats una sèrie de *plugins* que donen més opcions i més possibilitats a l'usuari.

Per tractar les imatges primerament es va mesurar l'escala, per fer-ho es va assenyalar l'escala de la imatge, i indicant quant mesura en µm aquesta distància, l'opció Set Scale del programa ImageJ indica l'equivalència entre µm i píxels en la imatge que es té en pantalla. També dóna l'opció a que totes les imatges que es considerin en una sessió de treball estiguin a la mateixa escala seleccionant "Global" com es pot veure a la Figura 8.

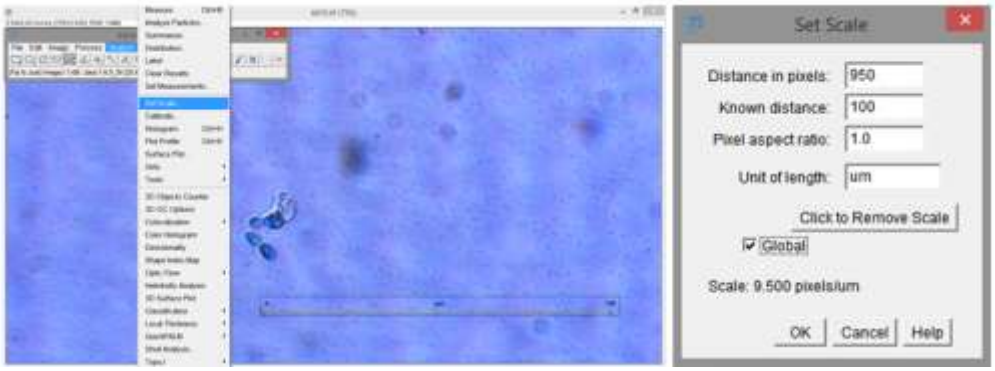


Figura 8. Captura de pantalla del programa ImageJ.

Després d'assignar l'escala, la imatge pot ser tractada. Per assolir l'objectiu de mesurar les cèl·lules, és necessari establir una sèrie de passos o accions a partir dels diferents procediments dels que disposa el programa. Per tal d'automatitzar aquests passos, l'ideal és crear una macro fent servir els comandaments que venen donats al diccionari de Macros (http://rsb.info.nih.gov/ij/developer/macro/macros.html).

b.vi. Anàlisi de les imatges

Després de tot el procés de tractament, s'obté una imatge en blanc i negre que es pot analitzar tot fent servir la funció *Analyze particles* del programa ImageJ. Les mesures que es volen prendre s'han d'especificar abans d'executar aquesta acció.

Els paràmetres morfològics a mesurar s'indiquen amb l'opció *Set measurements*, en aquest cas són els que s'indiquen a la taula 1:

Taula 1. Descripció dels paràmetres morfològics mesurats.

Paràmetre	Descripció
Area	Àrea d'una partícula determinada (recompte de píxels que la componen) donada en μm^2.
Bounding rectangle	El rectangle més petit que tanqui la partícula. Inclou els paràmetres BX i BY (coordenades del vèrtex superior esquerre del rectangle) i l'amplada i alçada d'aquest.
Shape descriptors	Calcula els descriptors de forma: circularitat, elongació, rodonesa i soliditat.
Area Fraction	Percentatge de píxels que han estat remarcats en vermell fent servir l'opció *Threshold*.
Perimeter	La longitud de la vora de la partícula.
Fit ellipse	Ajusta una el·lipse a la partícula. Dóna les mesures dels eixos major i menor (diàmetre gran i petit), l'angle entre els eixos i les coordenades del centre de l'el·lipse X i Y.
Feret's diameter	La major distància entre dos punts de la vora (Feret), l'angle d'aquesta distància (FeretAngle), la distància mínima (MinFeret) i les coordenades inicials del diàmetre de Feret (FeretX i FeretY)
Median	La mediana del valor dels píxels de la partícula.

La funció *Analyze particles* (Figura 9) obre una finestra en la qual es demana el rang de l'àrea de les cèl·lules que es volen mesurar, el rang de circularitat, si es vol dibuixar alguna figura sobre la imatge i les opcions de presentació dels resultats.

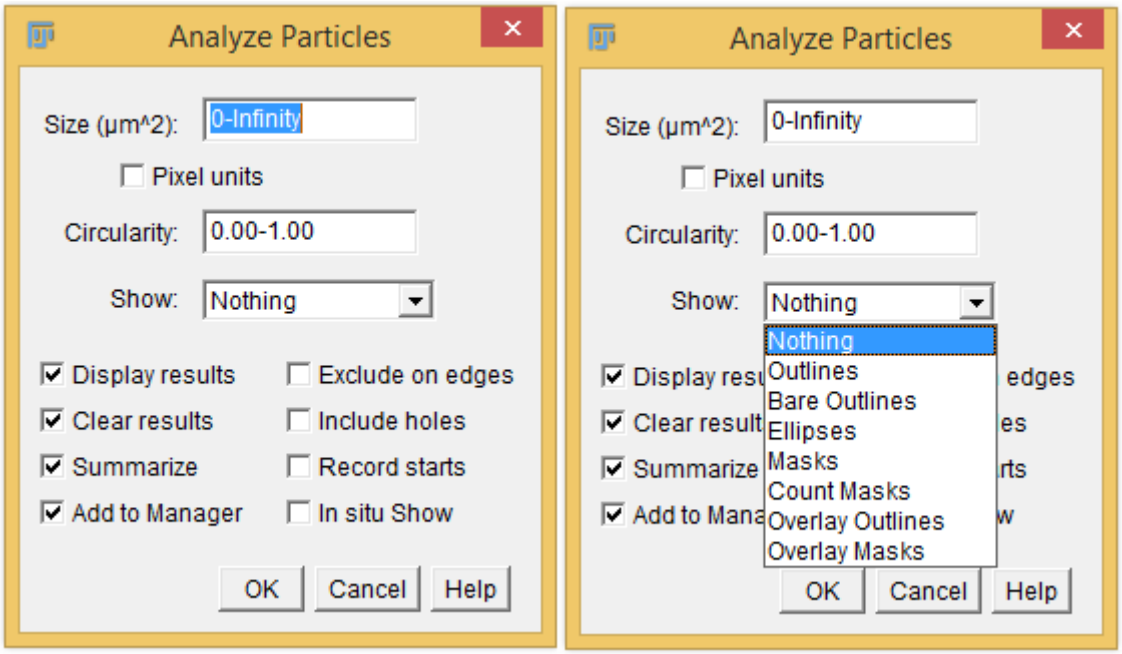


Figura 9. Captura de pantalla de la finestra emergent de la funció Analyze Particles.

b.vii. Anàlisi estadística de les dades

De totes les mesures obtingudes amb el programari es van fer servir les dades corresponents a: àrea, els paràmetres que dóna el *Bounding rectangle* (alçada i amplada), alguns dels que dóna el *Shape descriptor* (circularitat i elongació) i els corresponents a *Fit ellipse* (diàmetres major i menor). Es va fer una anàlisi exploratòria de les dades amb gràfiques (histogrames i diagrames de dispersió dels paràmetres mesurats) i taules.

Les dades es van classificar per assaig (150, 200 i 250), per rèplica (A, B i C) i per temps. Les tècniques exploratòries mostren les variacions entre els diferents grups i subgrups .

El programa utilitzat per fer l'anàlisi estadística va ser el Minitab® 17.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

a. Establiment dels paràmetres per a la captura de les imatges

Abans de capturar les imatges es van fer diverses proves en la relació RGB (Red Green Blue) per tal de trobar la més adient a l'hora d'apreciar les diferències entre les cèl·lules mortes i vives.

A la Figura 10 es veuen tres exemples de relacions RGB que es van provar, aquestes, però es van haver de descartar degut a que les cèl·lules no quedaven tan ben definides com s'esperava.

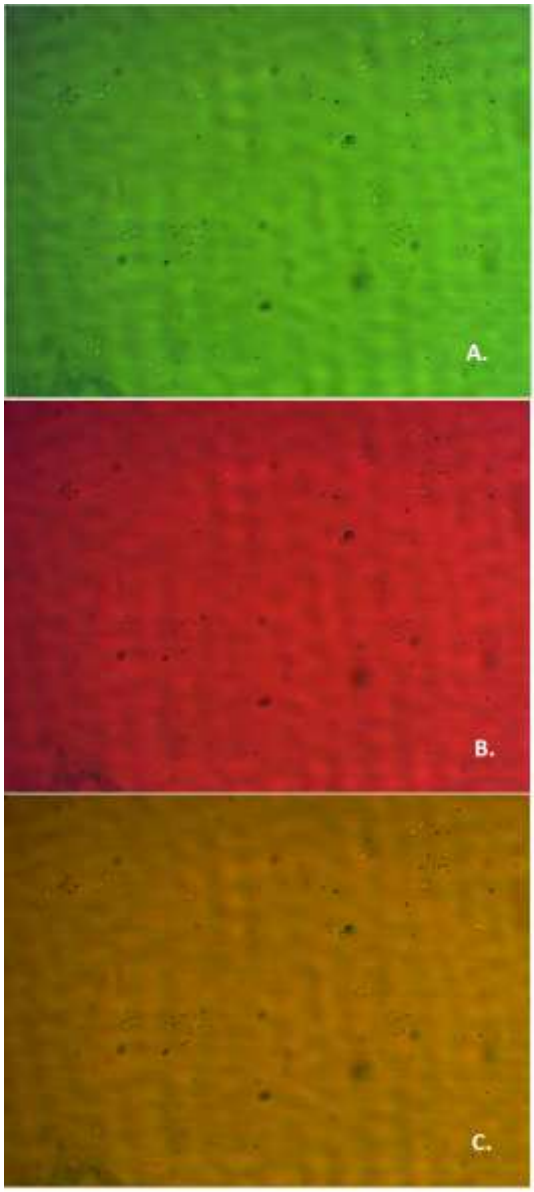


Figura 10. Diferents opcions de relació RGB. A la imatge A la relació és [1,2,3], a la B és [2.9,1,2] i a la C [3.1,2,1].

A la Figura 10 es pot apreciar que segons la relació RGB el color de la imatge varia. Altres proves de color van donar resultats massa foscos i en els quals les cèl·lules no estaven ben definides i les cèl·lules mortes (tintades de blau) no es distingien correctament.

Finalment, després de diverses proves, la relació de colors vermell, verd i blau escollida va estar la [1,1.2,3.5], que dóna com a resultat una imatge de color blau clar, tal com es mostra a la Figura 11 en la qual les cèl·lules mortes apareixen amb una coloració blava més fosca, obtenint imatges on s'hi distingeixen cèl·lules vives i mortes per poder ser analitzades per separat i estudiar possibles diferències entre elles. No obstant, el nombre de cèl·lules mortes que hem vist a les imatges és molt inferior al nombre de cèl·lules vives. El nombre de cèl·lules mortes que podríem analitzar amb aquestes mostres seria un nombre excessivament petit i no comparable amb el nombre de cèl·lules vives. Per aquest motiu decidim tractar l'anàlisi d'imatges amb totes les cèl·lules (vives i mortes) i deixar la metodologia a punt per un treball futur que pugui garantir tenir un major nombre de cèl·lules mortes.

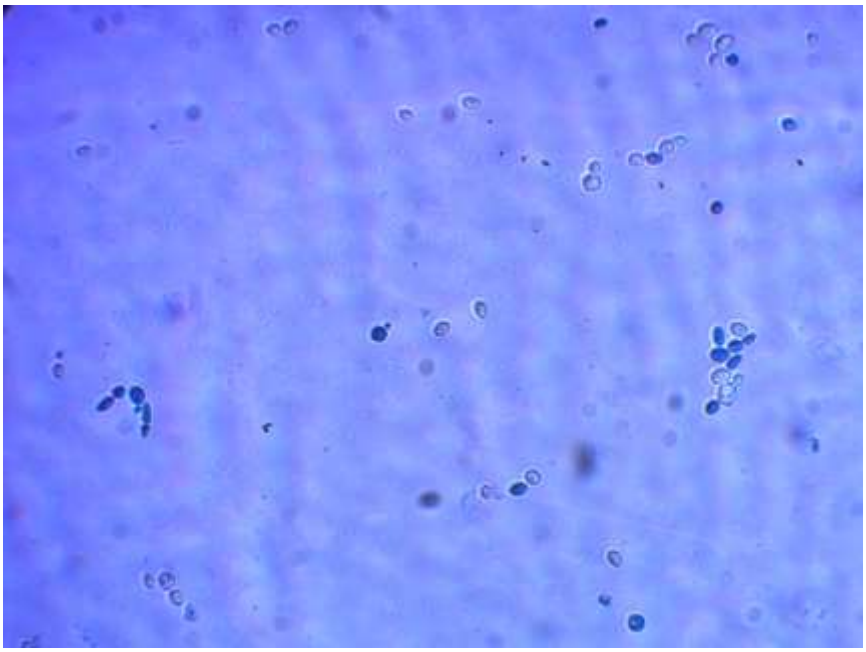


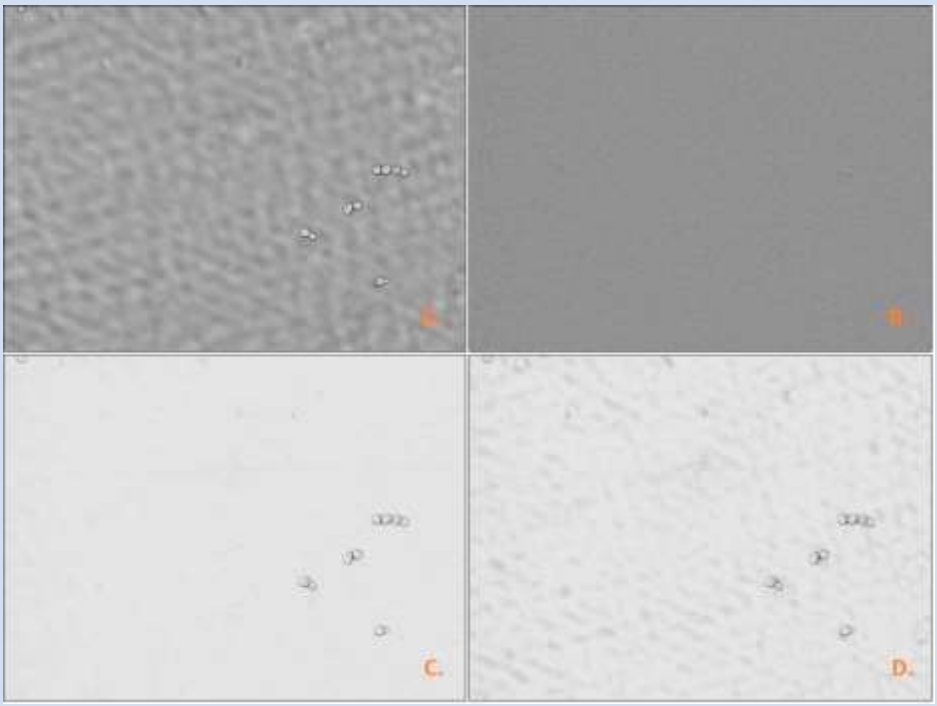
Figura 11. Exemple d'una imatge extreta amb la relació de colors RGB [1,1.2,3.5]

b. Establiment de les accions o passos a fer en el tractament de les imatges

Per tal de poder analitzar les imatges per trobar els paràmetres morfològics i de mida del llevat *S. cerevisiae*, primerament s'ha d'aconseguir una imatge en binari, és a dir, tots els seus píxels han de ser blancs o negres, representant el blanc el fons i el negre les cèl·lules. A més, aquestes cèl·lules han d'estar tancades i separades per tal que el programa pugui reconèixer cada una de les cèl·lules com una partícula diferent.

Aconseguir aquesta imatge final, però, implica la necessitat de dur a terme una sèrie de passos previs per tal de poder netejar la imatge. Es treuen les imperfeccions i la brutícia del microscopi utilitzat per la captura de la imatge, així com les partícules que embruten la mostra, o inclús ratllades del portaobjectes.

