



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

“APLICACIÓN DE LA GEOMETRÍA FRACTAL A AGREGADOS  
CELULARES DE *Beta vulgaris* L. CRECIDOS EN SUSPENSIÓN  
(MATRACES Y BIORREACTOR TIPO TANQUE AGITADO)”.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS EN DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS

PRESENTA:

**I.Q. CARLOS ALBERTO JIMÉNEZ JUNCA.**

DIRECTOR:

**DR. ANTONIO RUPERTO JIMÉNEZ APARICIO.**

CO DIRECTOR

**DR. GUSTAVO FIDEL GUTIÉRREZ LÓPEZ.**

YAUTEPEC, MORELOS, OCTUBRE DEL 2005





# INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

## COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

### ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, Mor. siendo las 11:00 horas del día 29 del mes de agosto del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del Centro de Desarrollo de productos Bióticos para examinar la tesis de grado titulada:

Aplicación de la geometría fractal a agregados celulares de *Beta vulgaris* L. crecidos en suspensión (matraces y biorreactor tipo tanque agitado)

Presentada por el alumno:

<u>JIMÉNEZ</u> Apellido paterno	<u>JUNCA</u> materno	<u>CARLOS ALBERTO</u> nombre(s)
Con registro:		B 0 3 0 8 0 8

aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

#### LA COMISION REVISORA

Director de tesis

DR. ANTONIO R. JIMÉNEZ APARICIO

DR. JORGE CHANONA PÉREZ

DRA. ALMA ANGÉLICA DEL VILLAR MARTÍNEZ

Co-Director de tesis

DR. GUSTAVO F. GUTIÉRREZ LÓPEZ

DR. ÁNGEL RENÉ ARZUFFI BARRERA

DR. MARIO RODRÍGUEZ MONROY

DR. ADRIÁN G. QUINTERO GUTIÉRREZ  
EL PRESIDENTE DEL COLEGIO IPN  
DE PRODUCTOS BIÓTICOS  
YAUTEPEC, MOR.





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
COORDINACIÓN GENERAL DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

---

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

Yautepec, Morelos a Julio 06 de 2005

El que suscribe: Carlos Alberto Jiménez Junca, alumno del programa de Maestría en Desarrollo de Productos Bióticos con número de registro B030808, adscrito al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos; manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis: “Aplicación de la geometría fractal a agregados celulares de *Beta vulgaris L.* crecidos en suspensión (matraces y biorreactor tipo tanque agitado)”, el cual fue dirigido por el Doctor Antonio Ruperto Jiménez Aparicio y codirigido por el Doctor Gustavo Fidel Gutiérrez López. El autor cede los derechos del trabajo al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. El permiso se puede solicitar escribiendo a una de las siguientes direcciones: Departamento de Biotecnología, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yautepec-Jojutla km. 8.5 CP. 62731, Yautepec (Morelos) ó Carrera 94 No. 22A90 Interior 4 apto. 403, Bogotá (Colombia). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Carlos Alberto Jiménez Junca

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Células del Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la Dirección del Doctor Antonio Ruperto Jiménez Aparicio y la Codirección del Doctor Gustavo Fidel Gutiérrez López (Investigador del Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional).

Este trabajo de investigación constituye uno de los objetivos planteados en el Proyecto CONACYT 39562 *“Estudio por análisis de imágenes y fractales de la mecanoquímica de la pared celular de cultivos en suspensión sometidos a permeabilización con agentes químicos”* dirigido por el Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio y los CGPI 20040672 y 20050183 apoyados por el Instituto Politécnico Nacional.

Asimismo, el sustentante contó con una Beca del Programa ALFA de la Comunidad Económica Europea, del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) y Beca – Tesis del CONACYT.

## RECONOCIMIENTOS

A mi Director y Codirector de tesis, Drs. Antonio Jiménez Aparicio y Gustavo Gutiérrez López, por el apoyo y ayuda que me brindaron durante mi estadía en México y por su acertada dirección en la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité revisor:

- Dr. Mario Rodríguez Monroy por su amistad y contribución en la realización de este proyecto de investigación.
- Dr. René Arzuffi Barrera por su constante colaboración y apoyo como consejero de estudios.
- Dr. Jorge Chanona Pérez por las observaciones y opiniones que aportaron y contribuyeron a la mejora del trabajo.

A la red ALFA de la Comunidad Económica Europea por la beca recibida para la realización de estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca-tesis recibida y por el apoyo para la realización de este trabajo.

Al Programa de Formación de Investigadores (PIFI) del IPN por el apoyo recibido como becario en el proyecto CGPI 20040672.

A la Universidad de La Sabana por la oportunidad que me brindó al presentarme ante la red ALFA para realizar los estudios de maestría en México y el apoyo económico otorgado para financiar parte de mis estudios.

## **DEDICATORIAS**

A Dios, porque sin él no sería lo que soy, ni estaría donde estoy.

A mi madre, que aunque se encuentre lejos, siempre estará en mi corazón y será una continua motivación y apoyo en mi camino.

A mi amada esposa, por su apoyo incondicional, su amor y motivación que siempre me permitirán llegar cada día más lejos y alcanzar mas metas.

A ese nuevo ser que viene en camino y que pronto estará entre nosotros, es una nueva luz en el camino que desde ya alumbra nuestra existencia.

A mi padre, porque ser padre y madre a la vez no es fácil.

A mis hermanos, porque siempre me han apoyado y brindado su amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis profesores de la maestría por el aporte a mi formación durante esta etapa de mi vida.

A Juanita, por su amistad, cariño y colaboración durante mi estancia en México.

A mis compañeros de maestría porque me ayudaron a sobrellevar la soledad al estar lejos de mi Patria.

A Gabriela Trejo y José Luís Trejo, por su amistad y colaboración: aprendí bastante de ellos.

A Alfonso y Edith, gracias por hacernos sentir en Colombia estando en México.

A todos mis compañeros de la Universidad de la Sabana, porque a pesar de la distancia siempre sentí su apoyo y amistad.

A la señora Mary y el señor Abel, por abrirnos las puertas de su hogar y darnos su cariño y amistad.

A los nuevos amigos que conseguí en México, gracias por el cariño y apoyo constante, los esperamos en Colombia.

A todo el personal del Ceprobi, por la compañía y colaboración constante.

A todos los Mexicanos que nos hicieron sentir como en casa y nos permitieron disfrutar de la belleza y riqueza de su país.

## CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE CUADROS	iv
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
2.1 GEOMETRÍA EUCLIDIANA	5
2.2 GEOMETRÍA FRACTAL	5
2.2.1 Propiedades de los fractales	6
2.2.2 Clases de fractales	7
2.2.3 Dimensión fractal	7
2.2.3.1 Métodos de medición de la dimensión fractal	9
2.2.3.2 Método de las relaciones área-perímetro	10
2.2.4 Los fractales en las ciencias biológicas	14
2.2.5 Agregados y fractales	15
2.3 ANÁLISIS DE IMÁGENES	18
2.3.1 Análisis de imágenes y geometría fractal	20
2.4 CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES EN SUSPENSIÓN	22
2.4.1 Efectos del estrés hidrodinámico sobre los cultivos de células vegetales en suspensión	23
2.4.2 Generalidades del cultivo vegetal de <i>Beta vulgaris</i>	25
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
5.1 MATERIALES	29
5.1.1 Material biológico	29

5.1.2	Medio de cultivo	29
5.2	CULTIVOS CELULARES	29
5.2.1	Cultivos celulares en matraces	29
5.2.2	Cultivos celulares en biorreactor	30
5.3	EQUIPOS	30
5.3.1	Equipo de análisis de imágenes	30
5.4	MÉTODOS	31
5.4.1	Captura de las imágenes	31
5.4.2	Medición de las características morfológicas	32
5.4.3	Medición de las dimensiones fractales	32
5.4.3.1	Dimensión fractal de perímetro $D_P$	32
5.4.3.2	Dimensión fractal de área $D_A$	32
5.4.4	Adecuación de la metodología de análisis de imágenes	33
5.4.4.1	Selección del equipo	33
5.4.4.2	Adaptación del equipo	33
5.4.4.3	Dilución de la muestra	33
5.4.4.4	Volumen de muestra	34
5.4.4.5	Escala de observación	35
5.4.4.6	Procesamiento de la imagen	35
5.4.4.7	Número de agregados	36
5.4.5	Seguimiento de la concentración de biomasa	36
5.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1	ADECUACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE IMÁGENES	37
6.1.1	Selección del equipo	37
6.1.2	Adecuación del equipo	39
6.1.3	Dilución de la muestra	40
6.1.4	Volumen de muestra	43
6.1.5	Escala de observación	45
6.1.6	Edición de la imagen	48
6.1.7	Número de agregados	51
6.1.8	Condiciones para el análisis de imágenes en la determinación de las dimensiones fractales de agregados de <i>Beta vulgaris</i>	53

6.2	EVALUACIÓN DE $D_p$ Y $D_A$ DURANTE EL CRECIMIENTO DE AGREGADOS EN SUSPENSIÓN DE <i>Beta vulgaris</i> CRECIDOS EN MATRACES	53
6.2.1	Cinética de crecimiento	53
6.2.2	Cambios en el tamaño de los agregados	54
6.2.3	Cambios en la dimensión fractal $D_p$	55
6.2.4	Cambios en la dimensión fractal $D_A$	56
6.3	EVALUACIÓN DE $D_p$ Y $D_A$ DURANTE EL CRECIMIENTO DE AGREGADOS EN SUSPENSIÓN DE <i>Beta vulgaris</i> CRECIDOS EN BIORREACTOR	58
6.3.1	Cinética de crecimiento	58
6.3.2	Cambios en el tamaño de los agregados	60
6.3.3	Cambios en la dimensión fractal $D_p$	61
6.3.4	Cambios en la dimensión fractal $D_A$	62
6.4	RELACIONES ENTRE LOS CAMBIOS DE $D_p$ Y $D_A$ CON LOS CAMBIOS EN LA BIOMASA Y TAMAÑO DE LOS AGREGADOS CELULARES DE <i>Beta vulgaris</i> CRECIDOS EN MATRACES Y BIORREACTOR	65
6.4.1	Biomasa y tamaño	65
6.4.2	Biomasa y dimensión fractal $D_p$	66
6.4.3	Biomasa y dimensión fractal $D_A$	67
6.4.4	Análisis conjunto biomasa-tamaño-dimensión fractal $D_p$	68
6.4.5	Análisis conjunto biomasa-tamaño-dimensión fractal $D_A$	69
6.5	EFFECTO DEL ESTRÉS HIDRODINÁMICO SOBRE LAS DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS Y DE DIMENSIÓN FRACTAL ENCONTRADAS ENTRE LOS CULTIVOS CRECIDOS EN MATRACES Y BIORREACTOR	70
7.	CONCLUSIONES	73
8.	BIBLIOGRAFÍA	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura

2.1	Autosimilud en fractales	7
2.2	Gráfico de ley de potencia	9
2.3	Método de las relaciones área- perímetro	11
2.4	Interpretación de $D_P$	12
2.5	Significado geométrico de la dimensión fractal de área $D_A$	12
2.6	Dimensión fractal de área	13
5.1	Diagrama de flujo del plan de trabajo experimental	28
5.2	Biorreactor de 2 l usado para el cultivo de <i>B. vulgaris</i>	30
5.3	Equipo de análisis de imágenes. a) Microscopio óptico b) Estereoscopio	31
6.1	Imágenes de agregados de <i>Beta vulgaris</i> tomadas con los niveles de aumento mas bajos de cada microscopio	38
6.2	Imagen de partículas de látex usada para calcular la dimensión fractal $D_A$ durante un proceso de agregación	38
6.3	Área de trabajo del microscopio estereoscópico	39
6.4	Sistema de platina y portamuestras diseñados para tomar imágenes en el microscopio estereoscópico	40
6.5	Efecto del nivel de dilución sobre las imágenes de los agregados de <i>Beta vulgaris</i> (Vista superior)	41
6.6	Efecto del nivel de dilución sobre las imágenes de los agregados de <i>Beta vulgaris</i> (Vista frontal)	42
6.7	Areas ocupadas por los agregados de acuerdo al nivel de dilución	42
6.8	Efecto del volumen de muestra sobre las imágenes de agregados de <i>Beta vulgaris</i>	44
6.9	Imágenes de agregados de <i>Beta vulgaris</i> obtenidas con diferentes escalas de observación	46
6.10	Gráfica de $\ln P$ vs $\ln A$ usada para calcular $D_P$	47
6.11	Efecto de la escala de observación sobre $D_P$ y $D_A$	48
6.12	Imágenes editadas de agregados de <i>Beta vulgaris</i>	49
6.13	Efecto de la edición de la imagen sobre $D_P$ y $D_A$	50
6.14	Efecto del número de agregados sobre las dimensiones fractales	52