A continuació es detallen els passos que es van seguir per obtenir la imatge final per poder ser tractada.

ACCIONS	DESCRIPCIÓ
Establir l'escala	S'estableix el valor de l'escala de les imatges, obtingut prèviament. Totes les imatges estan a la mateixa escala.
Restar el "soroll"	A la imatge que es vol tractar se li resta una imatge obtinguda a partir del microscopi sense cap mostra (la brutícia de l'aparell).
Restar les imperfeccions de la pròpia imatge	Es duplica la imatge obtinguda de l'anterior pas, i es difumina per tal d'aconseguir convertir-la en un fons, on es troben imperfeccions com per exemple restes de colorant. Es fa la resta de la primera imatge i la seva duplicada modificada. Després de fer diverses proves, tal com ens mostra la Figura 12.  **Figura 12. Diverses proves d'extracció de fons on A és el resultat de la resta entre la imatge original i la brutícia del microscopi, B és el resultat de la resta entre la primera imatge i un fons creat a partir de la mateixa amb el paràmetre *Rolling Ball Radius* amb valor 0, C amb valor 20 i D amb 50.** Després d'aquestes proves amb diverses imatges es va decidir que el valor del paràmetre *Rolling Ball Radius* més adient és de 20, ja que dóna com a resultat una imatge més neta possible, sense interferir de manera notable en la definició de les cèl·lules.
Passar la imatge a 8-bit	Canviar el format de la imatge final abans de continuar el procés.

Passar a binari

Abans de passar a binari s'ha de corregir el llindar de l'escala de grisos de la imatge (*Threshold*). El resultat és una imatge que només té dos colors: blanc i negre, on el blanc és el fons, i el negre les partícules. Després de fer diverses proves amb els diferents mètodes de correcció del *Threshold* tal com es veu a la Figura 13, es va escollir el mètode *Triangle*, ja que és el que millor defineix les cèl·lules, les deixa més tancades i no defineix tan bé les restes de brutícia que queden.

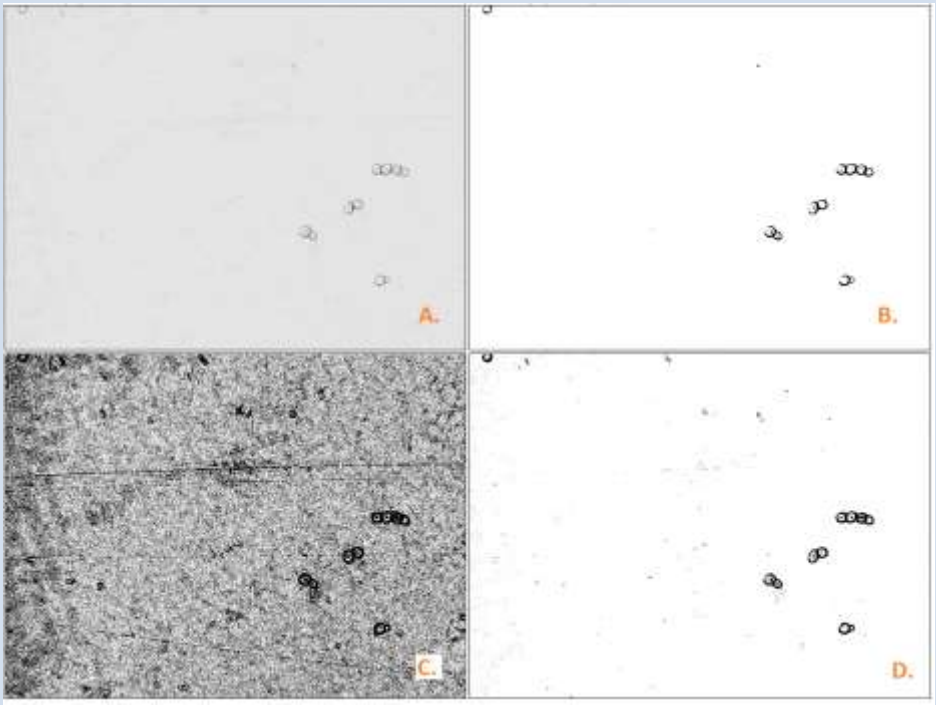


Figura 13. Proves de diferents mètodes d'ajust de *Threshold* on A és la imatge resultant del pas anterior, B és l'ajust automàtic del *Threshold* per defecte on diverses cèl·lules queden obertes, C amb el mètode de "*Otsu*" on es veuen moltes taques i D amb el mètode *Triangle* amb el resultat de totes les cèl·lules tancades.

Tancar

Fa una dilatació afegint un píxel negre a cada costat (dreta, esquerra, amunt i avall) d'un que ja ho és i després executa una erosió eliminant els píxels negres que no tinguin dos o més píxels negres veïns. D'aquesta manera s'aconsegueix tancar les cèl·lules que queden obertes tal com es mostra a la Figura 14.

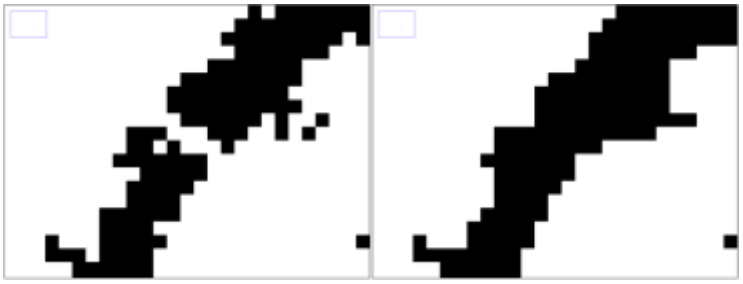


Figura 14. Imatge d'una cèl·lula oberta i resultat després d'executar el comandament *Close*.

Omplir forats

Omple les partícules tancades de color negre tal com ens mostra la Figura 15. Per poder analitzar les partícules, aquestes han de ser completament negres, la que els paràmetres que es mesuren són respecte la quantitat de píxels que formen una partícula determinada.

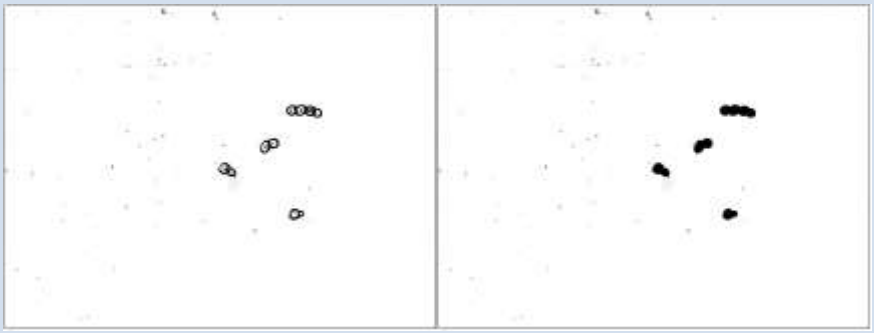


Figura 15. Imatge en binari de les cèl·lules i el resultat d'aplicar el comandament *Fill Holes* per omplir les partícules.

Separar partícules

Abans de poder analitzar les partícules s'ha de tenir en compte que aquestes han d'estar separades, si no les que queden enganxades comptarien com una cèl·lula molt grossa. Per fer-ho s'aplica la funció "*Watershed*", que separa automàticament partícules que es troben en contacte com mostra la Figura 16. Primerament calcula el mapa de distància Euclidiana (EDM) i troba els últims punts erosionats (UEPs) i separa les partícules en aquest punt (http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide-USbooklet.pdf).

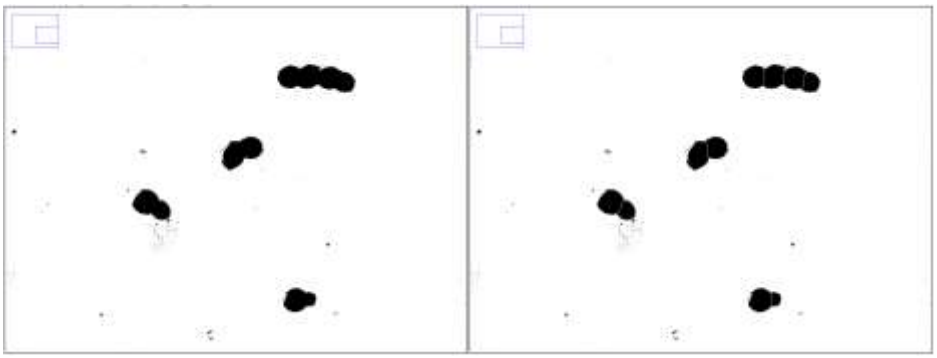


Figura 16. Imatge amb totes les partícules omplertes i resultat d'aplicar la funció *Watershed*, obtenint com a resultat la segmentació de la primera imatge, és a dir, les cèl·lules separades.

Analitzar partícules

Finalment es poden analitzar les cèl·lules que es troben a la imatge seleccionada. Primerament s'han d'indicar els paràmetres que es volen mesurar i calcular de manera automàtica pel programa ImageJ, això es pot indicar tot afegint un comandament a l'inici o al final de la macro per assegurar-se de que en una altra sessió no es mesurin altres paràmetres, ja que cada cop que s'obre el programa es tornen a posar les mesures que es fan per defecte.

Després d'executar el comandament "*Analyze particles*" el programa ImageJ ens mostra els resultats en format de taula que es pot passar directament al

programa Microsoft Excel® i a més, per a poder saber exactament a quina partícula correspon exactament cada mesura, les vores de cada una d'elles es posa de color groc i al mig de cada una apareix el número al que correspon (Figura 17).

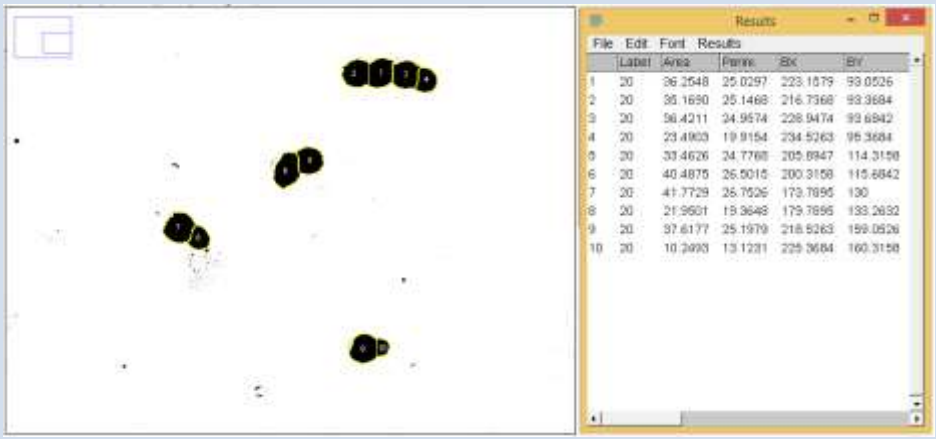


Figura 17. Partícules analitzades i taula de resultats.

Tots aquests passos o accions que ha de seguir el programa, han estat implementades en una macro inserida en el propi programa ImageJ per tal de facilitar la tasca de l'anàlisi del conjunt de imatges generades.

Es van dur a terme diverses proves de macros diferents, la primera i la segona no donaven els resultats esperats (Figura 18). La primera no automatitzava el procés ja que els paràmetres no estaven definits a la macro, així l'usuari havia d'introduir els paràmetres a cada imatge. La segona és la mateixa que la primera però després de fer diverses proves amb els paràmetres fins poder definir uns valors de manera que totes les imatges fossin tractades amb el mateix mètode exactament.

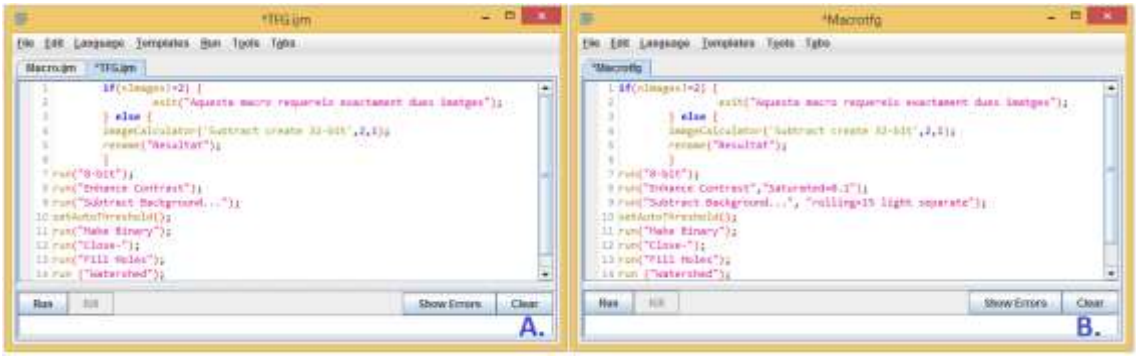


Figura 18. Primeres macros inserides en el programa ImageJ.

Els passos seguits per aquestes macros, però, no són els mateixos que els indicats anteriorment, hi ha tres diferències principals; la primera és que no s'extreu el fons propi de la imatge de la mateixa manera, la segona és que abans de fer el tractament es millora el contrast de les imatges fent que les vores destaquin més i la tercera és que la millora del llindar de

grisos (*Threshold*) es fa de manera automàtica en el mètode per defecte. Aquest procediment només funciona correctament per a imatges netes i clares, i tot i així molts cops l'anàlisi no es fa correctament tal com es mostra la Figura 19.

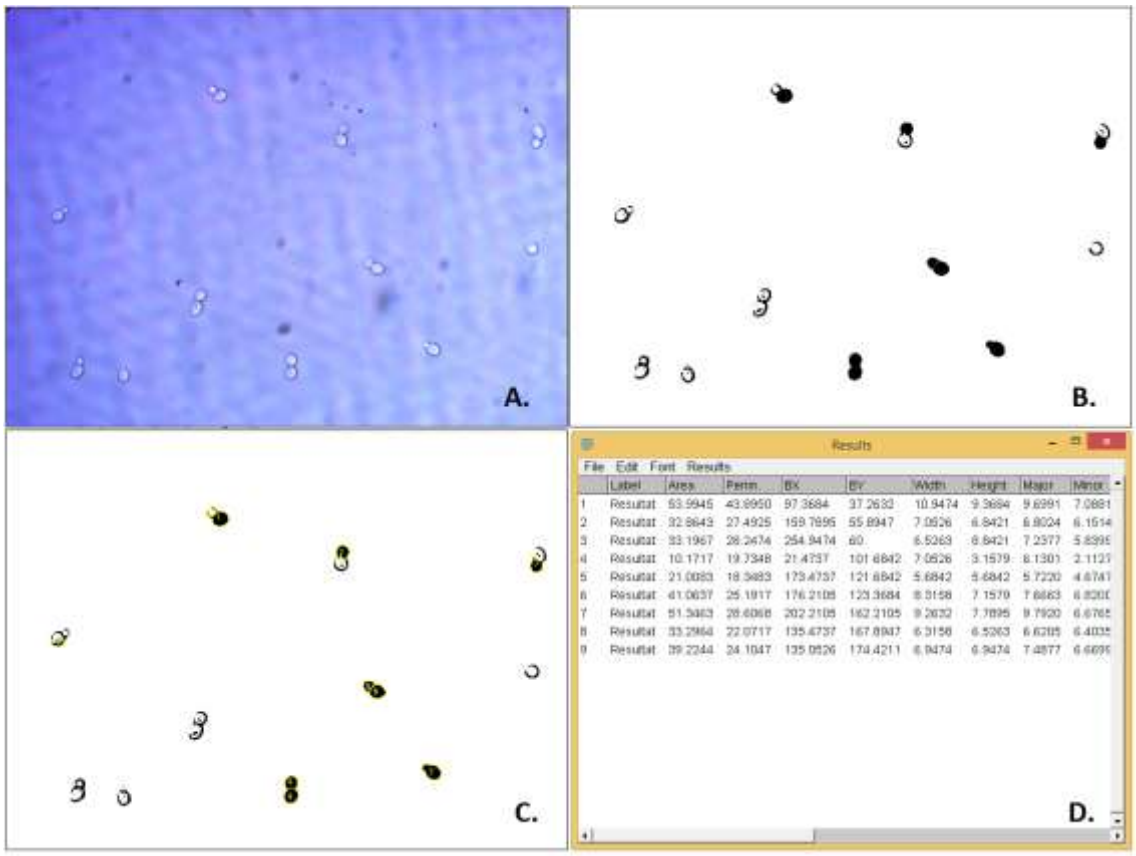


Figura 19. Resultat d'aplicar la segona macro on A és la imatge original, B el resultat, C les partícules analitzades i D les mesures d'aquestes partícules. S'aprecia que la majoria de les cèl·lules no són detectades.

La tercera macro (Figura 20) és la que conté els passos detallats prèviament.

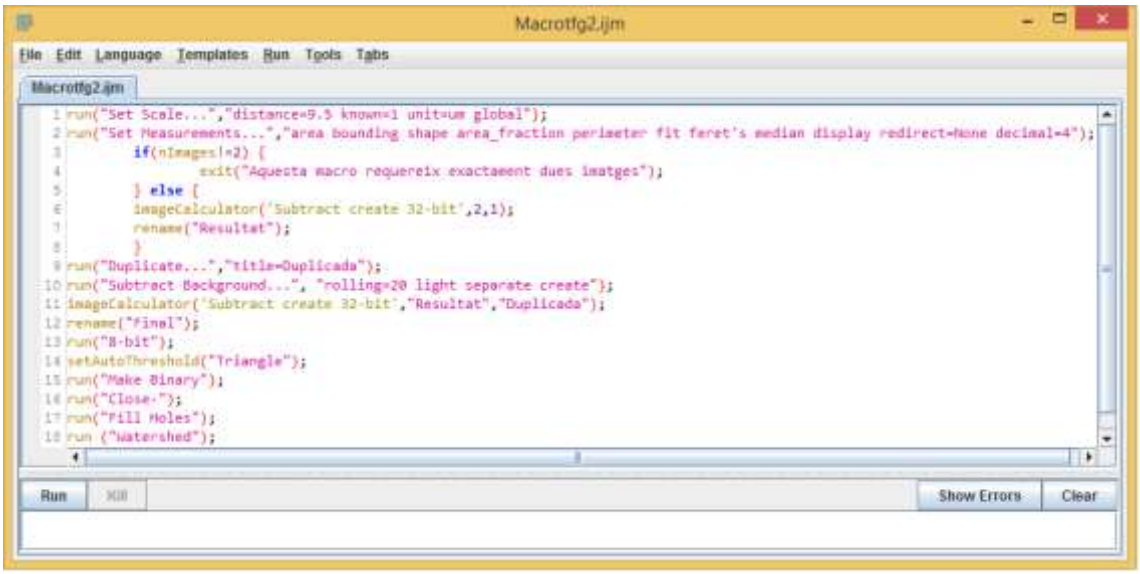


Figura 20. Captura de pantalla de la macro del programa ImageJ. A la primera línia s'estableix l'escala de totes les imatges de la sessió i a la segona els paràmetres que es volen mesurar en el moment d'analitzar les imatges. Després el programa comprova que hi hagi només dues imatges obertes (la imatge a tractar i la brutícia del microscopi), en el cas que hi hagi un altre nombre d'imatges obertes, s'obriria una finestra amb el missatge: "Aquesta macro requereix exactament dues imatges" i el procediment pararia. En cas contrari s'inicia tot el procediment explicat prèviament de manera detallada.

Amb aquesta sèrie de passos s'aconsegueix:

1. Automatitzar tot el procediment: l'usuari ja no ha de posar l'escala ni les mesures que es volen cada vegada que obre el programa, tampoc cal inserir cap valor ni variar els paràmetres.
2. Obtenir imatges més netes amb les cèl·lules millor definides. A les imatges amb més brutícia es veuen menys punts, tot i que no s'esborren tots.

A la Figura 21 es veu un resum de l'anàlisi d'una imatge determinada, ensenyant el resultat de diversos passos seguits per la macro.

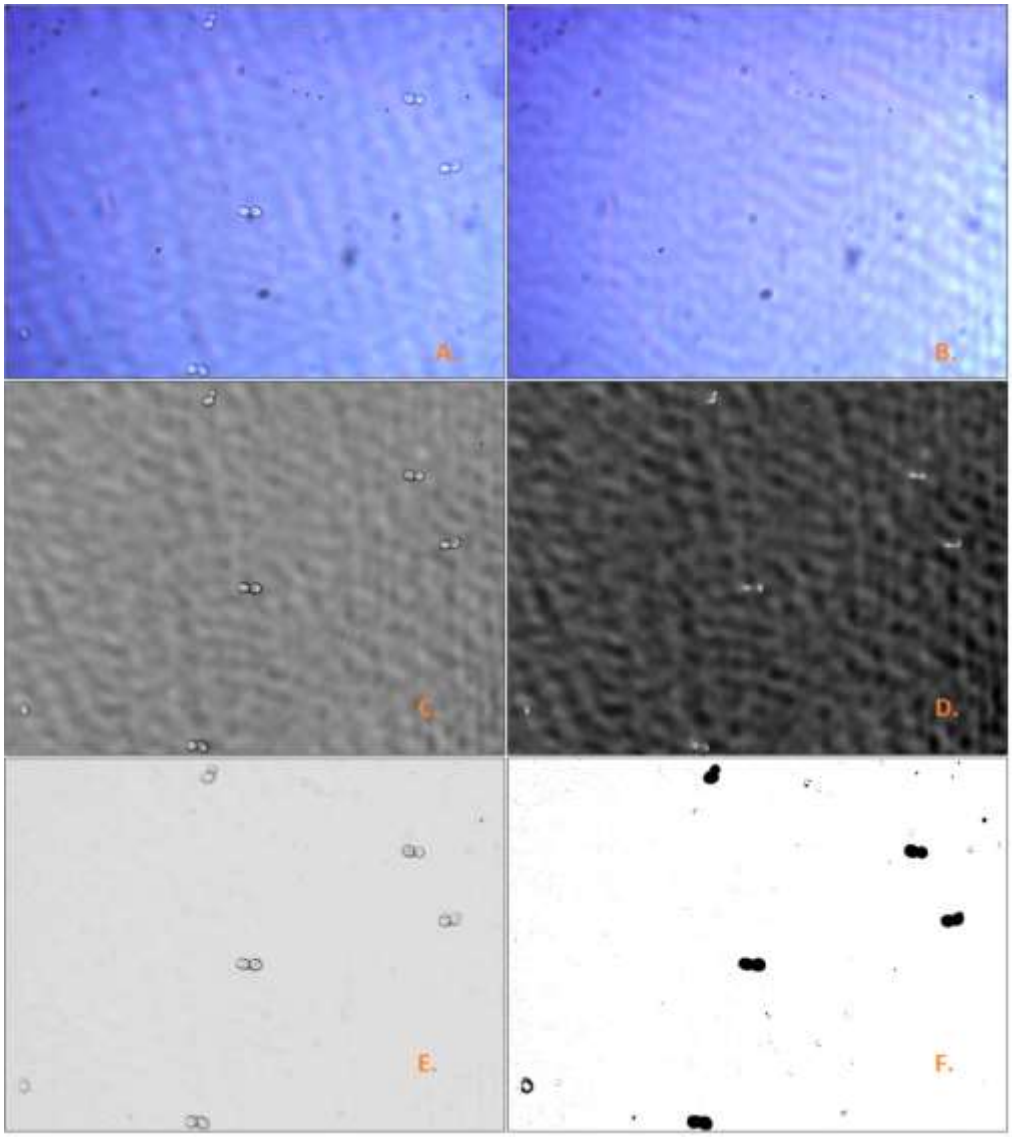


Figura 21. Imatges dels passos seguits pel programa ImageJ. La imatge A és l'original, la B és una imatge presa sense cap mostra per tenir les taques pròpies del microscopi, la C és el resultat de la resta de la A i la B. Aquesta imatge es modifica per obtenir la D, que és la primera difuminada, l'E és la resta de la C i la D. A aquesta imatge passa a binari i finalment s'obté la imatge F, que es pot analitzar i obtenir finalment una taula amb les dades morfològiques i de mida de cada cèl·lula.

Per tal de poder fer una comparació entre la macro seleccionada finalment, es torna a analitzar la imatge de la figura 18 però seguint els passos anteriorment esmentats (Figura 22).

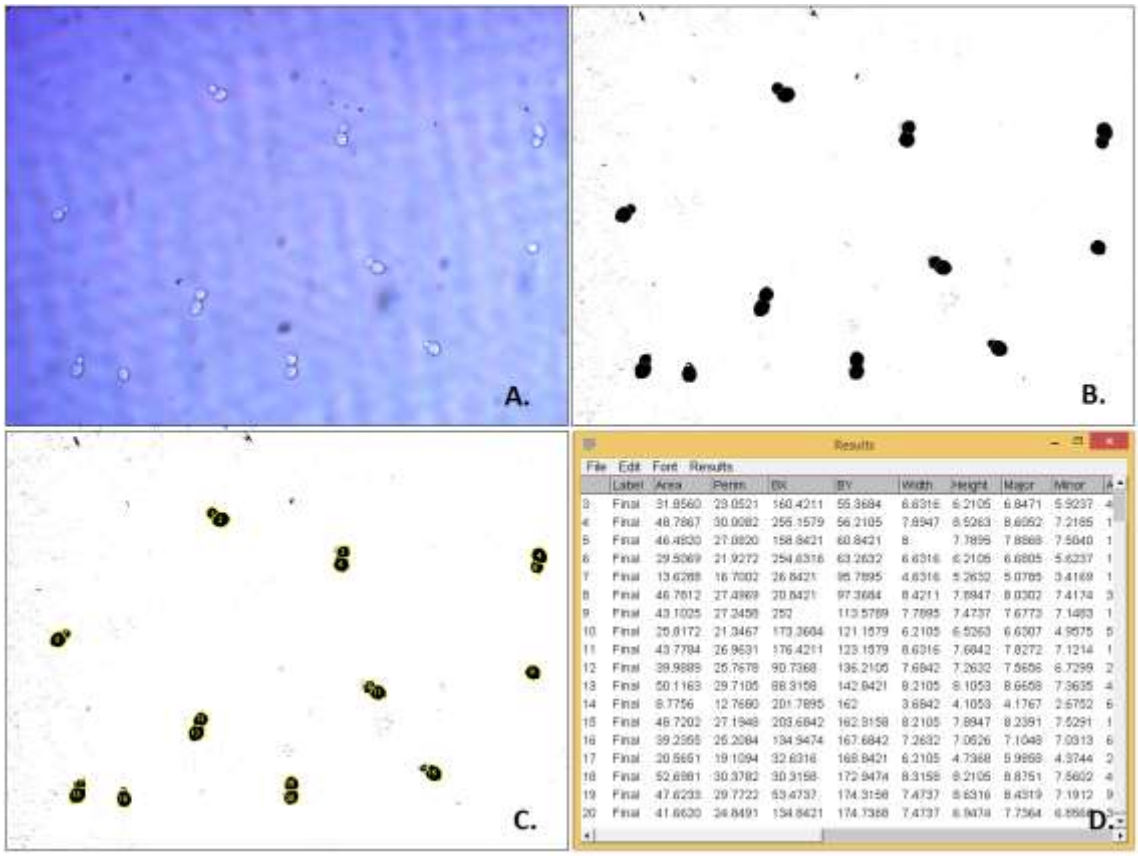


Figura 22. Resultat d'aplicar la segona macro on A és la imatge original, B el resultat, C les partícules analitzades i D les mesures d'aquestes partícules. Totes les cèl·lules són mesurades.

Amb la nova macro totes les cèl·lules són reconegudes i analitzades, s'aprecia molta diferència ja que amb l'anterior s'obtenien les mesures de 9 cèl·lules enlloc de les 20 que hi ha.

S'ha de tenir en compte, però que després de processar cada imatge, s'ha de comprovar que les cèl·lules mesurades es corresponguin amb el que hi ha a la imatge, l'usuari ha de tenir especial cura amb:

1. Que totes les partícules analitzades siguin cèl·lules ja que el programa ImageJ no distingeix cèl·lules d'altres partícules, com per exemple taques de tint, partícules suspeses o bombolles d'aire entre el porta i cobreobjectes. Per tant si una imatge té brutícia abans d'analitzar-la, l'usuari pot afinar el valor mínim d'àrea que es vol analitzar, així el programa només analitza partícules a partir d'una mida determinada, deixant de banda les taques petites. També es pot esborrar manualment les taques que tinguin una mesura suficient com per ser considerades cèl·lules, tal com es mostra a la Figura 23.

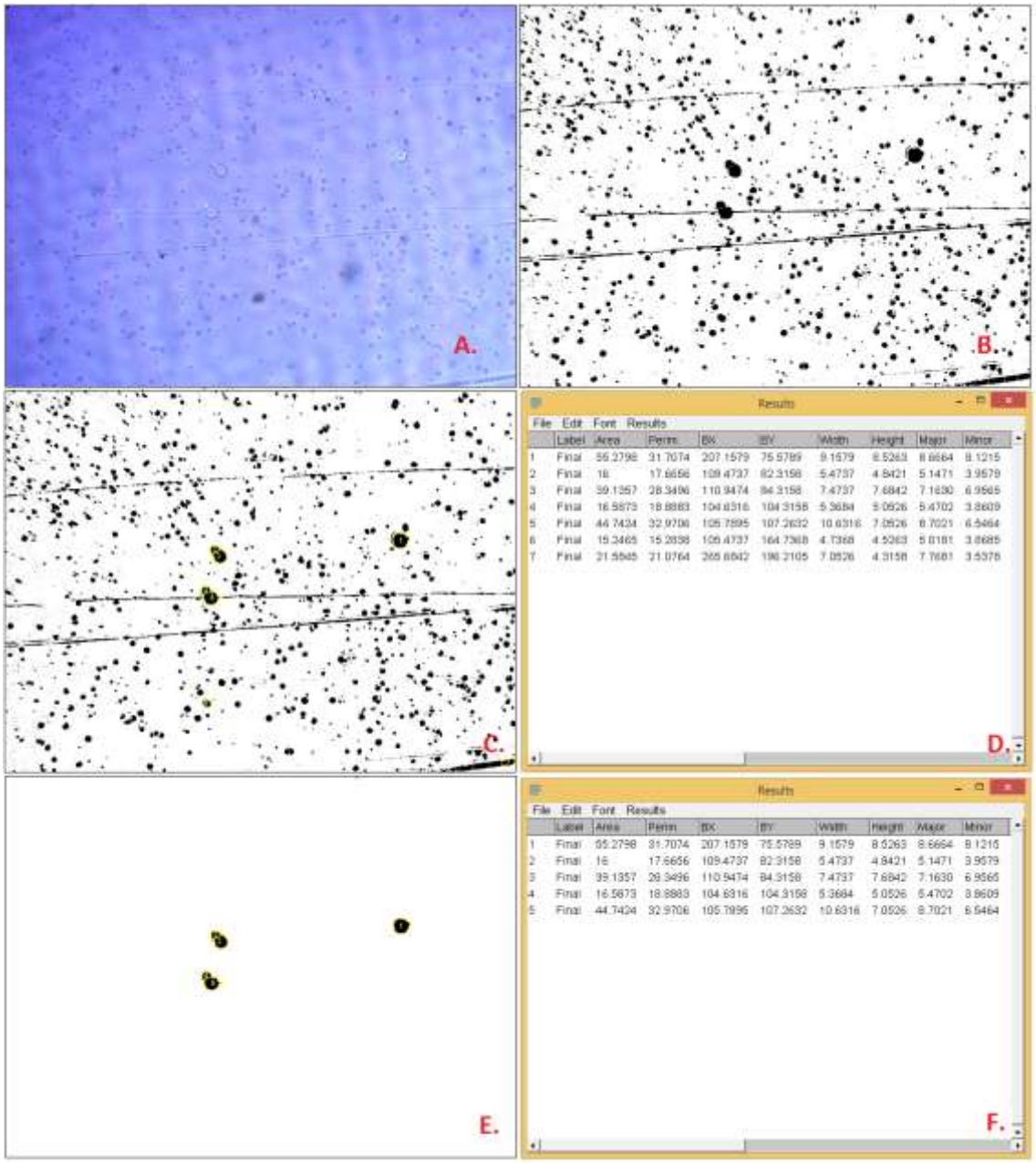


Figura 23. Dues possibles maneres d'analitzar imatges amb brutícia de fons. La imatge A és la imatge original i B és el resultat després del tractament. Per analitzar la imatge C, s'ha posat com a àrea mínima un valor de 15 µm^2 tot i que també s'han mesurat dues partícules que no són cèl·lules. A la imatge E només es veuen les cèl·lules, ja que tota la brutícia ha sigut extreta de manera manual. Es pot comprovar que les mesures són les mateixes (D i F).