---

6.15	Cinética de crecimiento de <i>Beta vulgaris</i> en matraces	54
6.16	Cambios de área de los agregados de <i>Beta vulgaris</i> crecidos en matraces	55
6.17	Cambios de la dimensión fractal $D_P$ durante el crecimiento de <i>Beta vulgaris</i> en matraces	56
6.18	Cambios de la dimensión fractal $D_A$ durante el crecimiento de <i>Beta vulgaris</i> en matraces	57
6.19	Cinética de crecimiento de <i>Beta vulgaris</i> en biorreactor	60
6.20	Cambios de área de los agregados de <i>Beta vulgaris</i> crecidos en biorreactor	61
6.21	Cambios de la dimensión fractal $D_P$ durante el crecimiento de <i>Beta vulgaris</i> en biorreactor	62
6.22	Cambios de la dimensión fractal $D_A$ durante el crecimiento de <i>Beta vulgaris</i> en biorreactor	63
6.23	Relación entre la concentración de biomasa y el tamaño de los agregados crecidos en matraces y biorreactor	65
6.24	Relación entre la concentración de biomasa y la dimensión fractal $D_P$ de los agregados crecidos en matraces y biorreactor	66
6.25	Relación entre la concentración de biomasa y la dimensión fractal $D_A$ de los agregados crecidos en matraces y biorreactor	68
6.26	Relación entre la concentración de biomasa, el tamaño y $D_P$ de los agregados crecidos en matraces y biorreactor	69
6.27	Relación entre la concentración de biomasa, el tamaño $D_A$ de los agregados crecidos en matraces y biorreactor	70

---

**INDICE DE CUADROS****Cuadro**

2.1	Aplicación del método de las relaciones área-perímetro en diversas áreas	14
2.2	Aplicación de la geometría fractal en las ciencias biológicas	14
2.3	Aplicación del análisis de imágenes en la biotecnología	20
2.4	Uso del análisis de imágenes para el cálculo de la dimensión fractal.	21
6.1	Aumentos de los microscopios evaluados para la toma de las imágenes	37
6.2	Propiedades de las imágenes tomadas con los microscopios evaluados	38
6.3	Número de agregados y área ocupada por imagen para diferentes tamaños de muestra	44
6.4	Escalas de observación evaluadas para la medición de las dimensiones fractales	45
6.5	Diferencias mínimas detectables de entre dimensiones fractales para diferentes tamaños de muestra	53
6.6	Condiciones del análisis de imágenes establecidas para determinar dimensiones fractales	53
6.7	Características morfológicas de agregados de <i>Beta vulgaris</i> durante su crecimiento en matraces	59
6.8	Características morfológicas de agregados de <i>Beta vulgaris</i> durante su crecimiento en biorreactor	64
6.9	Escalas de mezcla de Kolmogorov y tamaños de agregados obtenidos en el crecimiento de <i>Beta vulgaris</i> en matraces y biorreactor	71

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	Área
B <sub>5</sub>	Medio de cultivo Gamborg
bc	Betacianinas
bit	Dígito binario
bx	Betaxantinas
CCD	Dispositivo de cargas interconectadas
d	Días
D	Dimensión fractal
D <sub>P</sub>	Dimensión fractal de perímetro
D <sub>A</sub>	Dimensión fractal de área
D <sub>V</sub>	Dimensión fractal de volumen
DE	Diámetro equivalente
desac	Fase de crecimiento de desacleración
est	Fase de crecimiento estacionario
exp	Fase de crecimiento exponencial
FS	Factor de forma
h	Altura del nivel de líquido
JPEG	Unión de Grupos de Expertos en Fotografía
K <sub>1</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>3</sub>	Constantes de proporcionalidad

L	Longitud característica, longitud del eje mayor
lag	Fase de crecimiento de preparación para la división celular
lineal	Fase de crecimiento lineal
log	Logaritmo en base 10
M	Molar
m	Pendiente de una línea de regresión
mue	Fase de muerte celular
n	Tamaño de muestra
P	Perímetro
p	Probabilidad
PF	Peso fresco (g/l)
PS	Peso seco (g/l)
Ps	Programa de cálculo de potencia y tamaño de muestra
r	Radio de un círculo
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
RGB	Canales de color de la imagen: rojo – verde - azul
rpm	Revoluciones por minuto
se	Error estándar
t <sub>d</sub>	Tiempo de duplicación (días)
V	Volumen
v.v.m	Volúmenes de aire por volumen de medio

W	Wattios
X, Y	Ejes X y Y
$\rho$	Densidad
$\pi$	Número PI (3,1416)
$\Delta D_{min}$	Diferencia mínima entre dimensiones fractales
$\varepsilon$	Potencia suministrada por el agitador por unidad de masa
$\lambda$	Escala de mezcla de Kolmogorov
$\nu$	Viscosidad cinemática
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento ( $\text{días}^{-1}$ )
$\mu\text{m}$	Micrómetros

## RESUMEN

La geometría fractal es una herramienta de análisis de reciente aplicación en la biotecnología que permite cuantificar la morfología de diversos tipos de agregados. No se encontraron reportes de la aplicación del análisis fractal en la caracterización morfológica de agregados de células vegetales en suspensión, por lo cual, este trabajo se encaminó en: la adecuación de una metodología de análisis de imágenes que permitiera medir las dimensiones fractales de agregados de células de *Beta vulgaris* crecidos en suspensión en matraces y biorreactor; la medición de las dimensiones fractales de perímetro ( $D_P$ ) y área ( $D_A$ ) durante el crecimiento de los agregados celulares y la determinación de relaciones entre la variación de las dimensiones fractales y los cambios de biomasa y área de los agregados celulares.

La adecuación de la metodología de análisis de imágenes consistió en la selección del microscopio para capturar las imágenes, la determinación del volumen y dilución de la muestra, la escala de observación, la edición de la imagen y el número de agregados analizados. Usando la anterior metodología se determinó que los agregados celulares de *Beta vulgaris* crecidos en matraces y en biorreactor tipo tanque agitado presentaron un comportamiento fractal, manifestado a través de las dimensiones fractales de perímetro ( $D_P$ ) y de área ( $D_A$ ). La dimensión fractal de perímetro osciló entre 1.24 - 1.314 en matraces y entre 1.204 - 1.284 en biorreactor, indicando que en general los agregados crecidos en matraces presentaron un perímetro más sinuoso que los del biorreactor. Por otro lado, la dimensión fractal de área cambió entre 1.692 - 1.797 en matraces y entre 1.691 - 1.738 en biorreactor, señalando que los agregados crecidos en el biorreactor fueron menos compactos y más ramificados que los obtenidos en matraces. Las diferencias encontradas en el tamaño y en las dimensiones fractales  $D_P$  y  $D_A$  entre los agregados crecidos en matraces y biorreactor podrían ser el reflejo de las diferentes condiciones de cultivo (principalmente esfuerzos cortantes) presentes en cada uno de estos sistemas.

Finalmente, se encontró que los cambios en las dimensiones fractales  $D_P$  y  $D_A$  estuvieron relacionados con la variación de la concentración de biomasa y el tamaño de los agregados durante su crecimiento en matraces y biorreactor.

## ABSTRACT

The fractal geometry is a new tool of analysis in biotechnology which permits quantifying the morphology of several kinds of aggregates. It did not find reports about the application of fractal analysis to characterize the morphology of plant cell aggregates, in consequence, this study was directed to: adapt a methodology of image analysis to measure the fractal dimensions of plant cell aggregates of *Beta vulgaris* which were grown in suspension in shake flask and bioreactor; to measure of the fractal dimension of perimeter ( $D_P$ ) and area ( $D_A$ ) of the aggregates during the growth, and to find relationships between changes in fractal dimensions and changes in biomass concentration and area of the cell aggregates.

The adaptation of the methodology of image analysis consisted of the selection of: the microscope to take the images, the volume and dilution of sample, the magnification level, the image edition and the number of aggregates to analyse. Using this methodology, it determined the *Beta vulgaris* aggregates grown in shake flask and stirred tank showed a fractal behaviour which was revealed through the fractal dimensions of perimeter ( $D_P$ ) and area ( $D_A$ ). The fractal dimension  $D_P$  ranged between 1.24 and 1.314 in shake flask, and between 1.204 and 1.284 in bioreactor; this indicates the aggregates grown in shake flash showed a more sinuous perimeter than those grown in bioreactor. On the other hand, the dimension fractal  $D_A$  changed between 1.692 and 1.797 in shake flash, and between 1.691 and 1.738 in bioreactor showing the aggregates grown in bioreactor was less compact and more branched than aggregates grown in shake flask. The differences that were found in size and fractal dimensions  $D_P$  and  $D_A$  between the aggregates grown in shake flask and bioreactor are the consequence of the different culture conditions (mainly shear stress) which were present in every system.

Finally, it found the changes in fractal dimensions  $D_P$  and  $D_A$  were related to the changes in the biomass concentration and the size of the aggregates during the growth in shake flask and bioreactor.

## 1. INTRODUCCIÓN

La geometría fractal es una herramienta de análisis de reciente aplicación en la biotecnología que permite el análisis y un mejor entendimiento de los objetos irregulares y los fenómenos caóticos (Chanona *et al.*, 2001). La principal característica de un objeto fractal es poseer una dimensión fraccionaria (dimensión fractal,  $D$ ) que permite cuantificar el grado de irregularidad de un contorno o de una superficie en una colección de objetos (Peleg, 1996; Yano, 1996).

Existe una gran variedad de métodos para determinar la dimensión fractal; un método utilizado para medir la dimensión fractal representativa de un conjunto de objetos que se encuentran como “islas” es el de las relaciones área-perímetro: la basada en el perímetro ( $D_P$ ) mide el grado de extensión en que el perímetro llena el plano (mientras  $D_P$  sea mayor a 1 el perímetro es más irregular y tortuoso) y la relación área-perímetro basada en el área ( $D_A$ ) cuantifica la proporción del plano que es llenado por un objeto (a medida que  $D_A$  es menor a 2 el cuerpo es más ramificado, menos compacto y llena en menor proporción el plano) (Kenkel y Walker, 1996).

La geometría fractal se aplica a diversas áreas del conocimiento (medicina, ingeniería, ecología, bioquímica, etc.) para caracterizar la morfología y textura de objetos, estudiar los cambios de estas propiedades por efecto de un proceso y modelar fenómenos (Kang *et al.*, 2000, da Motta *et al.*, 2001, Quevedo *et al.*, 2002). Dentro de las ciencias biológicas esta herramienta ha sido aplicada con éxito para el estudio de diversos tipos de agregados: proteínicos (Byrne *et al.*, 2002), alimenticios (Hagiwara *et al.*, 2002) y bacterianos (Guan *et al.*, 1998).

El concepto de dimensión fractal aún no se aplica en el estudio de los agregados de células vegetales en suspensión; en donde la formación de agregados es importante en los procesos de mezclado, transferencia de oxígeno y nutrientes, facilidad para la purificación de productos y con frecuencia está directamente relacionado con la productividad (McDonald *et al.*, 2001). Esto justifica el estudio de sus características morfológicas porque en ellas radica parte del comportamiento de los agregados, y aunque la morfología de agregados celulares se ha estudiado por medio de técnicas de tamizado y análisis de imágenes, la geometría fractal puede contribuir a complementar la caracterización de una manera más general (independiente del tamaño de los mismos). Adicionalmente, a través de la dimensión fractal se puede hacer seguimiento de los cambios morfológicos de los agregados celulares a medida que estos crecen o son sometidos a cambios en las condiciones del proceso (escalamiento, esfuerzos

cortantes, etc).

El uso de los números fractales ( $D_P$  y  $D_A$ ) puede ser importante para el estudio de agregados de células vegetales ya que permite traducir a valores numéricos la complejidad de la morfología de estos agregados, siendo ello relevante para estudiar de manera objetiva los efectos que tienen las condiciones de operación sobre el crecimiento y cambios morfológicos que sufren los cultivos celulares.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Geometría euclidiana

Hasta la década del 70, se utilizaba la geometría euclidiana como la única herramienta disponible para construir modelos del mundo, lo que exigía adecuar las formas de la naturaleza a geometrías sencillas: círculos, triángulos, rectángulos, conos o combinaciones entre ellas. Además, la mayoría de los modelos se construían suponiendo un comportamiento simétrico y ordenado de las formas y fenómenos de la naturaleza que en algunas ocasiones era una aproximación gruesa de la realidad (Kenkel y Walker, 1996). Esto no significa que los conceptos lisos y ordenados no funcionen, sino que, cuando el fenómeno no se puede describir de manera simple, es que algo dentro del fenómeno bajo estudio lo está llevando hacia otro punto de observación donde su naturaleza tiende hacia la complejidad o hacia el caos (Chanona *et al.*, 2001).

Un gran número de objetos en la naturaleza son irregulares o fragmentados, hasta un grado tal que la geometría euclidiana no puede describir sus formas (Rahman, 1997). En la naturaleza se encuentran numerosas ejemplos de estos objetos como las nubes, árboles, costas, agregados y superficies de membranas; y fenómenos como el movimiento browniano, las reacciones químicas y bioquímicas, la dispersión de contaminantes y la formación de agregados; cuyas geometrías y comportamientos están alejados de las formas ordenadas, regulares y simétricas que predicen los modelos basados en la geometría euclidiana; esto ha conducido a muchas de estas formas y fenómenos no se hayan podido explicar satisfactoriamente (Kang *et al.*, 2000) y en el peor de los casos no se hayan podido incorporar a alguna teoría por la falta de un marco de referencia geométrico apropiado (Lovejoy, 1982).

### 2.2 Geometría fractal

El estudio de la geometría de las formas irregulares se hizo en forma independiente de la geometría euclidiana. El primer trabajo en esta área fue el de Richardson sobre la cartografía de las costas y fronteras terrestres: él estableció que la distancia entre dos puntos de una línea no euclidiana era fuertemente dependiente de la longitud de la unidad de medida (Barletta y Barbosa-Cánovas, 1993) y de esta manera no era posible asignarle un único valor a la longitud de las costa o fronteras porque dependía de la escala de medición.

Fue hasta 1977 cuando Mandelbrot retomando y compilando los trabajos de pensadores y

científicos anteriores a su época sentó las bases de la geometría fractal como una nueva herramienta para el análisis de las formas y geometrías irregulares y de los fenómenos caóticos (Peleg, 1993). Mandelbrot acuñó el término fractal a partir del adjetivo latino *fractus* que significa “fragmentado” o “irregular”, al cual le corresponde el verbo *frangere* que significa “romper en pedazos” (Mandelbrot, 2003).

Un fractal se define matemáticamente como un conjunto cuya dimensión de Hausdorff-Besicovitch es estrictamente mayor que su dimensión topológica (Mandelbrot, 2003). Mandelbrot introdujo el término fractal para referirse específicamente a los fenómenos u objetos temporales o espaciales que son continuos pero no diferenciables y que exhiben correlaciones parciales sobre varias escalas (Burrough, 1981). A pesar de que en cada disciplina en donde se aplica la geometría fractal se han dado definiciones específicas al término fractal (Tang y Raper, 2002; Peleg, 1993; Foroutan-pour *et al.*, 1999; Hinojosa y Ortiz, 1998; Lovejoy, 1982), todas se pueden reducir a la dada inicialmente por Mandelbrot.

### 2.2.1 Propiedades de los fractales

Independientemente de la definición particular de fractal, éste se identifica por presentar cuatro características distintivas (Yano, 1996):

- En su aparente irregularidad presenta la regularidad de ser autosimilar independientemente de la escala de observación; es decir, que si se toma una parte del fractal y se amplía, el objeto resultante será morfológicamente semejante al objeto original. Esto se puede apreciar en la Figura 2.1 donde las fotos muestran una cabeza de brócoli, una rama y el brócoli completo, se puede ver que la morfología es la misma independiente de la escala de observación, a esta propiedad se le llama invarianza de escala o autosimilitud (Peleg, 1993).
- No tiene una longitud, área y volumen definidos porque esas mediciones van a tomar valores diferentes de acuerdo con la escala de observación.
- No se puede analizar de forma efectiva con el cálculo diferencial e integral, sólo se pueden hacer algunas predicciones lógicas a través de simulaciones en computador y modelos de redes.
- No tiene una dimensión entera como los objetos euclidianos (0, 1, 2 ó 3) y su complejidad se evalúa cuantitativamente a través de la dimensión fractal.

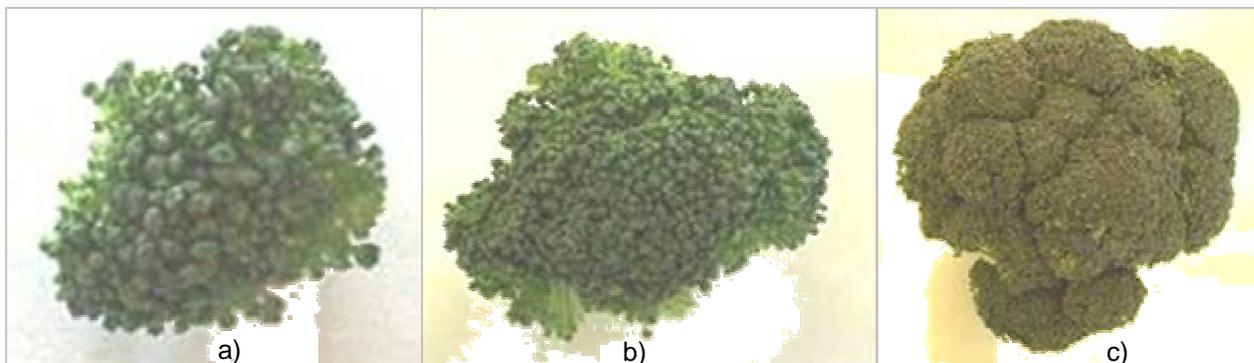


Figura 2.1 Autosimilitud en fractales. La cabeza del brócoli (a), una rama (b) y el cuerpo completo (c) muestran la misma morfología a pesar de las escalas diferentes.

### 2.2.2 Clases de fractales

Existen dos tipos de objetos fractales: los matemáticos o determinísticos y los naturales o aleatorios. Los primeros son los generados por ecuaciones y formas geométricas que son iteradas a diferentes escalas; y los segundos al igual que los fractales matemáticos, presentan la misma estructura a diferentes escalas de observación; pero se diferencian en que el intervalo de escalas de observación es limitado: en los fractales matemáticos la escala puede ser infinita, mientras que en los naturales la escala a la que se conserva su propiedad de autosimilitud es finita (Chanona *et al.*, 2001).

A partir de lo anterior, un fractal natural se define como una figura en la cual la autosimilitud sólo se mantiene en un intervalo dado de amplificación; adicionalmente, la evaluación de la similitud entre diferentes niveles de amplificación se hace estadísticamente, por lo cual es usual hablar de autosimilitud estadística o autoafinidad. (Barletta y Barbosa-Cánovas, 1993).

Un problema teórico aparece cuando un objeto o imagen que no tiene autosimilitud en alguna escala de longitud presenta una dimensión fractal aparente, esto no es problema ya que el mismo Mandelbrot acepta esta posibilidad: "...el lector puede estar convencido de que el concepto fractal esta casado con la autosimilitud; esto no es así, ni muchísimo menos..." (Mandelbrot, 2003). De esta manera, la dimensión fractal aparente puede servir como una medición de la irregularidad del objeto, pero no como evidencia de una verdadera geometría fractal (Peleg, 1993).

### 2.2.3 Dimensión fractal

Una característica de los fractales, y quizás la que mayor aplicación práctica tiene es la

dimensión fractal, ya que ésta es se usa como una medida de la irregularidad de muchos procesos físicos (Dong, 2000), permite cuantificar el grado de accidentalidad o tortuosidad de un objeto (Peleg, 1993), caracteriza la variación de las propiedades geométricas fractales con el tamaño y su magnitud está relacionada con la morfología.

En términos empíricos la dimensión es el número de variables independientes o los grados de libertad (Yano, 1996); geoméricamente es el número mínimo de coordenadas que se necesitan para especificar la posición de un punto en un objeto (Chanona *et al.*, 2001), así la dimensión de un punto es cero, de una línea es uno, de un área es dos y de un volumen tres, es decir:

$$P = K_1 * L^1 \text{ (Un perímetro)} \quad (2.1)$$

$$A = K_2 * L^2 \text{ (Un área)} \quad (2.2)$$

$$V = K_3 * L^3 \text{ (Un volumen)} \quad (2.3)$$

Donde L es la longitud característica del objeto. Si se duplica L (en términos prácticos se duplica la escala de observación o se duplica el tamaño de la imagen), el perímetro aumentará a razón de  $2^1$ , el área a  $2^2$  y el volumen a  $2^3$ , entonces las potencias 1, 2 y 3 de L son las dimensiones euclidianas del perímetro, el área y el volumen respectivamente. Se puede llegar a este mismo resultado a través de una relación de ley de potencia, la cual se construye graficando el log (P), el log(A) ó el log (V) vs log (L), o cualquier otra propiedad del objeto vs la longitud característica (escala del patrón de medición); obteniéndose líneas rectas como en la Figura 2.2 donde las pendientes corresponden a la dimensión fractal, que para objetos regulares toma el mismo valor de la dimensión euclidiana (Chanona *et al.*, 2001).

Existen objetos reales o construcciones matemáticas para los cuales la dimensión no es entera (la pendiente de la línea de la ley de potencia no es entera) como se ve en la Figura 2.2; estos objetos son fractales y para ellos al duplicar la longitud característica no se va a obtener un aumento de cuatro veces su área como se esperaría, pero se pueden obtener aumentos de 5 o 3.5 veces (Peleg, 1993).

La dimensión fractal se puede definir en términos lineales, planares o volumétricos obteniéndose las dimensiones fractales de perímetro, área y volumen (Chakraborti *et al.*, 2003). Así, la dimensión fractal de perímetro  $D_p$  mide el grado de irregularidad de contornos o fronteras: la dimensión de una línea suave como una parábola o un círculo es 1, pero si la línea

es bastante irregular o densamente convolucionada que puede llenar el área de dibujo, la dimensión fractal es cercana a 2 (Peleg, 1993).