2. Que les cèl·lules mesurades siguin correctes. Segons com es disposen les cèl·lules quan estan agrupades la funció de separació de les cèl·lules (*Watershed*) no s'executa correctament, separant les cèl·lules de manera errònia. En aquest cas l'usuari ha d'esborrar aquestes partícules i repetir el procediment d'anàlisi de les imatges.
3. Que quedin cèl·lules obertes. Alguns cops no es tanquen correctament les partícules i llavors queden obertes i no són mesurades. Sovint, tot i que no es tanquin, el programa reconeix el seu gruix, i s'obté una mesura errònia. En aquest cas es pot resoldre de dues maneres:

a. Si la cèl·lula queda separada per pocs píxels es poden repetir els passos per tancar, omplir els forats i separar les cèl·lules (en cas que estigui tocant una altra cèl·lula).
b. Si l'obertura de la cèl·lula és gran aquesta s'ha d'esborrar directament.

Aquest estudi es fa per totes les cèl·lules, tant vives com mortes. Es deixa per un futur treball l'anàlisi de les imatges distingint les cèl·lules vives de les mortes.

c. Anàlisi estadística de les dades

Amb el processament de totes les imatges s'han obtingut dades de cada assaig, per hores i rèpliques, tenint al final un total de més de 11.000 cèl·lules (Taula 2)

Taula 2. Recompte del nombre de cèl·lules per cada rèplica (A, B i C) i per cada concentració inicial de glucosa en g/L (150, 200 i 250) i totals.

	A	B	C	Total
150	1030	1154	1224	3408
200	1522	1199	1249	3970
250	1301	1454	1372	4127
Total	3853	3807	3845	11505

Aquestes dades també es poden classificar segons el temps. Però un cop classificades ens trobem amb què per alguns grups de temps no es disposa de dades per tots tres assajos degut a que no es van fer els controls o recollides de mostres a les mateixes hores exactament. Per tal de tenir informació de tots tres assajos i poder-los comparar, es va realitzar una agrupació de dades que es configuraran amb nous grups de temps. La nova relació de grups es mostra a la Taula 3.

Taula 3. Recompte del nombre de cèl·lules per cada assaig i rèplica per a cada nou grup de temps.

	150			200			250		
Nou temps (h)	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**C**
0	92	86	146	130	104	46	68	59	143
2,75	28	25	28	9	0	0	41	33	45
5,75	16	18	27	18	21	24	33	23	26
7,75	39	41	24	32	29	20	36	25	38
9,75	48	34	30	54	30	31	48	29	48
12	47	57	35	37	51	45	46	30	34
14	32	37	56	62	49	51	46	37	38
16	36	58	89	38	70	45	52	58	38
18	53	70	56	74	52	52	48	57	36
20	39	54	35	76	70	64	90	70	40
22	63	84	45	92	104	79	60	61	37
23,75	50	37	65	62	46	46	84	108	123
25,75	34	76	72	69	38	44	57	96	105

27,75	57	62	48	74	44	38	55	169	77
29,75	37	69	30	38	86	37	91	99	56
31,75	49	61	60	103	0	71	58	64	80
33,75	62	44	52	91	0	70	61	104	95
35,75	64	36	72	124	55	87	79	127	100
38	66	75	132	137	170	208	76	90	47
40,25	37	43	36	87	57	116	104	73	96
43,5	81	87	86	115	123	75	68	42	70

Aquest agrupament de dades es va fer unint els temps més propers, és a dir, amb no més de 30 minuts de diferència entre cada presa de mostra, exceptuant el segon grup (temps = 2,75h) en el qual s'inclouen les 4 primeres hores d'experiment degut a la mancança de dades per aquestes recollides de mostres.

Es va decidir no tenir en compte el temps 0 ja que són dades del precultiu, i per tant, no expressa amb exactitud la situació en què es trobava el microorganisme al cultiu on s'havia inoculat, és a dir, a les imatges del temps 0 del precultiu s'observa un organisme en estat estacionari adaptat al seu medi, en canvi, hauria de representar cèl·lules en fase de latència adaptant-se al medi nou.

També es van fer anàlisis amb estadístiques descriptives (mitjanes i desviació estàndard) de cada una de les rèpliques i no es van apreciar variacions importants entre els valors obtinguts. La representació gràfica de les dades per cada una de les rèpliques no mostraven grans variacions de forma. En aquest estudi preliminar de les dades es va decidir utilitzar conjuntament les dades de les tres rèpliques, formant, per tant, un únic grup per a cada concentració inicial de sucre.

De les cèl·lules primerament s'analitza l'àrea del llevat de la imatge, per tal de veure com varia la distribució d'aquesta variable individual en la població amb el temps (evolució del cultiu) en forma d'histogrames. Després, aquests histogrames corresponents a cadascun dels tres assaigs, per a les tres concentracions inicials de glucosa (150, 200 i 250 g/L), es comparen per identificar si hi ha efecte de la concentració inicial de glucosa sobre la variació de la distribució de l'àrea de les cèl·lules de la població que està creixent al llarg del temps.

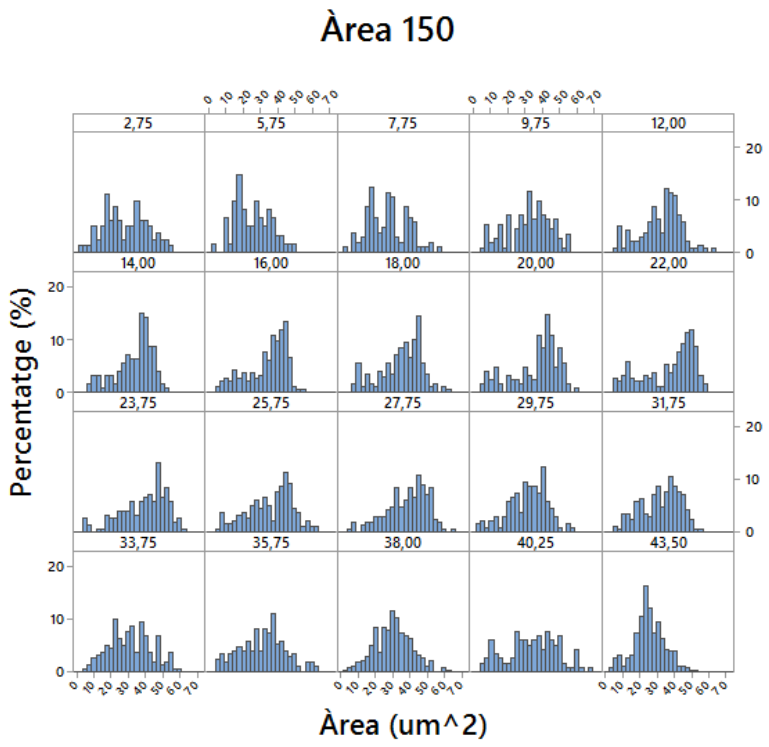


Figura 24. Histogrames de l'àrea separats per la variable temps per a la concentració inicial de 150 g/L de glucosa.

A l'assaig de 150 g/L de glucosa, durant les primeres hores (de 2,75 a 7,75) les disposicions són similars, les cèl·lules es veuen agrupades amb poca varietat i concentrades majoritàriament en àrees baixes; a partir de l'hora 9,75 es comença a apreciar un canvi en aquesta distribució, les cèl·lules comencen a ser majors; lentament es van formant dos grups diferenciats de cèl·lules, un grup en el qual l'àrea és gran (cèl·lules grans començant a gemmar) i cèl·lules petites (gemmes i cèl·lules filles). Aquests dos grups es comencen a diferenciar a partir de l'hora 12, i a l'hora 16 es veu clarament aquesta distribució.

A partir de l'hora 23,75 aquesta disposició no es veu de manera tan clara però els grups ja no es diferencien tant. A partir d'aquest temps s'observa que el major percentatge de cèl·lules ja no es troba en una àrea tan elevada, sinó que es desplaça cap a valors més baixos. A l'hora 31,75 ja s'aprecia clarament la reducció en percentatge de les cèl·lules amb àrees grans i a l'hora 33,75 s'observa un histograma on la variabilitat torna a ser més baixa.

En aquest assaig la fase de latència finalitza al voltant de les 4,7h, que és quan s'inicia la fase exponencial, que dura 12,7h, acabant a l'hora 17,3, quan s'inicia la fase estacionària (dades obtingudes d'un projecte paral·lel que està en procés). Les dues poblacions que s'observen als histogrames ens fan intuir que el cultiu es troba en la fase exponencial. S'observa que per les primeres hores i per la fase exponencial la distribució de les àrees permet d'aproximar la situació del cultiu, és a dir, la fase en la que es troba. Per hores més avançades, però aquesta aproximació no és tan precisa, ja que no s'observa un canvi en les dues poblacions fins a hores en les que el cultiu ja es troba en la fase estacionària.

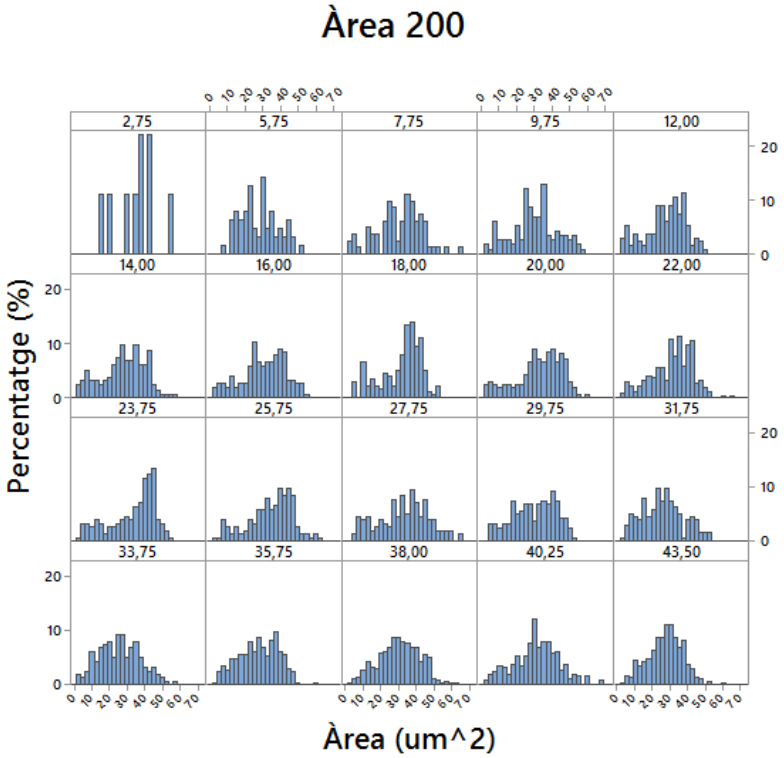


Figura 25. Histogrames de l'àrea separats per la variable temps per a la concentració inicial de 200 g/L de glucosa.

A l'hora 2,75 de l'assaig de 200 g/L de glucosa només hi ha dades de la rèplica A, ja que era el primer assaig que es va fer i no es va tenir en compte la baixa densitat de microorganismes que hi havia al cultiu, a les mostres de les rèpliques B i C no es van trobar cèl·lules. A partir d'aquest moment, en les hores de baixa densitat de població es va centrifugar la mostra abans de captar imatges.

En l'assaig de 200 g/L de glucosa, els canvis en l'histograma es comencen a veure abans, percebent el desplaçament de la distribució de les cèl·lules cap a mesures més elevades a l'hora 7,75. A l'hora 9,75 es comencen a distingir els dos grups diferenciats, i a partir de la 12 ja es veuen clarament els dos grups de cèl·lules. A partir de l'hora 25,75 aquests dos grups ja no es veuen tan diferenciats. A partir de l'hora 31,75 es torna a observar un histograma on la variabilitat és més baixa.

En aquest assaig la fase de latència finalitza al voltant de les 5,5h, que és quan s'inicia la fase exponencial, que dura 12,3h, acabant a l'hora 17,8, quan s'inicia la fase estacionària (Dades obtingudes d'un projecte paral·lel que està en procés).

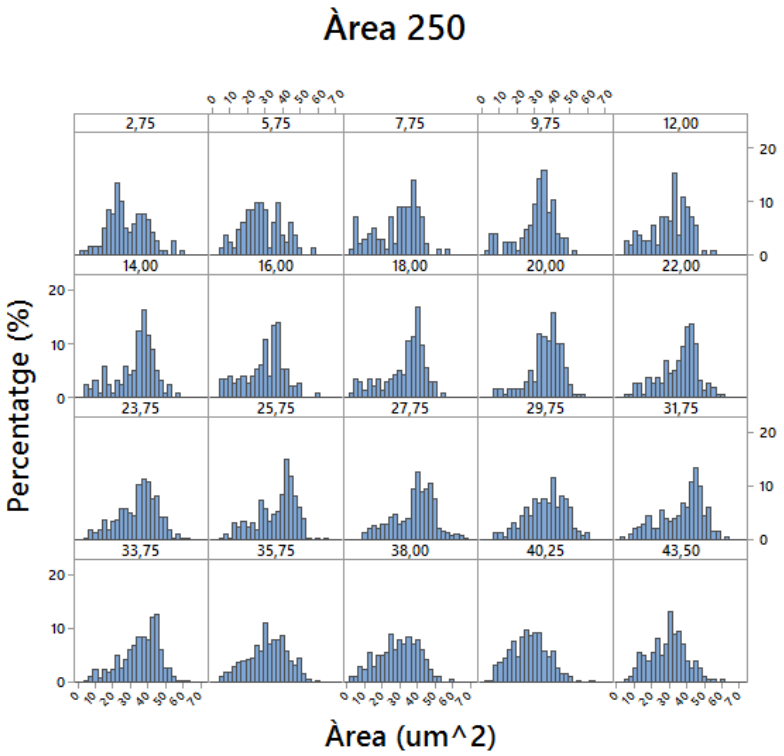


Figura 26. Histogrames de l'àrea separats per la variable temps per a la concentració inicial de 250 g/L de glucosa.

Per l'assaig de 250 g/L de glucosa, els primers canvis es comencen a percebre a l'hora 7,75, de manera molt similar a les dades de l'assaig de 200 g/L de glucosa. No és fins l'hora 29,75 que s'observa la disminució de diferències entre els dos grups i a la 35,75 s'aprecia que la variabilitat és més baixa.

En aquest assaig la fase de latència finalitza al voltant de les 4,8h, que és quan s'inicia la fase exponencial, que dura 17h, acabant a l'hora 21.8, quan s'inicia la fase estacionària (Dades obtingudes d'un projecte paral·lel que està en procés). Això demostra que a més concentració de glucosa inicial al medi, més dificultats té l'organisme per adaptar-se i la seva fase de latència és més llarga. Pel que fa als histogrames, la distribució de les àrees permet intuir l'inici de la fase exponencial, i també mostra dues poblacions clares durant aquesta, però no permet intuir l'inici de la fase estacionària.