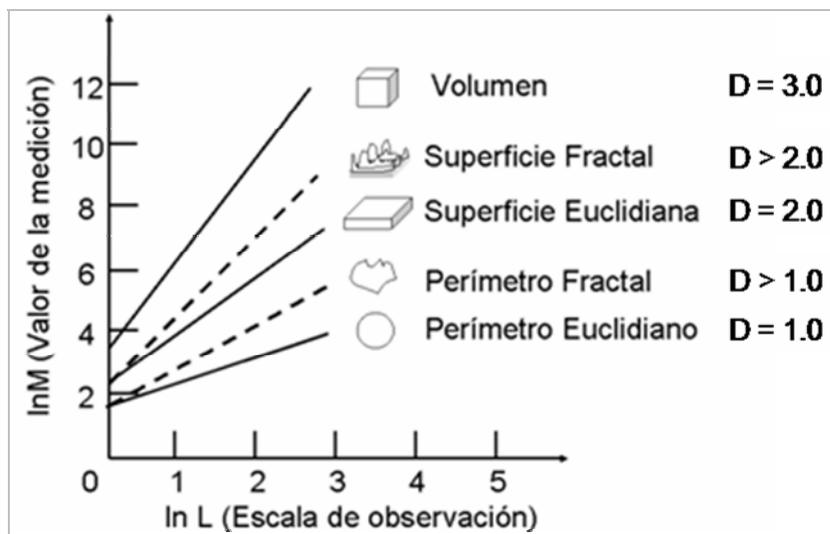


Figura 2.2 Gráfico de ley de potencia. (Adaptado de Chanona et al., 2001)

La dimensión fractal de área  $D_A$  se define por la relación de potencia entre el área proyectada y la longitud característica del objeto. Para el caso de una esfera maciza  $D_A = 2$ , pero para el caso de un objeto fractal que presenta menor compactación que la esfera y que tiene ramificaciones y espacios vacíos en su área va a tener una dimensión fractal  $D_A$  menor a 2.

Similarmente se puede definir la  $D_V$  a partir de una relación de potencia entre el volumen del agregado y su longitud característica (Chakraborti et al., 2000).

### 2.2.3.1 Métodos de medición de la dimensión fractal

La mayoría de los métodos para medir la dimensión fractal son empíricos y en general dependen de la disciplina de trabajo, los objetivos buscados y el tipo de datos analizados (Kenkel y Walker, 1996).

La mayoría de los métodos existentes para medir la dimensión fractal se basan en la construcción de un gráfico de ley de potencia entre dos variables. Algunos métodos usados con frecuencia para medir dimensiones fractales son: método de los divisores, método del conteo de cajas, relaciones área – perímetro, funciones de densidad de probabilidad, series temporales y espaciales, técnicas de dispersión de luz e isothermas de adsorción.

Para aplicar e interpretar de manera correcta cada uno de los métodos anteriores se deben

---

tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Cada método de medición de la dimensión fractal da un valor diferente para un mismo objeto (Rahman, 1997), ya que cada uno de estos se basa en propiedades diferentes.
- Para algunos objetos se obtienen dos líneas rectas en el gráfico de la ley de potencia las cuales tienen sus propios significados: la dimensión fractal obtenida a bajas escalas de observación se llama textura fractal y la obtenida a escalas mayores se llama estructura fractal (Shafiur, 1997; Barletta y Barbosa-Cánovas, 1993), y entonces se puede interpretar que existen diferentes geometrías fractales a diferentes escalas de longitud, en este caso ambas dimensiones fractales y los intervalos en que existen deben considerarse como características morfológicas (Peleg, 1993).
- Diferentes objetos fractales pueden mostrar la misma dimensión fractal y tener diferentes texturas.
- Para comparar dimensiones fractales obtenidas de un mismo objeto estas deben aplicarse sobre longitudes de escala comparables y deben ser asociadas con la misma propiedad del objeto.
- La aproximación fractal es un método esencialmente estadístico que necesita de un número significativo de mediciones independientes con el objetivo de obtener un valor medio de una cantidad (Fedorov *et al.*, 1993).

### 2.2.3.2 Método de las relaciones área-perímetro

El método de las relaciones área perímetro se usa para medir la dimensión fractal de uno o varios objetos que se encuentran distribuidos como islas, tal como se aprecia en la Figura 2.3, donde la parte a) muestra una serie de islas con contornos irregulares distribuidas en un área determinada de mar, en la parte b) se presentan agregados de células vegetales formando islas dentro del medio de cultivo.

Este método permite estudiar la estructura de formas planas o el área proyectada de objetos tridimensionales. Es un método que relaciona dos de las siguientes medidas geométricas: área, longitud característica y perímetro.

La dimensión fractal obtenida al relacionar el perímetro y el área o el perímetro y la longitud característica es de perímetro ( $D_P$ ) porque mide el grado de extensión en que el perímetro llena el plano (Kenkel y Walker, 1996).

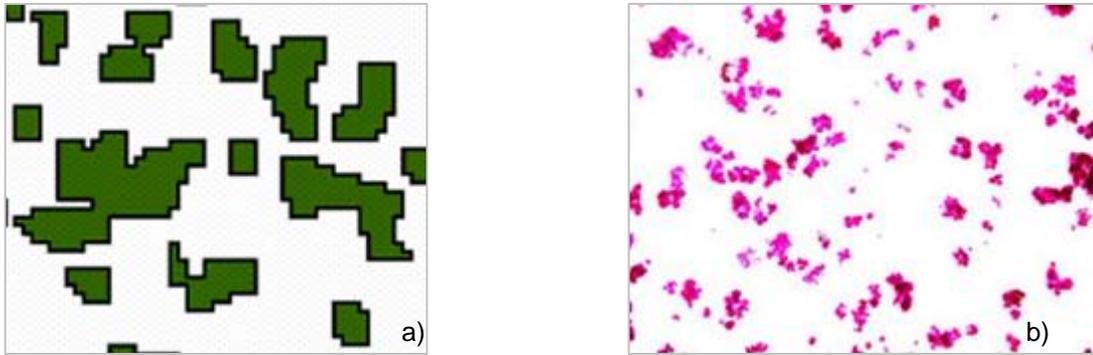


Figura 2.3 Método de las relaciones área- perímetro. a) Islas irregulares en el mar b) Agregados de células vegetales que se asemejan a islas en el medio de cultivo.

La geometría clásica afirma que para objetos lisos y regulares la relación entre el perímetro y el área es de la forma:

$$P \propto \sqrt{A} \quad (2.4)$$

Pero para un objeto fractal el perímetro es complejo y tiende a llenar el plano, por lo que la relación es de la forma:

$$P \propto \sqrt{A}^{D_p} \quad (2.5)$$

Donde  $D_p$  es la dimensión fractal de perímetro. De esta manera para un único objeto:

$$D_p = 2 \frac{\log P}{\log A} \quad (2.6)$$

Y para un conjunto de objetos,  $D_p$  será la pendiente de línea del gráfico de la ley de potencia entre  $\log P$  y  $\log A$ . En la Figura 2.4a se observa que si  $D_p = 1$ , el perímetro es liso y suave como una curva euclidiana y a medida que el perímetro se hace más irregular el valor de  $D_p$  tenderá hacia 2 como en la figura 2.4b.

La dimensión fractal obtenida por la relación entre el área y la longitud característica se llama dimensión fractal de área ( $D_A$ ) porque es una medida de la densidad de área de la figura plana; es decir, cuantifica la proporción del plano que es llenado por el objeto (Kenkel y Walker, 1996). Para un objeto plano como el de la Figura 2.5 es claro que al trazar círculos de diferentes radios respecto del centro del objeto estos encierran diferentes masas.

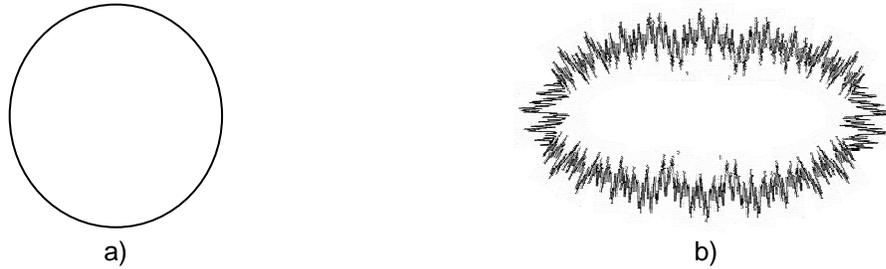


Figura 2.4 Interpretación de  $D_P$ . a) Perímetro regular y liso  $D_P = 1$  b) Perímetro irregular  $D_P = 1.75$

Así, la dimensión fractal  $D_A$  se define en términos de la relación entre el incremento del radio y el correspondiente incremento en la masa contenida dentro del círculo; en términos geométricos sería:

$$A \propto r^{D_A} \quad (2.7)$$

Donde  $A$  es el área del objeto contenida en un círculo de radio  $r$  (Chakraborti *et al.*, 2003). Para una esfera maciza su área proyectada será un círculo y  $D_A$  será igual a 2 (la dimensión euclidiana del área), pero como los objetos fractales son irregulares su área proyectada es más pequeña que el área circular basada en su máxima longitud (Bellouti *et al.*, 1997) y entonces  $D_A$  será menor a 2, de esta manera en la medida que el objeto llene menos el plano, el valor de  $D_A$  será menor a 2.

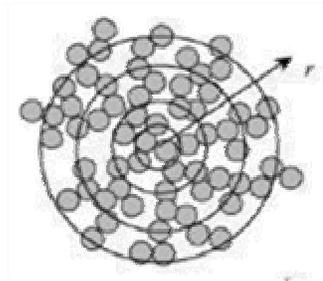


Figura 2.5 Significado geométrico de la dimensión fractal de área  $D_A$

Como los objetos fractales generalmente no son circulares, la ecuación 2.8 se puede escribir de la forma general:

$$A \propto L^{D_A} \quad (2.8)$$

Donde  $L$  es la longitud característica del objeto (Chakraborti *et al.*, 2003).

En la Figura 2.6a el objeto es compacto y la densidad no depende del radio, por lo cual  $D_A$  vale 2; por el contrario, para el objeto de la Figura 2.6b la densidad cambia respecto de la longitud característica ( $L$ ) y  $D_A$  es menor a 2.



Figura 2.6 Dimensión fractal de área a) Objeto euclidiano compacto  $D_A = 2$  y b) Objeto fractal  $D_A = 1.8$

El valor de  $D_A$  para un objeto o para un conjunto de objetos se obtiene de forma análoga a como se obtiene  $D_P$ .

Adicionalmente a su facilidad de cálculo, otras ventajas de trabajar con el método de las relaciones área-perímetro son: su utilidad para obtener la dimensión fractal de una familia de partículas, ya que permite obtener un valor promedio para la muestra; y es más sensitivo y expedito que el método de conteo de cajas (Bellouti *et al.*, 1997).

Esta versatilidad ha permitido su uso para calcular la dimensión fractal de líneas costeras de islas, de perímetros de pellets porosos y siluetas de partículas de polvos (Hagiwara *et al.*, 2002). En el Cuadro 2.1 se presentan algunas disciplinas científicas donde se ha aplicado este método.

Se debe tener en cuenta que las dimensiones fractales obtenidas por el método de las relaciones área - perímetro no miden la misma propiedad del objeto, por ejemplo, la relación área-perímetro basada en el perímetro (contorno) y la basada en el área (densidad) no necesariamente describen la misma propiedad física del agregado, en particular estas divergen en los extremos morfológicos de llenado del espacio y objetos difusos; esto porque el perímetro del objeto compacto que llena el espacio es uniforme y tiene una dimensión fractal cercana a 1, mientras que la dimensión fractal de densidad correspondiente se aproxima a 2 (la dimensión del plano). Al contrario, cuando un objeto se hace más poroso y menos denso, llena menos el espacio disponible, la dimensión fractal de densidad se reduce y el contorno del objeto es

ahora mas convolucionado e irregular por lo que la dimensión fractal de frontera aumenta (Bower *et al.*, 1997).