Per tal d'ajudar a entendre la variabilitat i el tractament es van fer uns informes d'estadístics descriptius de les hores més representatives de cada fase de l'assaig de 150, tenint en compte que el canvi més important és en la relació de temps, però les distribucions són similars.

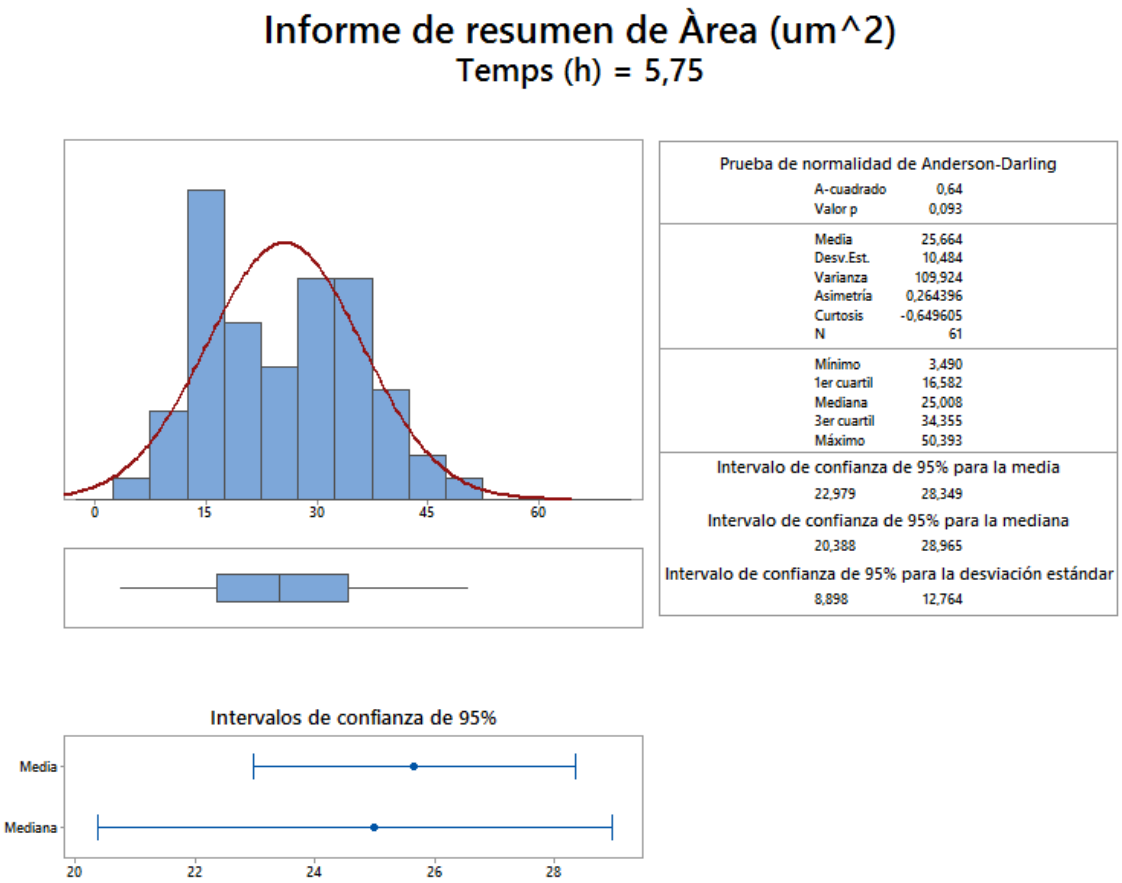


Figura 27. Informe de resum de l'histograma de l'àrea per a les mostres de 150 g/L de glucosa al temps 5,75 h.

A les primeres hores la distribució de les àrees està molt agrupada, amb poca variabilitat, de tal manera que la mitjana i la mediana tenen valors molt pròxims.

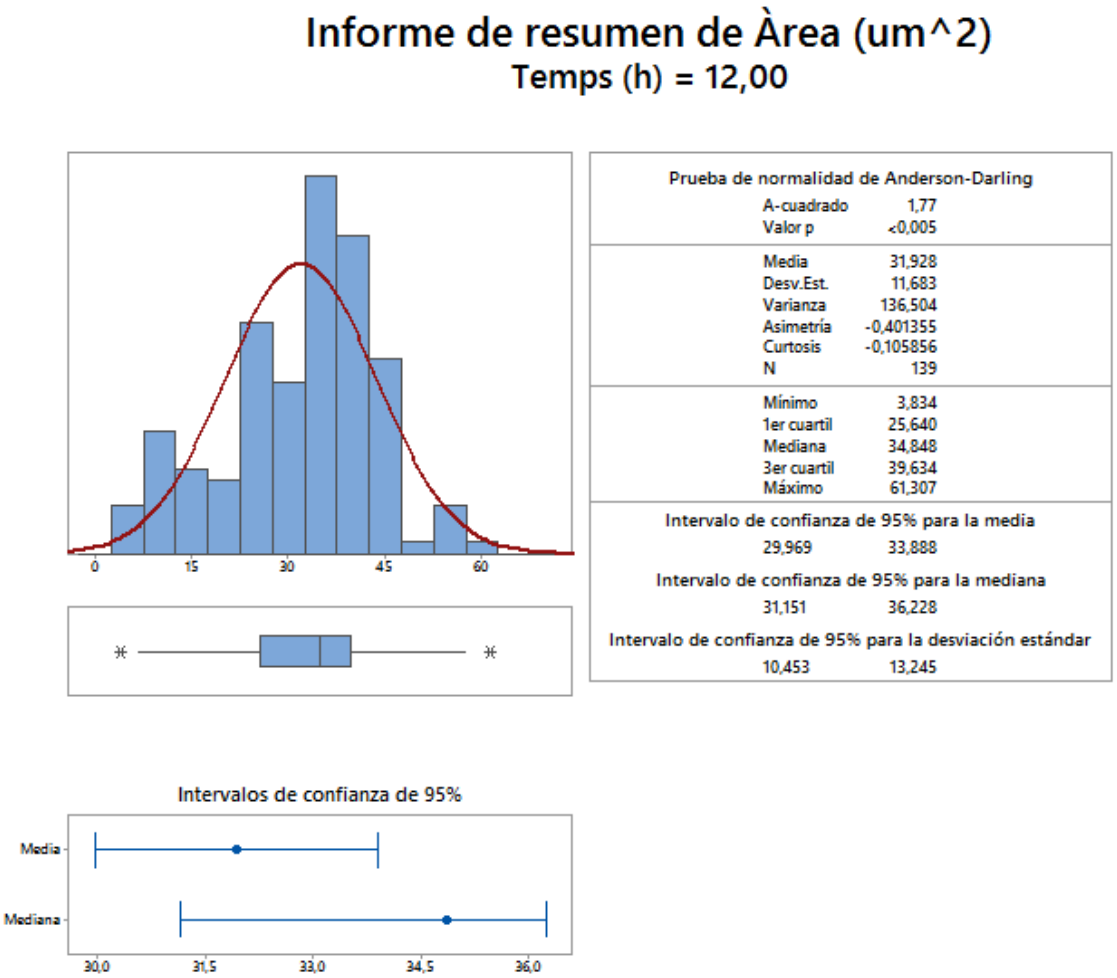


Figura 28. Informe de resum de l'histograma de l'àrea per a les mostres de 150 g/L de glucosa al temps 12 h.

A partir de l'hora 12 aquesta distribució comença a mostrar diferències, s'aprecia que hi ha més variabilitat, a l'histograma veiem que apareixen uns pics a la zona d'àrea més baixa, tot i que on es concentra la majoria de cèl·lules és cap a les àrees més altes. El que pot donar a entendre que les cèl·lules han anat creixent i ja comencen la gemmació, es comença a apreciar l'increment de cèl·lules filla i gemmes, tenint l'inici d'una distribució on es distingeixen dues poblacions.

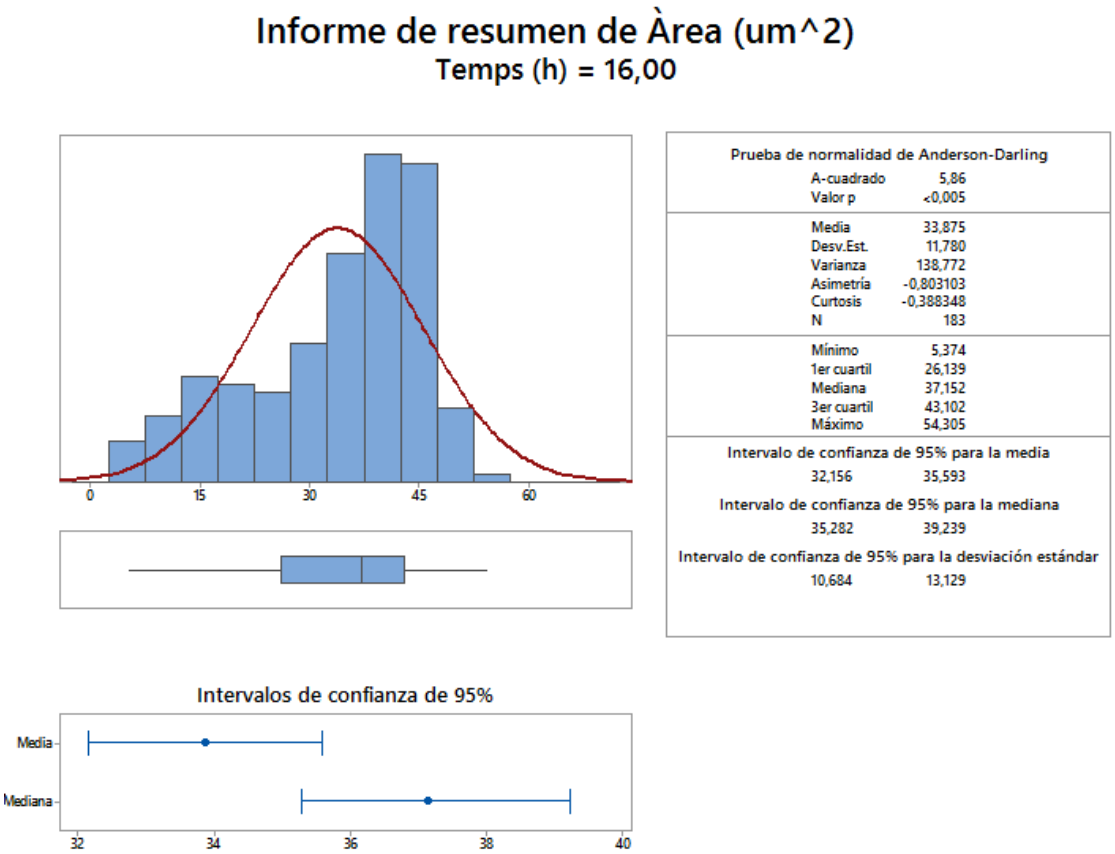


Figura 29. Informe de resum de l'histograma de l'àrea per a les mostres de 150 g/L de glucosa al temps 16 h.

A l'hora 16 aquestes dues poblacions es veuen de manera molt clara, la mitjana i la mediana són molt diferents, el 50% de les cèl·lules està desplaçat cap a les àrees més grans tot i que la mitjana té un valor d'àrea petit. Trobem un grup petit de cèl·lules petites (gemmes i cèl·lules filles) i un grup més gran de cèl·lules grans (inici de gemmació i cèl·lules grosses).

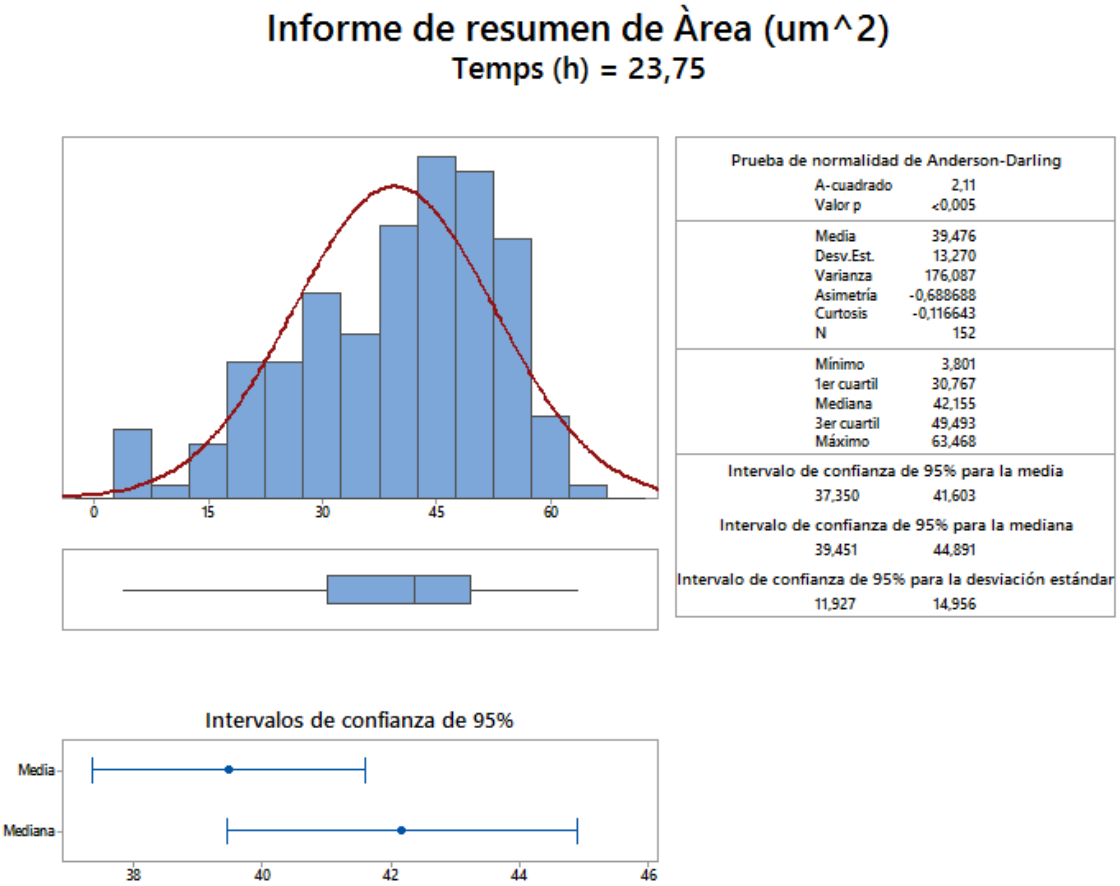


Figura 30. Informe de resum de l'histograma de l'àrea per a les mostres de 150 g/L de glucosa al temps 23,75 h.

A l'hora 23,75 la distribució torna a canviar, de manera que aquests dos grups ja no es distingeixen de manera tan clara, la mitjana i la mediana tornen a apropar-se.