Cuadro 2.1 Aplicación del método de las relaciones área-perímetro en diversas áreas

Aplicación	Relación usada	Referencia
Medición de $D_P$ y $D_A$ de flóculos de <i>E. Coli</i>	P vs L , A vs L	Tang <i>et al.</i> , 2001
Comparación de la $D_A$ de dos familias de agregados microbianos	A vs L	Bellouti <i>et al.</i> , 1997
Determinación del carácter fractal de fracturas de metales	P vs A	Mandelbrot <i>et al.</i> , 1984
Comportamiento fractal de agregados de <i>Z. ramígera</i> y <i>S. cerevisae</i>	A vs L	Logan y Wilkinson, 1991
Estudio de la geometría de nubes y áreas lluviosas	P vs A	Lovejoy, 1982
Estructura de flóculos de aluminio	A vs L	Chakraborti <i>et al.</i> , 2000
Morfología de cristales de hielo en alimento congelado	A vs L	Hagiwara <i>et al.</i> , 2002

A (área), P (perímetro), L (longitud de eje mayor)

#### 2.2.4 Los fractales en las ciencias biológicas

Debido a que el estudio de los objetos fractales requiere el uso de computadores, los conceptos del análisis fractal sólo se difundieron con el auge de los microcomputadores (Peleg, 1993), pero hoy en día las herramientas de la geometría fractal son elementos insustituibles en el trabajo de físicos, químicos, biólogos, fisiólogos, economistas, porque les ha permitido reformular viejos problemas y darles soluciones novedosas.

La geometría fractal se ha usado para describir la distribución de estrellas en el universo, la ramificación alveolar de los pulmones, la frontera difusa de una nube, las fluctuaciones de los precios en el mercado y la frecuencia de repetición de palabras en un texto. También hay fractales en los depósitos y agregados electroquímicos, y en la trayectoria de las partículas de polvo suspendidas en el aire, fractales escondidos en la dinámica de crecimiento poblacional de colonias de bacterias y detrás del flujo turbulento (Talanquer, 2002).

En el área de las ciencias biológicas también se ha usado la geometría fractal como herramienta de análisis, en el Cuadro 2.2 se resumen algunos trabajos en ciencias biológicas donde se ha usado la geometría fractal.

*Cuadro 2.2 Uso de la geometría fractal en las ciencias biológicas*

Área	Aplicación	Referencia
Medicina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agregación de células rojas de sangre</li> <li>- Modelo para la invasión de cáncer</li> <li>- Desarrollo de células neuronales</li> </ul>	Kang <i>et al.</i> , 2000 Ahammer <i>et al.</i> , 2001 Bernard <i>et al.</i> , 2001
Alimentos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cambios morfológicos durante el secado de materiales biológicos</li> <li>- Microestructura de harinas alimenticias</li> <li>- Rugosidad de aglomerados de café instantáneo</li> <li>- Evaluación de la superficie de alimentos</li> </ul>	Alamilla-Beltrán <i>et al.</i> , 2005 Suzuki y Yano, 1990b Peleg y Normand, 1985 Quevedo <i>et al.</i> , 2002
Microbiología	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modelo de crecimiento de colonias de bacterias</li> <li>- Análisis de imágenes en la tecnología celular</li> </ul>	Cohen <i>et al.</i> , 1999 Thomas y Paul, 1996
Tratamiento de aguas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estructura de flóculos bacterianos</li> <li>- Caracterización automática de lodos activados</li> <li>- Estudio de la sedimentación de lodos activados</li> <li>- Estudio de la desecación de lodos activados</li> </ul>	Guan <i>et al.</i> , 1998 Da Motta <i>et al.</i> , 2001 Jin <i>et al.</i> , 2003 Jin <i>et al.</i> , 2004
Proteínas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agregación de proteínas globulares</li> <li>- Propiedades fractales de la superficie de proteínas</li> <li>- Efecto del corte sobre proteínas de trigo</li> <li>- Estructura de agregados de lisozima</li> </ul>	Le Bon <i>et al.</i> , 1999 Fedorov <i>et al.</i> , 1993 Byrne <i>et al.</i> , 2002 Fadda y Lairez, 2002
Cultivo células vegetales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modelo de crecimiento de callos de zanahoria</li> </ul>	Yokota <i>et al.</i> , 1999

### 2.2.5 Agregados y fractales

La formación de agregados es un fenómeno importante en procesos biológicos y de ingeniería tales como la precipitación y separación de proteínas (Byrne *et al.*, 2002), la formación de aglomerados en procesos fermentativos y en el cultivo de células vegetales (Hulst *et al.*, 1989; Logan y Wilkinson, 1991), la precipitación de glóbulos rojos (Kang *et al.*, 2000), la precipitación y remoción de lodos activados en el tratamiento de aguas residuales (Huang, 1994; Araya-Kroff *et al.*, 2004) y la precipitación de partículas coloidales (Puertas *et al.*, 2001).

---

Huang (1994) define un agregado como una estructura difusa, suelta, irregular y porosa que se forma a partir de partículas individuales suspendidas en el medio, Byrne *et al.* (2002) lo define como un objeto con un centro denso rodeado por capas progresivamente menos compactas y menos fuertes hacia el exterior mostrando una disminución en la densidad proporcional a la distancia al centro; aunque estas definiciones no se ajustan completamente a los agregados biológicos éstos presentan las características generales de un agregado.

Las propiedades estructurales y morfológicas de un agregado son importantes para seleccionar, diseñar, operar y controlar un proceso (Tang *et al.*, 2001; Mas y Ghommidh, 2001). Por ejemplo, Guan *et al.* (1998) encontraron que existe una fuerte dependencia entre la estructura de los agregados bacterianos y los procesos de sedimentación y filtración en una planta de tratamiento de aguas residuales; Huang (1994) concluyó que propiedades como la densidad, la velocidad de sedimentación, la permeabilidad y la firmeza de un agregado dependen de su estructura. Otros estudios concluyen que la composición del tamaño de los agregados está relacionada con la productividad en cultivos de células vegetales (Trejo-Tapia *et al.*, 2003); y que la rugosidad superficial del agregado afecta el ambiente hidrodinámico de la interfase líquido-superficie y el área disponible para los procesos de intercambio y reacción (Bellouti *et al.*, 1997).

Es difícil describir la estructura de agregados en términos de forma, tamaño y/o densidad por su forma irregular (Tang *et al.*, 2001), además las técnicas existentes para caracterizar agregados son laboriosas, imprecisas y consumen tiempo (Araya-Kroff *et al.*, 2004). Esto ha llevado a recurrir a la geometría fractal para realizar estudios morfométricos de diversos agregados; de esta manera la geometría fractal ha servido para describir la superficie tortuosa de agregados grandes, irregulares y porosos que no se definen bien con la geometría euclidiana (Chakraborti *et al.*, 2000). La dimensión fractal de un agregado está relacionada con el empaquetamiento de las partículas que forman el agregado y va a reflejar el factor de empaquetamiento del mismo (Tang y Raper, 2002), o en otras palabras, como lo propone Huang (1994), la dimensión fractal mide la efectividad de las partículas primarias para llenar el espacio métrico como una función del tamaño del agregado.

Se ha demostrado que agregados de diferentes sustancias presentan naturaleza fractal (Tang y Raper, 2002; Huang, 1994; Chakraborti *et al.*, 2003), a estos agregados se les llama agregados fractales los cuales se caracterizan por ser objetos sólidos en los cuales la densidad decrece con la distancia radial desde el origen (Byrne *et al.*, 2002):

$$\rho(r) \propto r^{D-3} \quad (2.9)$$

Donde  $\rho$  es la densidad del objeto,  $r$  el radio y  $D$  es la dimensión fractal del agregado, que puede corresponder a  $D_A$  si la densidad es de área o  $D_V$  si es volumétrica. La dimensión fractal  $D_V$  de un agregado varía entre 1 y 3, donde 3 corresponde a una estructura esférica sólida (Tang y Raper, 2002), agregados compactos tienen dimensiones fractales  $D_V$  entre 2.3 y 2.5, y agregados poco firmes tienen valores en el intervalo de 1.7 a 1.8 (Guan *et al.*, 1998); así entre más grande sea la dimensión fractal la estructura del agregado es más uniforme (Huang, 1994), mientras que estructuras porosas y ramificadas tienen valores menores a 3 (Byrne *et al.*, 2002).

Si se trabaja con el área proyectada del agregado, el valor de  $D_A$  será 2 cuando el agregado es regular y compacto, a la vez que para agregados ramificados y porosos el valor será inferior a 2. Adicionalmente se puede caracterizar el contorno de los agregados a través de  $D_P$  la cual se incrementa con la irregularidad de la frontera del agregado.

De esta manera al analizar los cambios en la dimensión fractal de los agregados se puede estudiar el efecto de las condiciones del proceso sobre su estructura y estabilidad: Byrne *et al.* (2002) determinaron que los agregados de proteína de trigo sujetos a altas velocidades de corte fueron más pequeños, más compactos y más resistentes al rompimiento por turbulencia, correspondiendo a una dimensión fractal arriba de 2.7; Huang (1994) trabajando con sedimentos naturales encontró que la formación y las propiedades fractales de un agregado se deben a los mecanismos de formación del agregado y que para algunas condiciones de proceso se obtienen agregados que no son fractales mientras que en otras sí.

El estudio de los agregados fractales también ha servido para caracterizar, controlar y optimizar procesos donde la formación de agregados es un factor importante (Guan *et al.*, 1998; Da Motta *et al.*, 2001). Las propiedades de agregados celulares se han estudiado en el cultivo de células vegetales en suspensión (McDonald *et al.*, 2001; Pépin *et al.*, 1999) aunque no se han realizado estudios al respecto usando análisis fractal.

A través de simulaciones computacionales y pruebas experimentales se ha mostrado que la dimensión fractal de un agregado es determinada por el mecanismo de crecimiento del mismo (Tang *et al.*, 2001; Logan y Wilkinson, 1991) y por las condiciones ambientales en las cuales se han formado (Bellouti *et al.*, 1997); lo que sugiere el estudio del fenómeno de agregación para poder predecir el estado final del agregado. Se han propuesto modelos para simular la agregación de partículas, pero la mayoría de estos consideran a los agregados como esferas

impermeables obteniéndose aproximaciones ideales, lo que ha motivado el uso de la geometría fractal para obtener modelos menos restrictivos e ideales del fenómeno de agregación.

Varias investigaciones han mostrado que algunos agregados biológicos tienen características fractales (Tang y Raper, 2002; Da Motta *et al.*, 2001; Bellouti *et al.*, 1997): pero no se ha encontrado una universalidad en la dimensión fractal tal como se presenta en agregados coloidales formados por movimiento browniano (coloides inorgánicos), porque la naturaleza fractal de agregados biológicos es función del tipo de organismo y las condiciones del mezclado usados para generarlo (Logan y Wilkinson, 1991). Por otro lado, los agregados biológicos se pueden formar por colisión de partículas a través de diferentes formas, como corte laminar, turbulento y sedimentación diferencial. Además, los mecanismos de unión biológicos son mas complejos, por ejemplo, los agregados bacterianos son formados por puentes entre apéndices como pili, fimbriae, cilios, filamentos, vellos y pelos; y los agregados de levaduras por enlaces químicos entre iones del ambiente y los grupos carboxilo presentes en la superficie celular. Adicionalmente, la eficiencia de unión de los microorganismos no es constante durante el crecimiento ya que la mayoría de células crecidas en cultivos por lotes sólo se agregan al final de la etapa exponencial. Finalmente en el caso de células con mitosis aparecen partículas adicionales (células hijas) dentro y fuera del agregado.

Todo lo anterior crea condiciones alejadas de las presentes en los agregados inorgánicos estudiados con la geometría fractal (Logan y Wilkinson, 1991); lo que exige el ajuste de los modelos ya existentes o proponer nuevos que permitan una mejor representación de la agregación de partículas biológicas.

### **2.3 Análisis de imágenes**

Con el vertiginoso avance de las computadoras y el desarrollo de software especializados el análisis de imágenes se ha convertido en una herramienta útil para la investigación en diversos campos. Esta técnica se está usando en disciplinas como la medicina, meteorología, ecología, física, química, ingeniería y biotecnología; porque presenta varias ventajas respecto de los métodos comunes de medición: es una técnica no destructiva, permite hacer mediciones *in situ* (Da Motta *et al.*, 2001), no es complicada ya que es puede ser automatizada (Vega, 2003), se obtiene información diversa a partir de la toma de una sola medida (Miyanaga *et al.*, 2000), es relativamente económica ya que no consume reactivos, es susceptible de reducir al mínimo la intervención humana y puede dar información sobre la textura y morfología de superficies (Mas y Ghommidh, 2001).