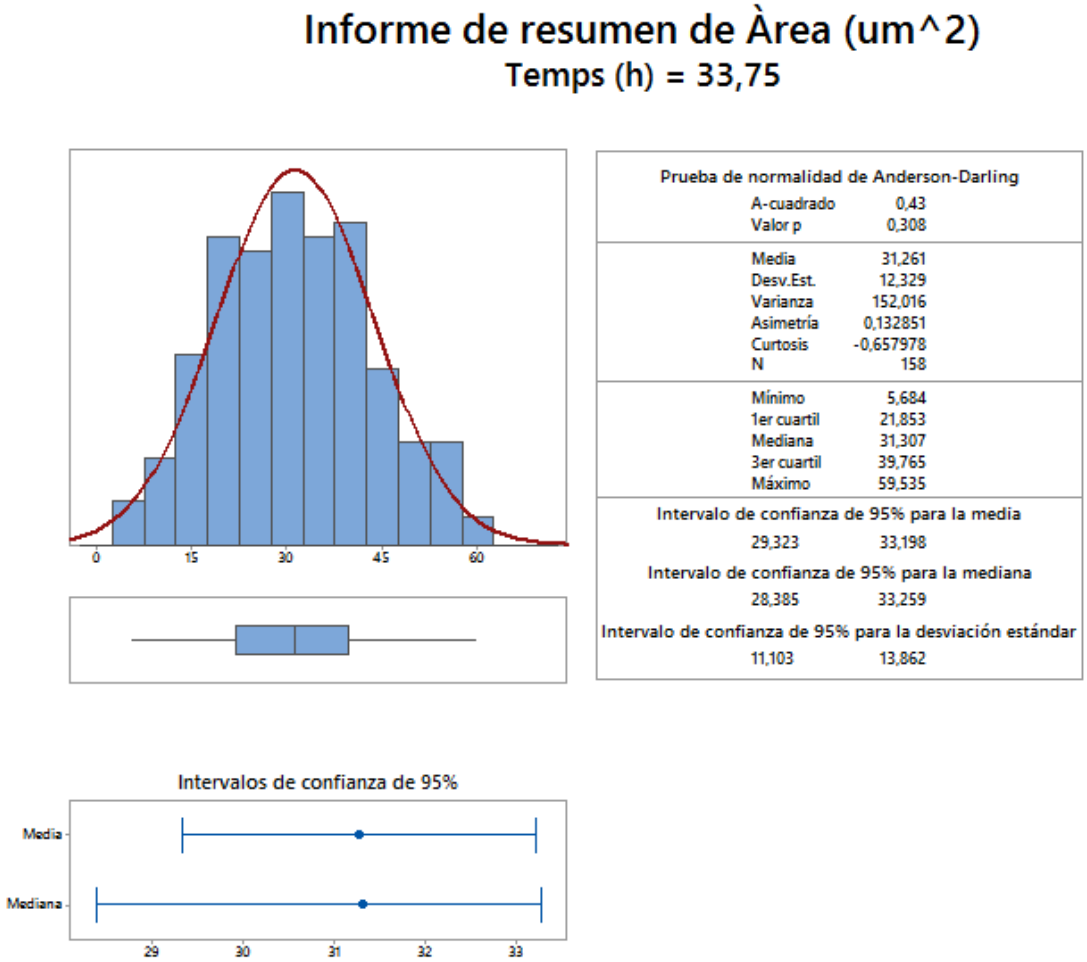


Figura 31. Informe de resum de l'histograma de l'àrea per a les mostres de 150 g/L de glucosa al temps 33,75 h.

Aquesta distribució es va mantenint amb poca diferència fins l'hora 33,75, en la qual la població torna a agrupar-se, aquest cop amb una mitjana més alta, de 31,2 μm^2. Es manté la mateixa distribució fins l'hora 43,5.

Al comparar els assajos es pot apreciar que quanta més concentració de glucosa hi ha al medi més ràpidament les cèl·lules formen dos grups diferenciats; aquesta disposició és més duradora a més concentració de glucosa. A les hores finals de l'experiment, la mitjana de les mides és més elevada quanta menys concentració de glucosa, és a dir, a l'assaig de 150 g/L de glucosa la mitjana és més alta que als altres assajos a les últimes hores (Taula 5).

Taula 4. Valor de la mitjana i desviació estàndard de l'àrea en el temps 40,25 de l'experiment.

Assaig	Mitjana de l'àrea (μm^2)	Desviació estàndard
150	33,8	14,8
200	30,9	12,6
250	26,6	10,5

També es pot observar que a les últimes hores aquesta mitjana es va fent lleugerament més baixa, caldria estudiar hores posteriors per a saber si s'hi distingeixen canvis en el comportament de les àrees de les cèl·lules.

Les dades d'àrea, però, només aporten informació sobre la mida de les cèl·lules, no sobre la seva forma. Per analitzar la forma de les cèl·lules primerament s'estudia la seva circularitat.

La circularitat és un descriptor de morfologia que es calcula a partir de la fórmula següent:

$$Circularitat = 4\pi\left(\frac{A}{P^2}\right)$$

On A és l'àrea i P el perímetre mesurat per a cada cèl·lula.

Com més proper a 1 sigui la circularitat, la seva forma és més rodona. Per un cercle aquest paràmetre valdria 1. Com més allunyat estigui, més allargada serà la figura.

Per estudiar-ne la circularitat s'ha representat la distribució d'aquesta per a cada assaig i temps en un histograma (Figura 32). Els histogrames de la circularitat mostren la distribució d'aquesta variable en la població. Utilitzant percentatges, aquestes distribucions, per a cadascun dels temps de l'evolució utilitzats en els diferents grups i pels tres assajos, ens informen de la circularitat de les cèl·lules de llevats a partir de la informació de la imatge digital.

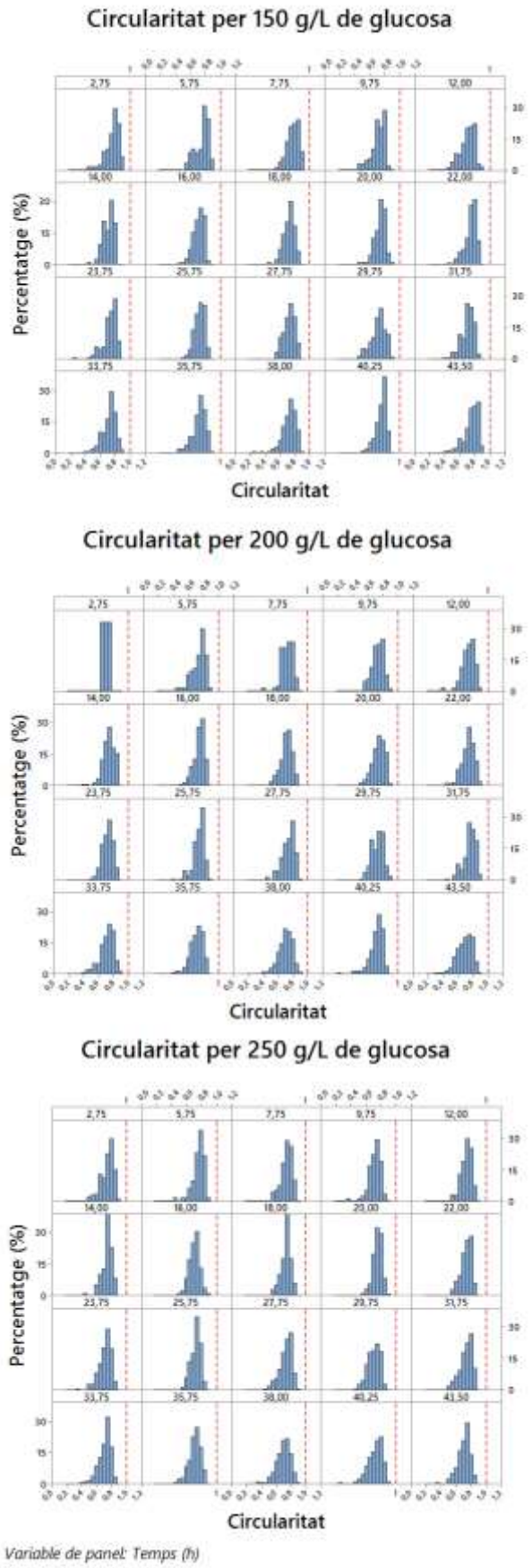


Figura 32. Histograma de la distribució de la circularitat pels tres assajos diferents

Les línies discontinues de color vermell representen el valor 1 de circularitat, que indicaria que les cèl·lules són cercles. Com es pot observar a la Figura 32, aquestes cèl·lules no són del tot arrodonides, ja que els valors de les seves circularitats es mantenen en valors més baixos que 1, oscil·lant majoritàriament entre 0,4 i 0,9.

També ens mostra que aquest paràmetre no pateix molta variació al llarg del temps, és a dir, es distribueix de manera similar durant l'experiment. Tampoc s'observen diferències importants entre els diferents assajos.

Per analitzar la morfologia de les cèl·lules hi ha dues opcions, ajustar un rectangle que inscrigui la cèl·lula trobant l'alçada i l'amplada d'aquest per donar els valors dels "diàmetres" de la cèl·lula, o bé ajustar-ne una el·lipse per obtenir els mateixos paràmetres. Per tal de saber quina opció és la més encertada per aquest estudi s'ha fet el gràfic de dispersió amb les dades dels tres assajos per cada temps tant de les mesures donades d'alçada i amplada del rectangle (Figures 33, 34 i 35) com de les mesures dels eixos major i menor de l'el·lipse ajustada (Figures 36, 37 i 38).

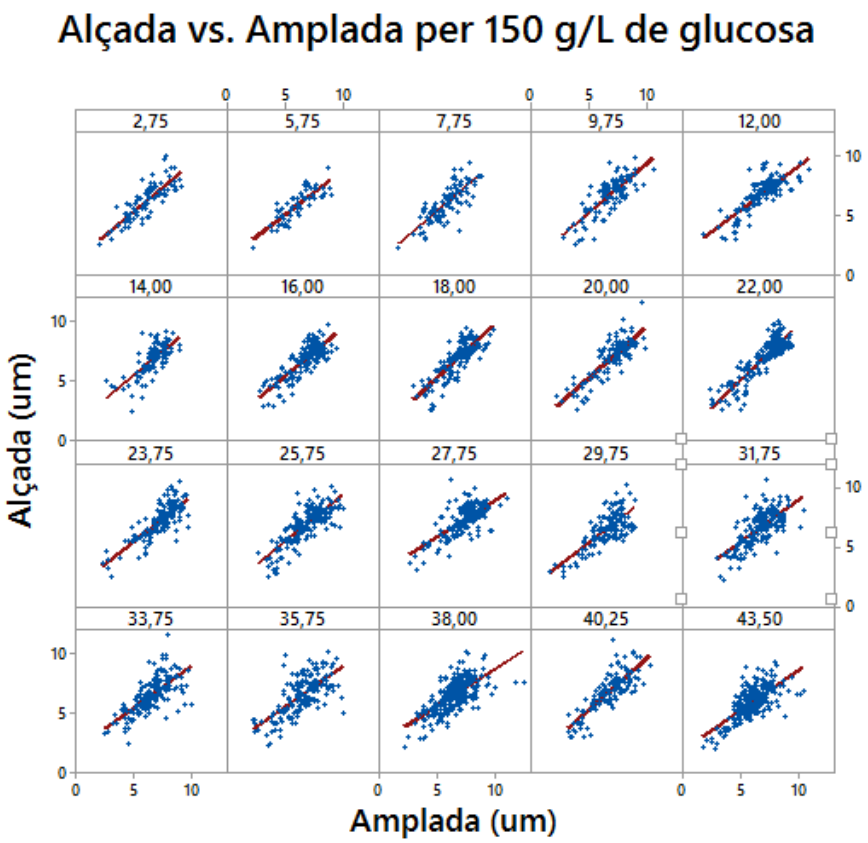


Figura 33. Gràfica de dispersió relacionant l'alçada amb l'amplada per cada temps per l'assaig de 150 g/L de glucosa.

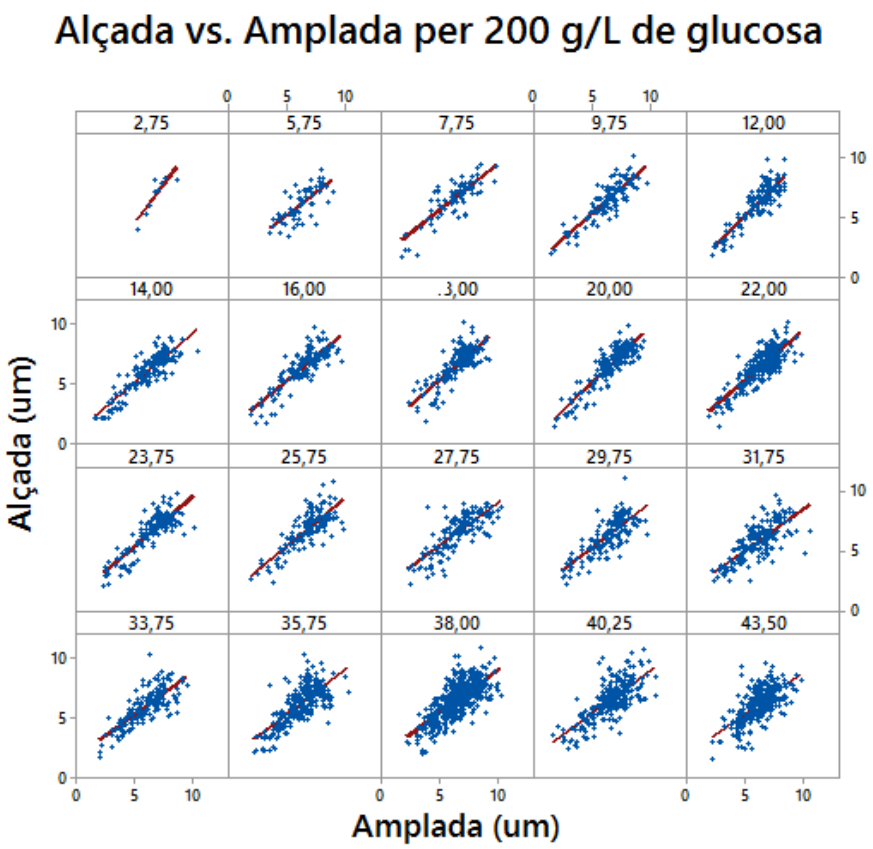


Figura 34. Gràfica de dispersió relacionant l'alçada amb l'amplada per cada temps per l'assaig de 200 g/L de glucosa.

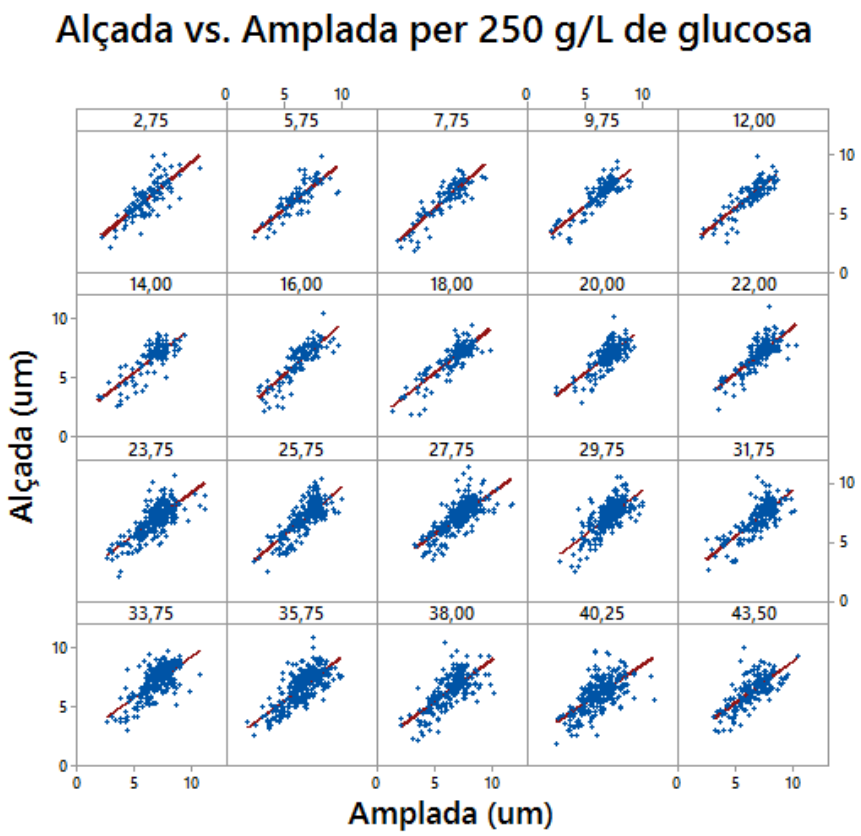


Figura 35. Gràfica de dispersió relacionant l'alçada amb l'amplada per cada temps per l'assaig de 250 g/L de glucosa.