El análisis digital de imágenes involucra las siguientes tareas (González y Woods, 2004):

- Adquisición de la imagen. En esta parte se produce la imagen digital; ésta puede ser construida usando una cámara CCD (video o digital) o un escáner; frecuentemente la captura de la imagen se hace con la ayuda de un sistema de amplificación (microscopio).
- Preprocesamiento. Esta es la etapa anterior a la tarea principal de procesamiento; aquí se realizan algunas acciones básicas que permitan dejar la imagen en condiciones favorables para el trabajo subsiguiente. Las acciones más comunes son la mejora de contraste, eliminación de ruido o identificación de regiones.
- Segmentación. En esta etapa se extrae la parte de la imagen que contiene la información de interés.
- Representación y descripción. Hace referencia a la extracción de las características particulares que permite diferenciar los objetos entre sí. Generalmente se buscan curvas, agujeros y esquinas que permitan hacer la distinción entre los objetos.
- Reconocimiento e interpretación. En esta etapa se asignan etiquetas a los objetos basados en sus descriptores (a partir de la etapa anterior) y se asignan significado a las etiquetas.

En una forma simplificada estas tareas se pueden clasificar en tres acciones básicas: adquisición de la imagen, procesamiento o edición de la imagen y medición de la imagen (Thomas y Paul, 1996).

En un proceso de análisis de imágenes no siempre se realizan todas las actividades mencionadas anteriormente; por ello no existe una metodología universal de análisis de imágenes, al contrario, es necesario desarrollar metodologías de análisis de imágenes propias para el problema particular que se esté estudiando.

En la biotecnología se han desarrollado sistemas de análisis de imágenes basados en microcomputadoras para estudiar imágenes de especímenes con propósitos de clasificación, caracterización, seguimiento, control y cuantificación. Estos sistemas generalmente usan videocámaras o cámaras digitales para capturar imágenes en forma directa o a través de un microscopio. La imagen es digitalizada y posteriormente procesada para poder hacer las mediciones sobre las características de interés.

Al desarrollar un sistema de análisis de imágenes se debe tener en cuenta algunas limitaciones

y aproximaciones que tiene esta metodología: el análisis se basa en aproximaciones geométricas al considerar los objetos como esferas o elipsoides (Pépin *et al.*, 1999; McDonald *et al.*, 2001), los parámetros de textura obtenidos por análisis de imágenes generalmente no se usan como descriptores cuantitativos (Mas y Ghommidh, 2001), en un proceso donde exista formación de agregados, estos pueden impedir el proceso de análisis de imágenes (Miyana *et al.*, 2000) y en sistemas con alta densidad de biomasa se requiere una dilución de la muestra para evitar sobreposición de las partículas (Mas y Ghommidh, 2001). En el Cuadro 2.3 se presentan algunas aplicaciones del análisis de imágenes en la biotecnología.

Cuadro 2.3 Aplicación del análisis de imágenes en la biotecnología

Área	Aplicación	Referencia
Cultivo de células vegetales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cuantificación de la heterogeneidad de cultivos de células de fresa y cuantificación de antocianinas.</li> <li>- Relación entre el tamaño de agregados y la producción de flavonoides.</li> <li>- Análisis morfológico de cultivos en suspensión de <i>Solanum chrysotrichum</i>.</li> <li>- Caracterización morfológica y producción de metabolitos secundarios en raíces de <i>B. vulgaris</i>.</li> </ul>	<p>Miyana <i>et al.</i>, 2000a y 2000b</p> <p>Pépin <i>et al.</i>, 1999</p> <p>Trejo-Tapia <i>et al.</i>, 2003</p> <p>Berzin <i>et al.</i>, 2000</p>
Cultivo de levaduras	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Medición del tamaño de agregados de levaduras en un proceso de fermentación</li> </ul>	Mas y Ghommidh, 2001
Tratamiento de aguas residuales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caracterización morfológica de lodos activados</li> </ul>	Da Motta <i>et al.</i> , 2001
Cultivo de células animales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Medición del número de células, viabilidad y morfología de células de hibridoma</li> </ul>	Tucker <i>et al.</i> , 1994

### 2.3.1 Análisis de imágenes y geometría fractal

El análisis de imágenes ha sido una herramienta fundamental para el desarrollo y aplicación de varios métodos de medición de la dimensión fractal (conteo de cajas, área-perímetro, compás y modelos de superficie entre otros); a la vez que la geometría fractal ha servido para complementar la información obtenida por un análisis de imágenes, permitiendo realizar una cuantificación más real de la morfología de una gran variedad de objetos en la naturaleza.

Los valores de dimensión fractal de un objeto pueden depender de las características del sistema de análisis de imágenes aplicado (nivel de amplificación usado durante la captura de la imagen, nivel de procesamiento de la imagen, etc.), por lo que es importante estandarizar el sistema de análisis de imágenes utilizado y aplicarlo sin ninguna variación durante todo el estudio. Al respecto, Tanaka *et al.* (1999) encontraron que los efectos del posicionamiento (traslación y rotación) de las imágenes y las diferencias en los operadores sobre la dimensión fractal no son significativos (diferencias menores al 5%); pero si encontraron que la dimensión fractal es mayor en imágenes más pequeñas, reflejando la variación local de las características del objeto. Por otro lado, Ahammer *et al.* (2001) estudiaron el efecto del procesamiento de la imagen sobre la dimensión fractal, demostrando que cada procesamiento causa una disminución en la dimensión fractal media de la población de objetos.

Algunos trabajos en donde se ha usado el análisis de imágenes para medir la dimensión fractal, y el nivel de procesamiento que se aplicó a las imágenes se encuentran en el Cuadro 2.4.

*Cuadro 2.4 Uso del análisis de imágenes para el cálculo de la dimensión fractal.*

<b>Trabajo</b>	<b>Procesamiento de la imagen</b>	<b>D<sub>F</sub></b>	<b>Referencia</b>
Agregación de hemáties coloidales	Dilatación, erosión, binarización	1.45-1.62	Ruprecht y Thieme, 2000
Estudio de modelos de fractura de superficies	Definición de bordes	1.13-1.50	Tanaka <i>et al.</i> , 1999
Estudio del proceso de desgaste y roce sobre la rugosidad de partículas de alimentos	Escala de grises	1.07-1.12	Barletta y Barbosa-Cánovas, 1993
Aplicación del método de conteo de cajas	Binarización, cropping	1.26-1.50	Foroutan-pour <i>et al.</i> , 1999
Caracterización e agregados en un campo de corte	Escala de grises	1.31-1.42	Bower <i>et al.</i> , 1997
Agregación coloidal en dos dimensiones	Agudización, binarización	1.41-1.63	Robinson y Earnshaw, 1992
Efecto de la composición mineral sobre la estructura del flóculo		1.37-1.97	Gorczyca y Ganczarczyk, 1996

## 2.4 Cultivo de células vegetales en suspensión

El cultivo de células vegetales es una técnica frecuentemente usada para producir ingredientes alimenticios, sabores, colorantes y fármacos que normalmente se obtienen de las plantas. Esta metodología tiene la ventaja de asegurar un suministro estable y constante de estos químicos, ya que la obtención directa de las plantas es afectada por el clima, enfermedades, madurez de la planta y otros factores fisiológicos y ambientales (Miyanaga *et al.*, 2000b).

Dentro del cultivo de células vegetales esta el cultivo de células en suspensión, que consiste de agregados de células dispersas y en crecimiento en un medio líquido en movimiento (Chawla, 2000). El cultivo en suspensión se inicia transfiriendo porciones de callos (desdiferenciados y friables) al medio líquido que esta continuamente agitado. El establecimiento de un cultivo en suspensión depende de la friabilidad del callo, por lo que existe una amplia variedad de explantes, composición de medios de cultivo y suplementos vitamínicos y hormonales para inducir unos callos de buena calidad. Una vez que se transfieren los callos para el cultivo en suspensión, se debe mantener un medio de cultivo adecuado que asegure un buen crecimiento. Además de lo anterior, se debe suministrar una agitación adecuada, que garantice la integridad y viabilidad celular y un adecuado intercambio gaseoso, evitando la sedimentación de los agregados.

Un tipo común de cultivo de células en suspensión es por lotes, en donde las células crecen en un volumen fijo de medio de cultivo. La células en suspensión incrementan su biomasa debido a la división celular, y éstas van a crecer hasta que se presente un factor limitante en el medio. Las células en el cultivo van a presentar cinco etapas en un ciclo de crecimiento:

- Fase lag (las células se preparan para dividirse).
- Fase exponencial (la velocidad de división celular es máxima).
- Fase lineal (disminuye la velocidad de división celular pero se incrementa la velocidad de expansión celular).
- Fase de desaceleración (disminuyen las velocidades de división y elongación celular).
- Fase estacionaria (el número y tamaño de las células permanece constante).

Para estudiar la cinética de crecimiento celular del cultivo en suspensión y determinar sus parámetros cinéticos se hace un seguimiento a través del tiempo del número de células, peso fresco de las células y peso seco. Otras características importantes que se estudian en un

cultivo de células en suspensión son las referentes a los agregados (su tamaño, forma y distribución de tamaños).

El fenómeno de agregación es común en las células vegetales debido a la interrupción de la división celular, aunque la secreción de polisacáridos extracelulares (especialmente en las últimas etapas del crecimiento) puede contribuir al aumento de la agregación. Estos agregados pueden incluir hasta 100 células, tener diámetros milimétricos y tender a sedimentar. Los patrones de formación de agregados varían dependiendo de la línea celular, la edad del cultivo y las condiciones de cultivo (Kieran *et al.*, 1997); por eso, cualquier cambio en los patrones de distribución de agregados puede indicar variaciones del cultivo como respuesta a factores ambientales. Por otro lado, la distribución de tamaño de los agregados juega un papel importante en el mezclado, transferencia de oxígeno y nutrientes, facilidad para la purificación de productos y con frecuencia está directamente relacionada con la productividad (McDonald *et al.*, 2001).

Los patrones de distribución de agregados comúnmente se estudian por técnicas de tamizado (Kebler *et al.*, 1999), contador Coulter (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999), citometría de flujo (Pépin *et al.*, 1999) y por análisis de imágenes (Trejo-Tapia *et al.*, 2001).

#### **2.4.1 Efectos del estrés hidrodinámico sobre los cultivos de células vegetales en suspensión**

Durante el cultivo de células vegetales en suspensión en un biorreactor se debe asegurar el suministro apropiado de los nutrientes necesarios para el crecimiento celular y el control de la concentración adecuada de componentes gaseosos. Para satisfacer lo anterior, se puede incrementar la velocidad de agitación, lo que exige que las células toleren el aumento de las fuerzas hidrodinámicas (Kleber *et al.*, 1999). Debido a que las células vegetales tienen una pared celular rígida, un volumen celular grande comparado con los microorganismos y tienden a agregarse, estas son intrínsecamente sensitivas al estrés hidrodinámico (Meijer *et al.*, 1994). De esta manera, el estrés generado en tanques agitados puede ser un factor que limita el crecimiento de las células vegetales, ya que este se asocia con daño (letal o subletal) en las células y su magnitud depende del estrés hidrodinámico y la especie y línea celular. Algunas características de los cultivos celulares que se ven afectadas por un alto estrés hidrodinámico son: alteración del tamaño de agregados, liberación de componentes intracelulares, variación de la velocidad específica de respiración, pérdida de viabilidad, decrecimiento en la producción de biomasa y cambios en la composición de la pared celular (Rodríguez-Monroy y Galindo,

1999).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar el efecto del estrés hidrodinámico sobre el daño celular (Doran, 1995):

- Interacción entre células y remolinos turbulentos.
- Colisión entre células, colisión de células con el agitador, y colisión de células con las partes estacionarias del recipiente.
- Generación de fuerzas de corte en las capas límite y estelas cerca de objetos sólidos en el reactor especialmente en el agitador.
- Generación de fuerzas de corte cuando las burbujas se elevan en el líquido y
- Rompimiento de las burbujas en la superficie del líquido.