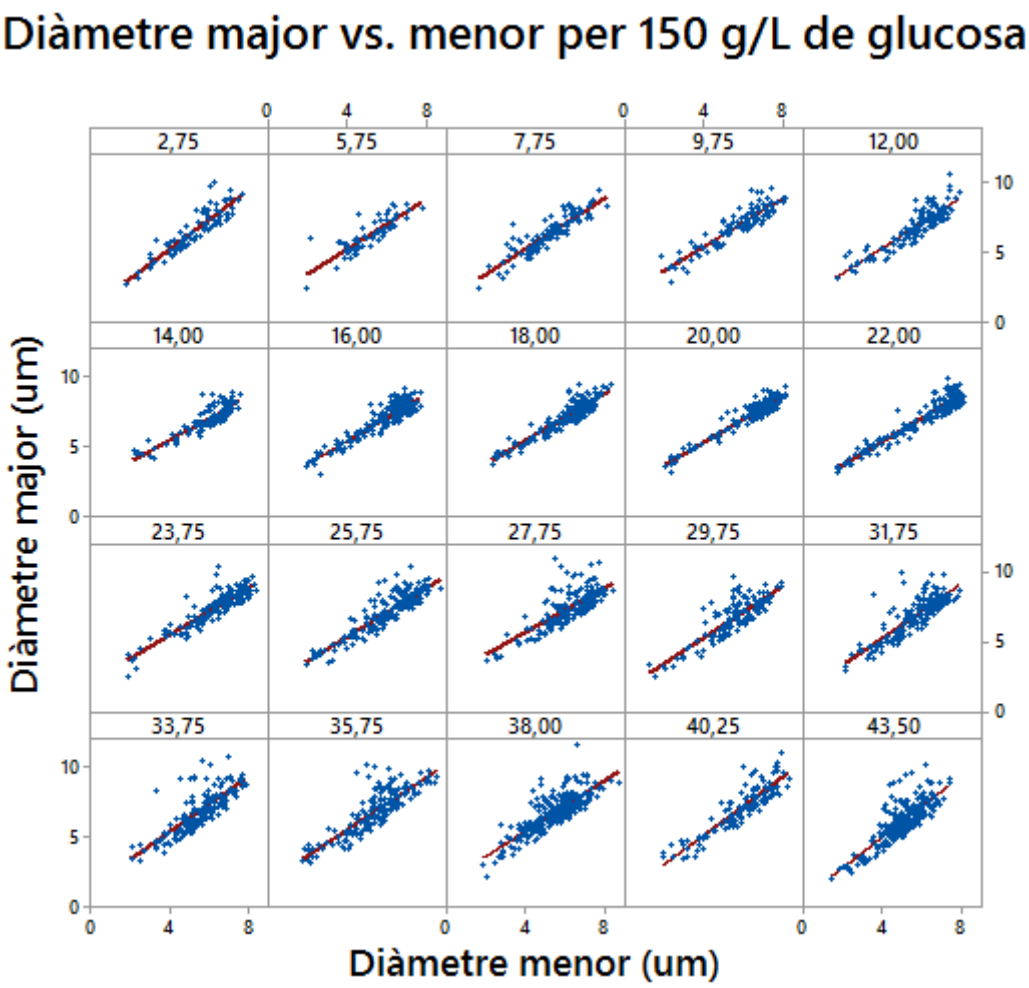


Figura 36. Gràfica de dispersió relacionant les mesures dels diàmetres major i menor per cada temps per l'assaig de 150 g/L de glucosa.

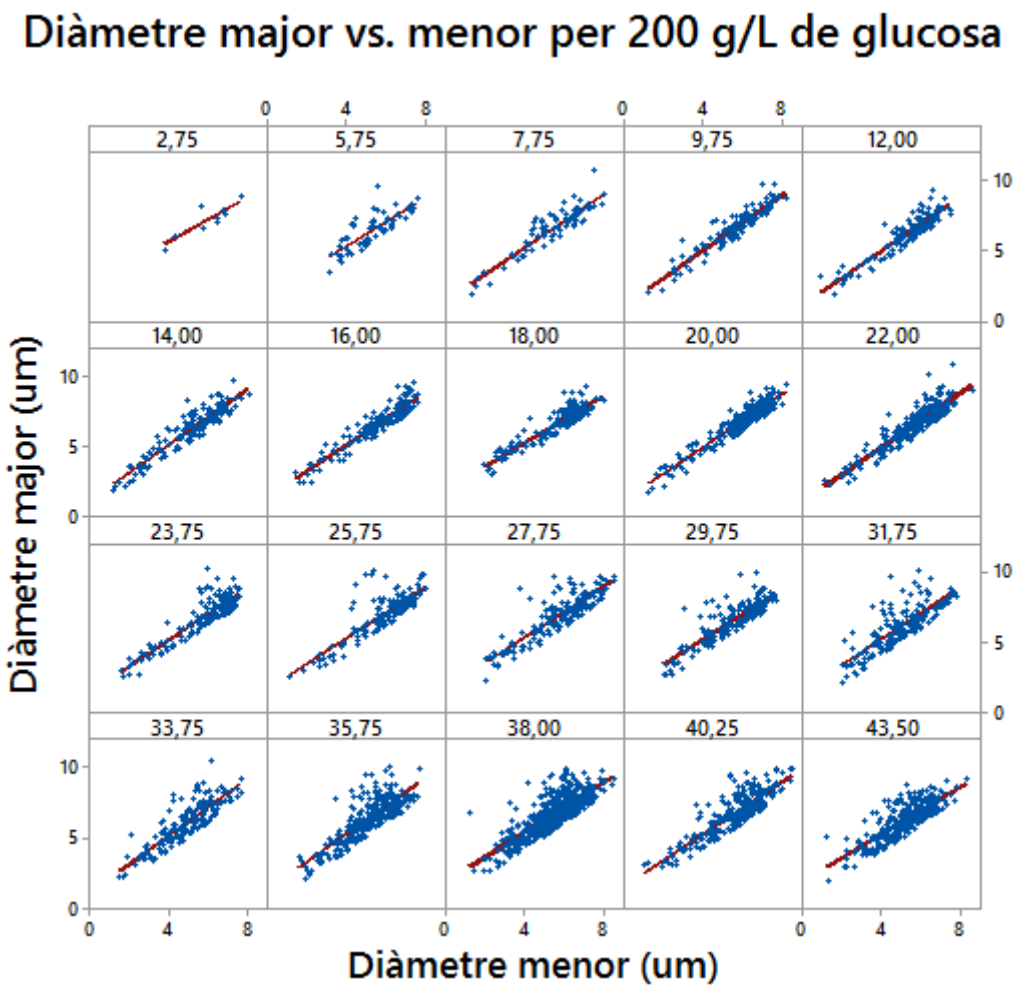


Figura 37. Gràfica de dispersió relacionant les mesures dels diàmetres major i menor per cada temps per l'assaig de 200 g/L de glucosa.

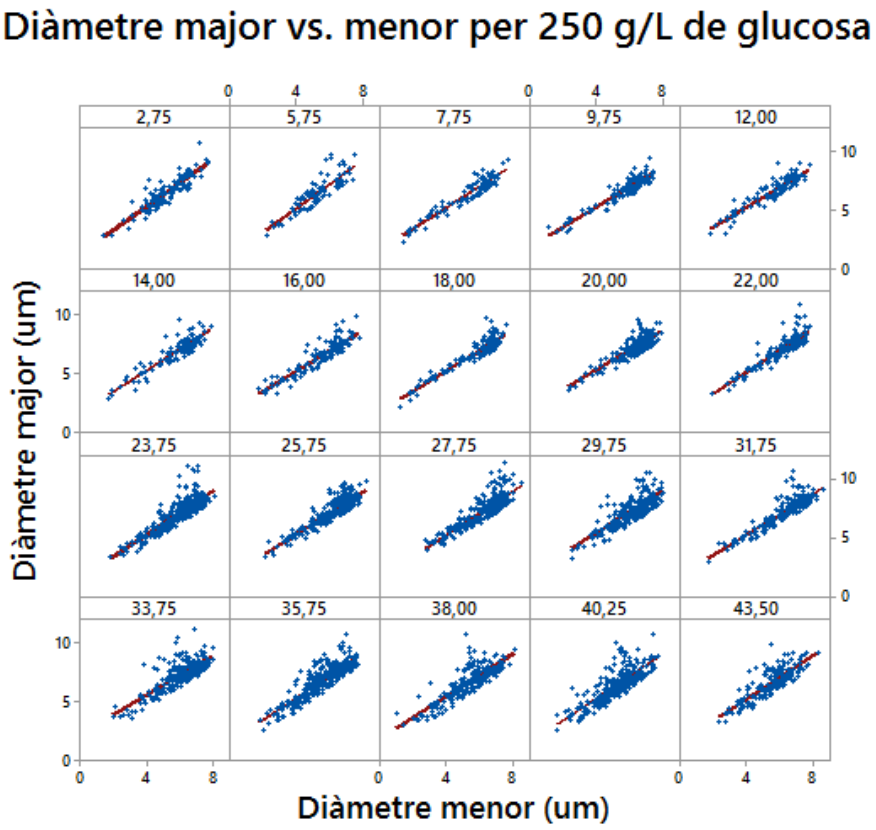


Figura 38. Gràfica de dispersió relacionant les mesures dels diàmetres major i menor per cada temps per l'assaig de 250 g/L de glucosa.

Per poder-ho analitzar de manera més precisa, es va escollir una hora determinada com a exemple per tal de fer la recta de regressió i comprovar les diferències entre les dues opcions, en aquest cas l'hora 22 de l'assaig de 200 g/L de glucosa.

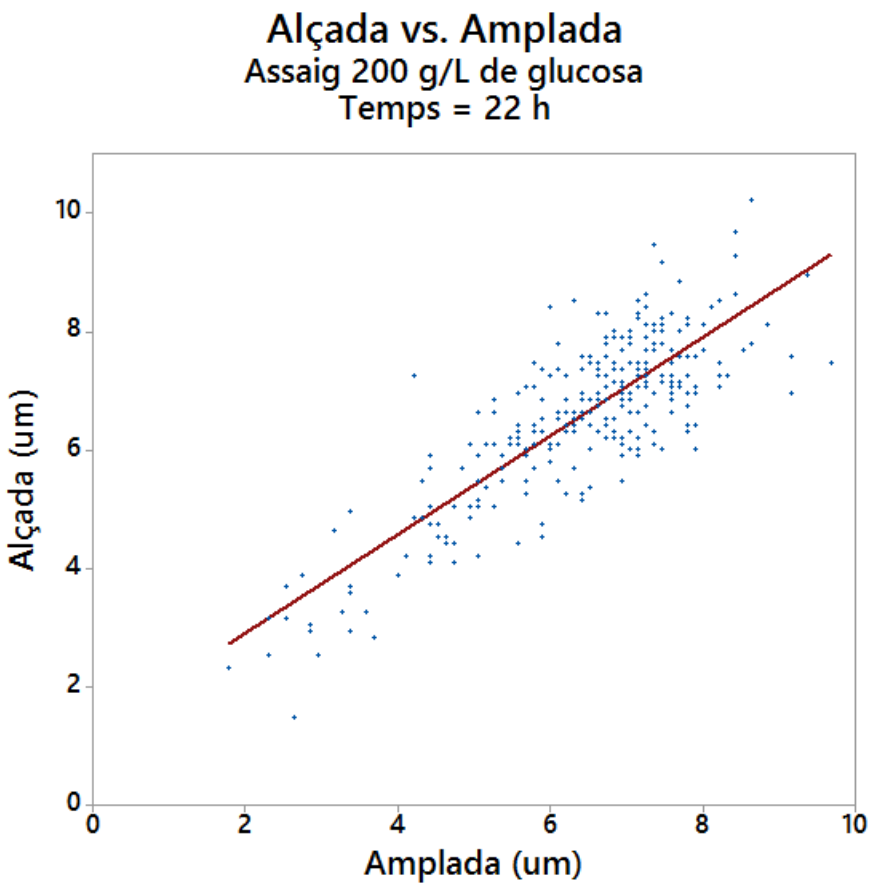


Figura 39. Gràfica de dispersió relacionant l'alçada amb l'amplada per l'hora 22 de l'assaig de 200 g/L de glucosa.

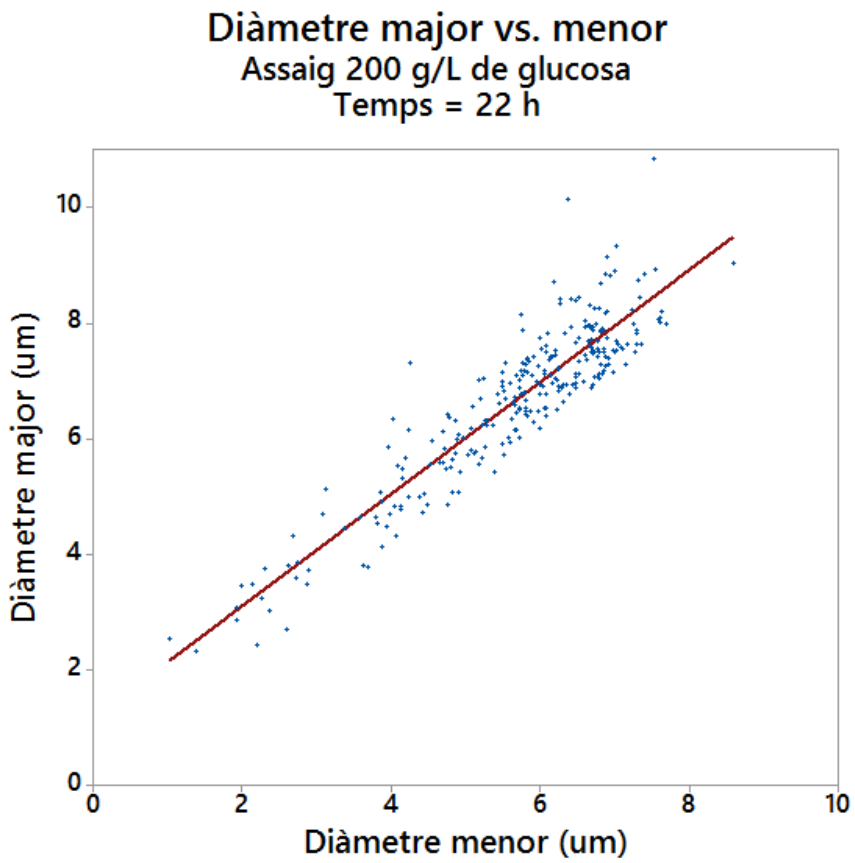


Figura 40. Gràfica de dispersió relacionant les mesures dels diàmetres major i menor per l'hora 22 de l'assaig de 200 g/L de glucosa.

Els resultats de l'ajust de la recta de regressió tant de la figura 39 com de la 40 es mostren a la Taula 6:

Taula 5. Resultats de l'ajust de la recta de regressió.

Alçada vs. Amplada	Diàmetre major vs. menor
$\mathbf{Alçada = 1,220 + 0.8343 \cdot Amplada}$	$\mathrm{D.major = 1{,}159 + 0.9692 \cdot D.menor}$
R^2 = 68,6 %	R^2 = 83,5 %

Els paràmetres escollits per analitzar la morfologia són els mesurats a partir de l'ajust de l'el·lipse (diàmetres) per dos motius atenent que:

1. Mirant els gràfics de dispersió s'aprecia una major dispersió en els corresponents a la relació entre alçada i amplada respecte als diàmetres.
2. Per tal de poder comparar amb altres estudis, i a la bibliografia consultada, s'utilitzen aquests paràmetres (Ohnuki et al., 2009 i Coelho et al., 2004) ja que a partir d'ells s'obté un paràmetre important per caracteritzar l'organisme, que és l'elongació (Ràtio entre el diàmetre major i el menor).

Donat que les dimensions de *S. cerevisiae* es troben entre 4 i 8 µm (Fajardo i Sarmiento, 2007) analitzem entre quins valors es troben els diàmetres mesurats pel programa ImageJ sobre les nostres imatges digitals (Taula 6).

Taula 6. Estadístics bàsics de la mida dels diàmetres major i menor segons l'assaig

Variable	Assaig	N	Mitjana	EE de la mitjana	Desv.Est.	Mínim	Q1	Mediana	Q3	Màxim
Diàmetre major (um)	150	3083	6,9011	0,026	1,4464	2,0126	5,9198	7,1051	7,9291	11,6543
	200	3687	6,6133	0,0244	1,479	1,6544	5,7657	6,8148	7,6332	10,8248
	250	3856	6,929	0,0218	1,3512	2,0902	6,146	7,1212	7,8366	11,4687
Diàmetre menor (um)	150	3083	5,7545	0,0253	1,4046	1,2245	4,9132	5,9628	6,8356	8,8307
	200	3687	5,4829	0,023	1,3948	0,863	4,6793	5,7138	6,5187	8,5872
	250	3856	5,8394	0,021	1,3068	0,9863	5,1023	6,1186	6,8268	8,6397

La taula 6 ens aporta informació sobre la quantitat de mostres mesurades per a cada grup variable – assaig, tenint per tots ells més de 3000 cèl·lules analitzades, amb una mitjana i una mediana que són similars als descrits a la bibliografia (per exemple, Fajardo i Sarmiento, 2007). Amb aquestes dades, però, no es coneix la distribució d'aquestes dades, per això es fa l'histograma (Figura 41).

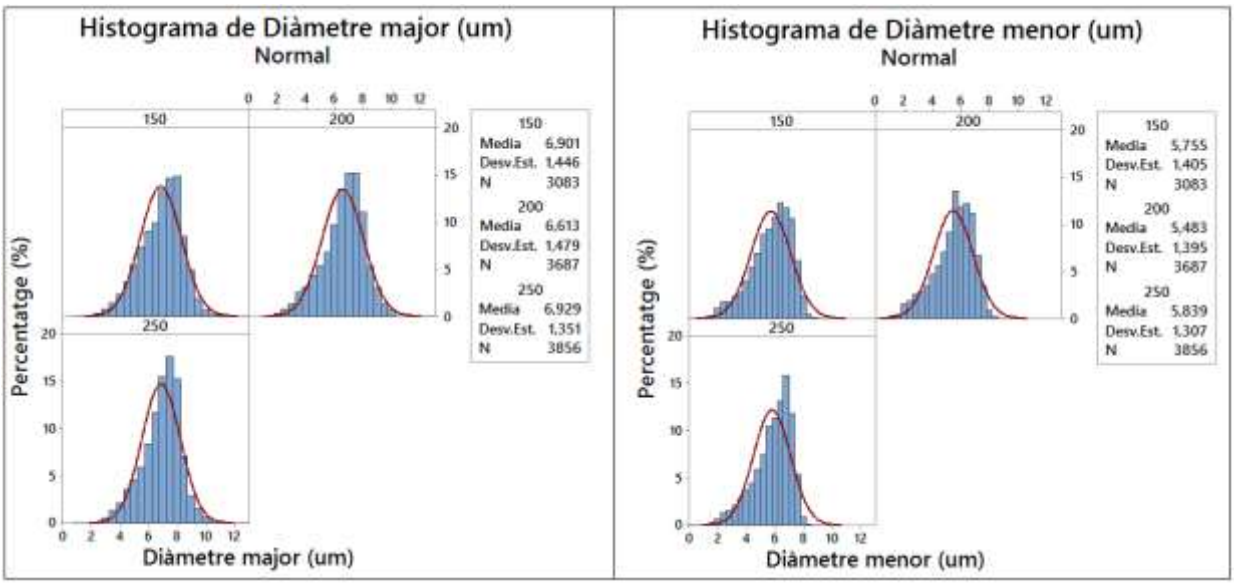


Figura 41. Histogrames de la distribució del diàmetre menor i major segons l'assaig ajustats i amb línies de referència a les marques de 4 i 8 µm.

A partir dels histogrames s'extreu que la mida dels diàmetres tant major com menor es troben a dintre del rang correcte de dimensions per aquest microorganisme i que amb el valor total, és a dir, sense tenir en compte el temps, no s'aprecia que la concentració de glucosa afecti a les mesures de diàmetre.

El paràmetre d'elongació (Figura 42) és el ràtio entre el diàmetre major i el menor i aporta informació sobre la deformació de les cèl·lules, el ràtio ideal per a representar cèl·lules tant

que no estiguin gemmant com amb gemma molt petita es troba entre 1 i 1,5 (Coelho et al., 2004), una elongació més gran indica cèl·lules que estan gemmant o que tenen alguna deformació o forma irregular.

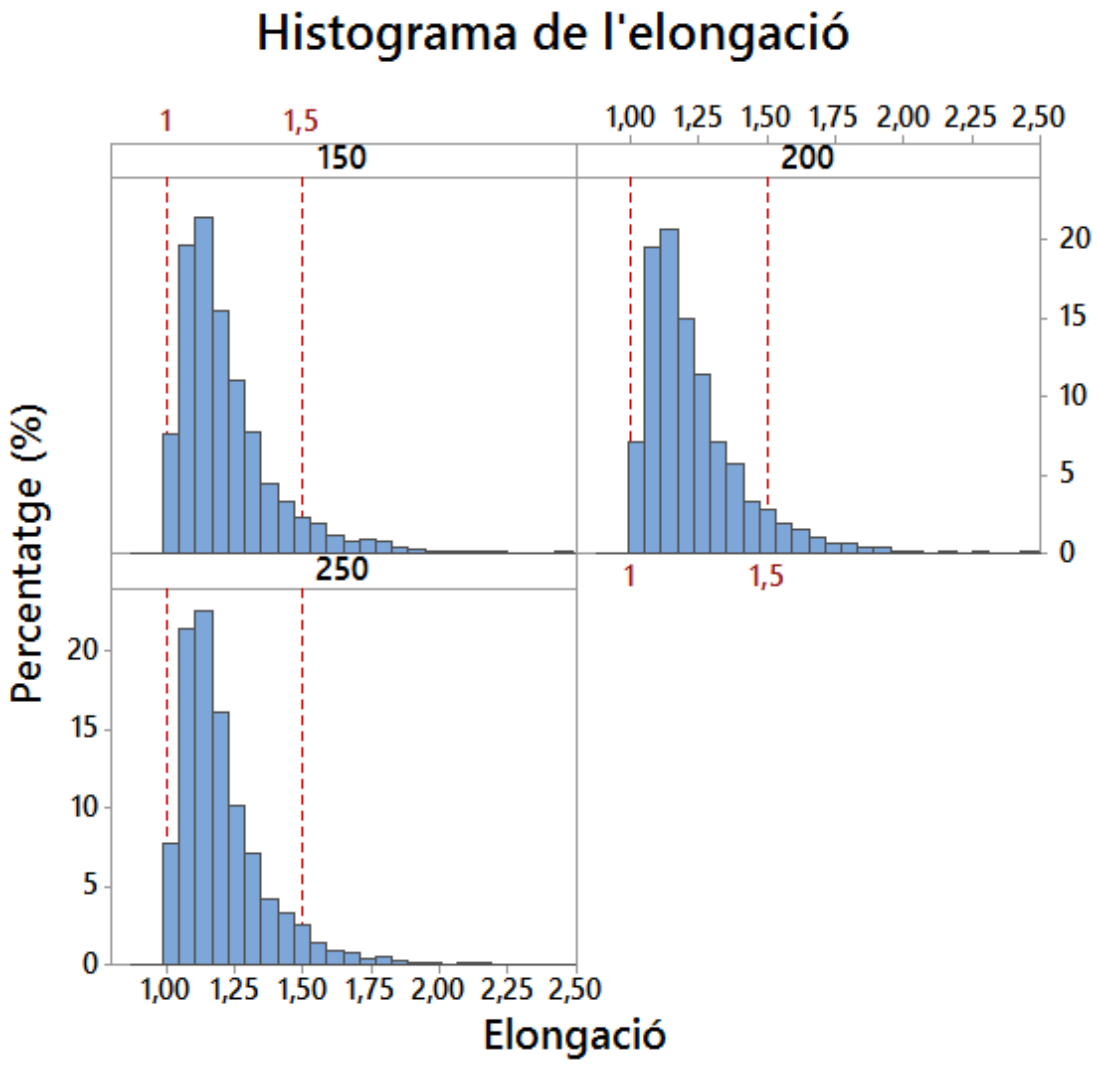


Figura 42. Histograma de l'elongació per cada concentració de glucosa inicial (150, 200 i 250 g/L).

Les línies de referència mostren el rang de valors ideals del ràtio per a cèl·lules sense gemma o amb una gemma petita. Com que el programa ImageJ separa les gemmes de les cèl·lules mare, aquesta elongació es concentra majoritàriament en aquest rang, situant-se al voltant del 90% de les elongacions de les cèl·lules entre aquests valors. L'elongació és un paràmetre important per tal de poder distingir les cèl·lules sense gemma de les que estan gemmant, tot sabent que l'elongació de les segones serà més elevada. La distribució típica de l'elongació d'un cultiu de *S. cerevisiae*, és d'aproximadament el 70% de cèl·lules situades entre els valors 1 i 1,5 i prop del 20% en valors d'entre 1,5 i 2, el 8% entre 2 i 2,5 i el 2% entre 2,5 i 3 (Coelho et al., 2004).

Aquests resultats que hem presentat representen l'inici d'una nova etapa de treball. Cal seguir aprofundint amb l'anàlisi estadística de la base de dades obtinguda aplicant mètodes d'inferència univariant i multivariant per tal de poder investigar tota la informació recollida

4. CONCLUSIONS

S'ha posat a punt la tècnica experimental en el laboratori per la preparació cel·lular i de medi que ha permès la captura d'imatges digitals de les cèl·lules de llevat per a tres concentracions inicials de glucosa (150, 200 i 250 g/L) al llarg de 43 h garantint que el cultiu s'ha adaptat durant la fase de latència al medi, ha assolit el creixement exponencial i s'ha mantingut en fase estacionària durant més de 20 h.

S'han adaptat els paràmetres de captura d'imatge de la càmera Infinity1 a la tinció de blau de metilè per poder diferenciar cèl·lules vives i cèl·lules mortes que inicialment no podíem distingir.

S'ha establert el protocol de treball pel tractament i anàlisi d'imatges digitals de les cèl·lules de llevat mitjançant el programari lliure ImageJ. S'han dissenyat diverses macros per automatitzar aquest tractament i anàlisi.

Es disposa d'una base de dades de característiques individuals d'aproximadament 11.500 cèl·lules de llevat en relació a grandària i morfologia de les seves imatges.

S'ha realitzat una anàlisi exploratòria preliminar d'aquesta base de dades:

a) Atenent a l'evolució temporal del cultiu s'observa que les distribucions de les àrees de les imatges dels llevats corresponents als 20 instants temporals varien en forma, en tendència central i en variabilitat, permetent el reconeixement de canvis de fase. Aquestes variacions no permeten determinar amb exactitud el canvi de fase, però sí que ens permet aproximar-nos.

b) Els paràmetres morfològics obtinguts permeten descartar que les cèl·lules siguin rodones i no s'aprecien canvis importants al llarg del temps pel paràmetre circularitat.

c) Els resultats del paràmetre elongació estan en sintonia amb els paràmetres referenciats a la bibliografia (1 – 1,5).

d) Durant les diferents fases de l'evolució del cultiu s'observen canvis en les distribucions de les àrees de les cèl·lules de llevat. En la fase de latència les distribucions de les àrees són més irregulars que en les altres fases, amb valors de la mitjana petits. Durant la fase exponencial la forma de la distribució canvia cap a una distribució bimodal, formant-se dues subpoblacions diferenciades (àrees petites i grans), amb un increment en el valor de les mitjanes. En la fase estacionària aquesta distribució varia cap a una distribució més compacta, unimodal i amb valors de la mitjana més grans que a l'inici. Aquests canvis de forma i tendència central de la distribució de les àrees durant les tres fases del cultiu identificades (lag, log i estacionària), en general, s'observa que es reprodueix per a cada una de les tres concentracions inicials de glucosa estudiades (150, 200 i 250 g/L).

e) Per a les tres concentracions inicials de glucosa (150, 200 i 250 g/L), la major àrea s'obté amb la menor concentració de glucosa al medi i la menor àrea correspon a la major concentració de glucosa.

5. BIBLIOGRAFIA

BOE. Espanya. Real Decreto 53/1995, de 20 de enero, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la cerveza y de la malta líquida. *Boletín oficial del estado*. BOE, 9 de febrero de 1995, pàgines 4271 a 4274 (4 pàgines). BOE-A-1995-3394.

Cáceres García, J.C. i Reyna López, A.. Modelamiento microbiológico para la levadura. Klotz,B; Zimmerman, F. Projecte de final de grau, 2002. [Universidad de la Sabana].

Castleman, Kenneth R. *Digital Image processing*. 1ª Edició. New Jersey, Estats Units: Editorial: Prentice Hall, 1996. ISBN: 0-13-211467-4.

Chacón, A. Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y en la industria. Agronomía Mesoamericana, 2004. Vol. 15, núm. 1, p. 93-106.

Cipollina, C.; Alberghina, L.; Porro, D i Vai, M.. SFP1 is involved in cell size modulation in respiro-fermentative growth conditions. *Yeast* , 2005 [en línia]. Vol. 22, núm. 5, p. 385-399. [Consulta: 9 gener 2015]. Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15806610>. ISSN 0749-503X

Coelho, M.A.Z.; Belo,I.; Pinheiro, R.; Amaral, A.L.; Mota, M.; Coutinho, J.A.P. i Ferreira, E.C. Effect of hyperbaric stress on yeast morphology: Study by automated image analysis. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004 [en línia]. Vol. 66, núm. 3, p. 318-324.[Consulta: 9 gener 2015]. Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15257421>. ISSN 0175-7598.

Fajardo Castillo E.E. i Sarmiento Forero S.C.. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Projecte de final de grau, 2007. [Pontificia Universidad Javeriana].

Folch-Mallol, J.L.; Garay-Arroyo, A; Lledías, F i Covarrubias Robles, A.A.. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de Microbiología, 2004. Vol. 46, p. 24-46.

Hartwell, L.H.. *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. American Society for Microbiology, 1974. Vol. 38, núm. 2, p. 164-198.

Hernández Peñaranda, A. *Microbiología industrial.* 1ª Edició. Amb la col·laboració de Afaro I i Arrieta R. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUED), 2003. ISBN: 978-9968-31-255-4.

Hernández-oropeza, J.I. i Aranda-Barradas J.S.. La Biosíntesis de Trehalosa en *Saccharomyces cerevisiae* : Aspectos Generales y Modelación Metabólica. BioTecnología, 2011. Vol. 15, núm. 3, p. 19-34.

Israelidis, C.J.. Nutrition - Single Cell Protein, twenty years later. 2003 . [en línia]. Disponible a: <http://users.hol.gr/~bio/HTML/PUBS/VOL1/isreali.htm>.

Lewis, J.G.; Learmonth, R.P.; Attfield, P.V. i Watson, K. The need for consistent nomenclature and assessment of growth phases in diauxic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of general microbiology, 1993. Vol. 139, núm. 4, p. 835-839.

Lord, P.G. i Wheals, A.E. Asymmetrical division of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 1980. Vol. 142, núm. 3, p. 808-818.

Ohnuki, S., Nogami, S. i Ohya, Y. A microfluidic device to acquire high-magnification microphotographs of yeast cells. Cell division [en línia]. BioMed Central, 2009. Vol. 4. [Consulta: 9 gener 2015]. Disponible a: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2669073&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. ISSN 1747-1028.

Park, J..; Kim, S.; Park, H; Kim, J.S. i Yoon, J. Simultaneous utilization of galactose and glucose by *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain for ethanol production. Renewable energy, 2014. Vol. 65, p. 213-218.

Porro, D.; Brambilla, L. i Alberghina, L. Glucose metabolism and cell size in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters, 2003. Vol. 229, núm. 2, p. 165-171.

Werner-washburne, M.; Braun, E; Johnston, G.C. i Singer, R.A. Stationary Phase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiological Reviews, 1993. Vol. 57, núm. 2, p. 383-401.