Varios estudios han tratado de cuantificar el efecto de cada uno de los factores sobre el daño celular, pero el modelamiento de estos fenómenos no es fácil (Caulet *et al.*, 1996). Uno de los aspectos en donde se ha avanzado al respecto es en las interacciones célula-remolinos turbulentos, los cuales tienen el mayor efecto sobre el daño celular cuando no hay presencia de burbujas de gas en el líquido.

Las interacciones célula-remolinos turbulentos están relacionadas con la energía cinética del flujo turbulento dirigidas en regiones de flujo rotacional llamados remolinos. La acción del agitador forma continuamente grandes remolinos los cuales se rompen en otros más pequeños que a la vez producen otros de menor tamaño. El tamaño de remolinos más pequeños en donde la energía se disipa como calor está dado aproximadamente por la escala de mezcla de Kolmogorov, o tamaño de los remolinos más pequeños:

$$\lambda = \left( \frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (2.11)$$

Donde  $\lambda$  es la dimensión característica de los remolinos pequeños,  $\nu$  es la viscosidad cinemática y  $\varepsilon$  es la potencia suministrada por el agitador por unidad de masa (Doran, 1995). Se ha encontrado que el detrimento celular empieza cuando la escala de Kolmogorov para el tamaño de los remolinos cae por debajo de  $2/3 - 1/2$  el diámetro de las células o el agregado. De esta manera al calcular la escala de mezcla de Kolmogorov y compararla con el tamaño de los agregados se pueden determinar si el efecto de los remolinos es el responsable principal del

daño celular y de las diferencias encontradas en los cultivos celulares crecidos bajo diferentes ambientes hidrodinámicos.

Por otro lado, si el líquido contiene células sensibles al corte y hay un suministro de aire, el mecanismo de daño es diferente: el más asociado es el estallamiento de las burbujas en la superficie, ya que el rompimiento de la delgada película de burbuja y el rápido flujo desde el borde de la burbuja hacia el líquido genera altas fuerzas de corte capaces de dañar ciertos tipos de células. Bajo estas circunstancias el efecto de las interacciones célula – remolino no es el más importante, el daño de corte puede ocurrir en un nivel más bajo de velocidad de agitación debido a los efectos de corte asociados con las burbujas (Doran, 1995).

#### **2.4.2 Generalidades del cultivo vegetal de *Beta vulgaris***

*Beta vulgaris* es una hortaliza de interés comercial por la producción de colorantes naturales para las industrias de alimentos, fármacos y cosmética; de sus células se obtienen las betalainas que son pigmentos nitrogenados solubles en agua acumulados en las vacuolas. Existen dos clases de betalainas: Las betacianinas (bc) de color rojo y Las betaxantinas (bx) de color amarillo; estos pigmentos sólo se encuentran en ciertas especies de las *Caryophyllales* y algunos hongos como los *Amanita*, *Hygrophorus* e *Hygrocybe* (Jiménez y Gutiérrez, 1999).

Las células de *B. vulgaris* son de forma esférica con diámetros alrededor de 20  $\mu\text{m}$ . Los cultivos en suspensión producen agregados con tamaños entre 200 y 500  $\mu\text{m}$  independiente de la escala de cultivo (matraces o biorreactor) (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999).

Con el objetivo de producir betalainas se ha estudiado el cultivo de células en suspensión de *B. vulgaris* en matraces (Trejo-Tapia *et al.*, 1999), en reactor tipo tanque agitado (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999), en reactor tipo *air lift* (Juarez *et al.*, 2002) entre otros. Estos resultados han mostrado que estos cultivos pueden crecer en diferentes clases de reactores, y que presentan una mayor resistencia al estrés hidrodinámico que otros cultivos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la morfología celular es importante para evaluar los efectos hidrodinámicos de los diferentes ambientes de crecimiento que experimentan los agregados de células vegetales crecidos en suspensión, tales como matraces y biorreactor; pues en éste último se presentan altas fuerzas de corte que tienen efectos apreciables sobre la morfología celular. El análisis de imágenes es una herramienta útil para la caracterización morfológica de agregados celulares. Esta técnica tiene las limitantes de suponer que los agregados tienen formas regulares (esferas, elipsoides) y no generar elementos descriptivos de rugosidad o grado de compactación de los agregados. El uso del análisis fractal complementa la información obtenida por el análisis de imágenes, permite cuantificar el grado de irregularidad y compactación de los agregados, y puede servir como elemento cuantitativo para comparar los efectos de los esfuerzos de corte presentes en un biorreactor con los generados en un matraz. La medición de la dimensión fractal a partir de imágenes digitales exige la estandarización de la metodología de análisis de imágenes, y en el caso de cultivos de células vegetales en donde no se han encontrado reportes de aplicación de esta herramienta; es importante realizar trabajos para estandarizar una metodología de análisis de imágenes que permita medir las dimensiones fractales de perímetro ( $D_P$ ) y área ( $D_A$ ) de los agregados celulares, a partir de las cuales se pueda evaluar cuantitativamente los efectos de los esfuerzos cortantes sobre los agregados durante su crecimiento en matraces y biorreactor tipo tanque agitado.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Aplicar el análisis fractal de imágenes para caracterizar la morfología de agregados de células de *Beta vulgaris* en suspensión durante su crecimiento en matraz y biorreactor tipo tanque agitado.

### 4.2 Objetivos específicos

- Adaptar una metodología de análisis de imágenes que permita medir la dimensión fractal de agregados de células de *Beta vulgaris* en suspensión.
- Evaluar el carácter fractal de los agregados de células de *Beta vulgaris* suspensión durante su crecimiento en matraz y en biorreactor a través de las dimensiones fractales  $D_P$  y  $D_A$ .
- Establecer posibles relaciones entre la concentración de biomasa y otras variables morfológicas, con los cambios en las dimensiones fractales de los agregados.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología fue desarrollada de acuerdo al diagrama de la Figura 5.1. El plan de trabajo

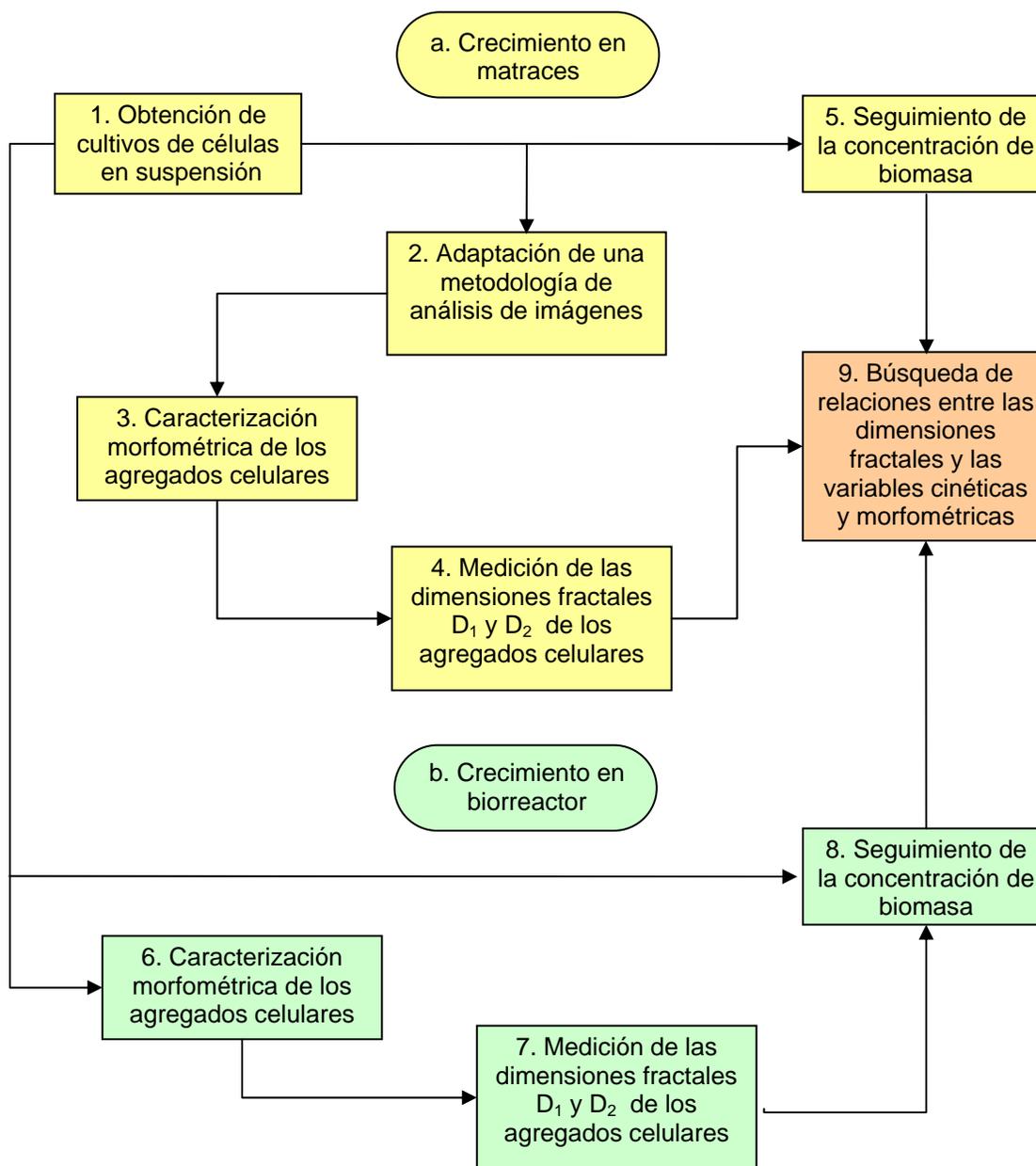


Figura 5.1 Diagrama de flujo del plan de trabajo experimental

experimental se estructuró en dos etapas: la primera que se desarrolló creciendo los agregados en matraces y la segunda creciéndolos en biorreactor.

La primera etapa consistió en partir del cultivo en suspensión en matraces para adecuar una metodología de análisis de imágenes que permitiera cuantificar la morfología de los agregados celulares, a partir de la cual se obtendrían las dimensiones fractales de los agregados. Se hizo el seguimiento de la concentración de biomasa y de las dimensiones fractales; finalmente los resultados obtenidos se analizaron para encontrar relaciones entre los cambios en la concentración de biomasa, las variables morfométricas y las dimensiones fractales.

En la segunda etapa se utilizó la metodología de análisis de imágenes adaptada a nivel de matraces para hacer el seguimiento de las variables morfométricas, de la concentración de biomasa y de las dimensiones fractales de los agregados celulares durante el crecimiento de las células en el biorreactor; también se analizaron los resultados obtenidos para encontrar relaciones entre las variables estudiadas.

## **5.1 Materiales**

### **5.1.1 Material biológico**

El modelo biológico utilizado fue *Beta vulgaris* variedad Crossbar's Egyptian (fenotipo rojo) obtenidos por Ontiveros (1994).

### **5.1.2 Medio de cultivo**

El medio de cultivo utilizado fue el medio basal Gamborg's B<sub>5</sub> (3.2 g/l) (Gamborg *et al.*, 1968) adicionado con sacarosa (30 g/l), cinetina (0.01 mg/l) y ácido 2,4-diclorofonoxiacético (0.1 mg/l). El pH del medio se ajustó a 5.5 con NaOH 1 M antes de la esterilización.

## **5.2 Cultivos celulares**

### **5.2.1 Cultivos celulares en matraces**

Para la cinética de crecimiento, la determinación de las características morfométricas y las dimensiones fractales a nivel de matraces, se utilizaron matraces de 125 ml con 30 ml de medio de cultivo sembrados con 0.7 g de peso fresco de células (de un inóculo de 7 días de edad). Las condiciones de incubación fueron: temperatura de 25± 2°C, fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad (32 W/m<sup>2</sup> de intensidad luminosa) y agitación orbital de 100 rpm.

Los cultivos fueron incubados durante 18 días, cada 3 días se extrajeron 3 matraces para realizar los análisis correspondientes.

## 5.2.2 Cultivos celulares en biorreactor

Para la cinética de crecimiento, la determinación de las características morfométricas y las dimensiones fractales a nivel de reactor, se utilizó un biorreactor de 2 l (Applikon) con una tapa en acero inoxidable con multipuerto (Figura 5.2). La agitación fue proporcionada por un agitador de turbina (relación de diámetro del impulsor a diámetro del tanque igual a 0.46) de cuatro hojas (46 mm); el impulsor se posicionó a 26 mm arriba del fondo del tanque. Las condiciones de operación fueron las mismas usadas por Rodríguez-Monroy y Galindo (1999): velocidad de agitación de 400 rpm (velocidad en la punta del impulsor de  $95.3 \text{ cm s}^{-1}$ ), aireación de 0.1 v.v.m. provista por un anillo difusor ubicado debajo de la turbina; temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad ( $32 \text{ W/m}^2$  de intensidad luminosa).

El recipiente del biorreactor (con un contenido de 1.3 l) se inoculó con 30 g de células frescas tamizadas de un cultivo en suspensión de 7 días, crecido en un medio  $B_5$  en matraces agitados de 500 ml.

El cultivo fue incubado durante 18 días, cada 3 días se extrajeron 30 ml de muestra para realizar los análisis correspondientes.



Figura 5.2 Biorreactor de 2 l usado para el cultivo de *B. vulgaris*

## 5.3 Equipos

### 5.3.1 Equipo de análisis de imágenes

Para la toma y análisis de imágenes se utilizó un equipo compuesto por un microscopio óptico de contraste de fases (I) (Nikon Alphaphot-2 YS2, objetivos 4X-100X) acoplado a una cámara de video DAGE-MTI DC-330 (II) conectada a una computadora (III) (Figura 5.3a).



Figura 5.3 Equipo de análisis de imágenes. a) Microscopio óptico b) Estereoscopio

También se usó un microscopio estereoscópico (I) (Nikon SMZ1500, objetivo 1X y zoom de 0.75X a 11.25X) que tenía acoplada una cámara CCD digital (II) de 4.2 Megapíxeles de resolución (Nikon, Coolpix 4500) (Figura 5.3b).

Para el análisis de las imágenes se usó el programa SigmaScan Pro 5.0. Los resultados fueron procesados en Excel XP y en Sigma Plot 7.0.

## 5.4 Métodos

### 5.4.1 Captura de las imágenes

Los cultivos en suspensión obtenidos como se indicó en las secciones 5.2.1 y 5.2.2 se usaron para el análisis morfológico por análisis de imágenes y la medición de las dimensiones fractales.

De cada muestra del cultivo en suspensión se tomó el volumen de células para realizar una preparación en fresco, se diluyó de acuerdo a la relación encontrada en el presente estudio. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio óptico o con el microscopio estereoscópico según el caso. Para cada microscopio se seleccionaron los objetivos establecidos en este trabajo. Los agregados fueron enfocados y en el microscopio óptico se realizó un ajuste de iluminación entre el contraste y el brillo para obtener un contraste adecuado entre los agregados y el fondo. En el estereoscopio se ajustó la apertura del diafragma y los espejos condensadores de luz para obtener el mayor contraste posible.

Se tomaron las fotografías necesarias para obtener el número de agregados representativos de la muestra.

Con el microscopio óptico las imágenes fueron capturadas en color con la cámara de video (RGB de 24 bits) y almacenadas en el disco duro de la computadora; con el estereoscopio las imágenes se capturaron en color (RGB de 24 bits) con la cámara digital y se almacenaron en una memoria compact Flash para luego ser llevadas al disco duro de la computadora. El tamaño de las imágenes fue de 1280\*960 píxeles y se almacenaron el formato JPEG.

#### 5.4.2 Medición de las características morfométricas

Con el software de análisis de imágenes Sigma Scan Pro 5.0, se abrió el archivo de la imagen y se realizó calibración de la misma de acuerdo al objetivo con el que se tomó la imagen, de esta manera las mediciones se obtuvieron en mm y mm<sup>2</sup>. Posteriormente la imagen fue procesada (conversión a escala de grises, optimización del contraste, binarización) según el caso, y a cada agregado de la imagen se le midió las siguientes propiedades: Perímetro (P), área (A), longitud del eje mayor (L: distancia entre los puntos más alejados del objeto), diámetro equivalente (DE: diámetro de un círculo que tiene la misma área del objeto medido) y factor de forma (SF: medida del grado en que un objeto tiene forma circular, para valores cercanos a 1 la forma tiende a ser circular y en la medida en que el factor de forma de acerca a 0 la forma tiende a ser alargada y plana). El factor de forma se define como:

$$SF = \frac{4\pi A}{P^2} \quad (5.1)$$

#### 5.4.3 Medición de las dimensiones fractales

##### 5.4.3.1 Dimensión fractal de perímetro $D_p$

Para calcular  $D_p$  se graficó el logaritmo del área (A) contra en logaritmo del perímetro (P) de cada agregado; a la línea recta obtenida se le determinó la pendiente, con la cual se obtuvo  $D_p$  de acuerdo a la expresión:

$$D_p = 2 * m \quad (5.2)$$

Donde m es la pendiente de la línea recta en el gráfico de lnA contra lnP.

##### 5.4.3.2 Dimensión fractal de área $D_A$

La dimensión fractal de área  $D_A$  se obtuvo al graficar el logaritmo del área (A) contra el logaritmo de la longitud del eje mayor (L) de cada agregado; a la línea recta obtenida se le determinó la pendiente la cual corresponde a  $D_A$ .

#### **5.4.4 Adecuación de una metodología de análisis de imágenes**

Como no se encontró información sobre la aplicación del análisis fractal al cultivo de células vegetales en suspensión, fue necesario adecuar una metodología de análisis de imágenes, la cual es la base para el cálculo de la dimensión fractal. La adecuación de la metodología se hizo respecto a: selección del equipo, adaptación del equipo, dilución de la muestra, volumen de la muestra, escala de observación, procesamiento de la imagen y número de agregados.

##### **5.4.4.1 Selección del equipo**

Se eligió entre el microscopio óptico y el microscopio estereoscópico para la toma de las imágenes durante el presente estudio. Los criterios de selección fueron:

- La flexibilidad del microscopio en cuanto a los aumentos disponibles para tomar las imágenes.
- La calidad y similitud de las imágenes al ser comparadas con algunas encontradas en la literatura usadas para determinar las dimensiones fractales a través de los mismos métodos del presente trabajo.

Para realizar esta evaluación se tomó una muestra de matraces agitados 0.4 ml de de un cultivo de 7 días de edad, se diluyó con 1 ml de medio acondicionado y se tomó 1 imagen con el aumento más bajo de cada microscopio (4X para el óptico y 0.75X para el estereoscópico); a cada imagen se le midió el número de objetos y el tamaño (área) de los mismos. Se hizo la evaluación correspondiente de acuerdo a los criterios mencionados y se seleccionó el microscopio adecuado.

##### **5.4.4.2 Adaptación del equipo**

Cada uno de los microscopios se adaptó para garantizar imágenes de calidad adecuada que permitieran medir la dimensión fractal. El microscopio óptico no necesitó adaptaciones; pero el estereoscopio no poseía sistema de platina y portamuestra que permitiera realizar un barrido ordenado sobre la muestra y una toma sistemática de las imágenes (se usaba una caja de Petri para colocar la muestra y tomar las imágenes), lo que exigió diseñar y construir un dispositivo que cumpliera esta función. El diseño se hizo de acuerdo al área de trabajo disponible y a las características geométricas del estereoscopio.

##### **5.4.4.3 Dilución de la muestra**

Se determinó en nivel de dilución adecuado para las muestras ya que estas no se lograron

trabajar directamente porque a bajas concentraciones de biomasa algunos agregados grandes quedaron expuestos al aire (alterando su morfología por deshidratación), y a altas concentraciones de biomasa se formaron conglomerados de agregados que impidieron la adquisición de imágenes de agregados individuales; además fue necesario garantizar la estabilidad morfológica de los agregados ante choques osmóticos, por lo que estos se mantuvieron en un medio con las mismas características a las del medio de cultivo de donde provenían; por ello las muestras se diluyeron con medio de cultivo acondicionado (isotónico) el cual evitó los choques osmóticos.

Para la elección del volumen apropiado de dilución se aplicaron los siguientes criterios:

- Un volumen de dilución que garantizara una distribución homogénea de los agregados en el área de análisis y que permitiera que los agregados quedaran sumergidos en el medio en forma individual.
- Un volumen cuya altura del líquido en el portamuestra garantizará la formación de una monocapa de agregados, de tal forma que no hubiesen varias capas y se presentara sobreposición de los agregados ocasionando errores en la adquisición de las imágenes.

Muestras de 0.4 ml de cultivos de 12 días (matraces) se diluyeron con los siguientes volúmenes de medio acondicionado: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml.

Se tomó una imagen por cada dilución y se le midió el porcentaje del área total ocupada por los todos los agregados (los aglomerados y los individuales) y el porcentaje del área ocupada por los agregados individuales; simultáneamente se calculó la altura del líquido en la celda dividiendo el volumen empleado entre el área del campo de observación, esta altura permitió evaluar la formación de capas de agregados.

#### **5.4.4.4 Volumen de muestra**

Se seleccionó un volumen de muestra mínimo que optimizara el área de trabajo, y que no fuese tan alto que ocasionara altas densidades superficiales de agregados que impidiera la captura de imágenes de agregados individuales. Se aplicaron los criterios de Pepin *et al.* (1995) y Pepin *et al.* (1999) quienes recomiendan que el volumen de la muestra debe ser el más bajo posible para permitir la captura del máximo número de objetos, o aquél en el que los agregados útiles para analizar ocupen entre un 10 y un 15% del área total del campo de observación.

De un cultivo de 12 días (matraces) se tomaron los siguientes volúmenes de muestra: 0.4, 0.5,

0.7 y 1 ml, se diluyeron con el volumen de dilución hallado en 5.4.4.3 y se tomaron seis imágenes de cada uno de ellos. A cada una de las imágenes se les determinó el número de agregados individuales (que no estuvieran sobrepuestos con otros), el área útil ocupada por los agregados individuales y la relación entre el área útil ocupada por los agregados y el área total de la imagen medida en porcentaje.

#### **5.4.4.5 Escala de observación**

Un aspecto importante en la determinación de la dimensión fractal es encontrar el intervalo de escalas de observación en el cual se encuentra un comportamiento fractal, porque los fractales naturales tienen un intervalo finito de escalas de observación donde se comportan como fractales (Peleg, 1993).

La evaluación de la escala de observación (objetivos de observación) se hizo de acuerdo al microscopio seleccionado. Se evaluaron dos objetivos (4X y 10X) en el microscopio óptico, y cuatro valores de zoom (0.75X, 1X, 2X y 4X) en el estereoscopio.

Se tomó el volumen de muestra (cultivo de 7 días en matraces) establecido en la sección 5.4.4.4, se diluyó con el volumen determinado en 5.4.4.3 y se tomaron cinco imágenes con cada objetivo; a cada imagen se determinó el número de agregados, las características morfométricas,  $D_P$  y  $D_A$ .

Se eligió la escala de observación que presentó un mayor número de agregados por imagen y que a la vez mostró un comportamiento fractal en los agregados (valores de  $D_P$  mayores a 1 y  $D_A$  menores a 2).

#### **5.4.4.6 Procesamiento de la imagen**

Se estudió la influencia del procesamiento de la imagen sobre los valores de las dimensiones fractales, ya que en la medida en que se modifique la imagen a través de algoritmos de procesamiento o edición, las dimensiones fractales pueden disminuir (Ahammer *et al.*, 2001).

Se tomó el volumen de muestra (cultivo de 7 días en matraces) establecido anteriormente, se diluyó con el volumen de medio de cultivo hallado en 5.4.4.3, y se tomaron las imágenes necesarias para capturar 250 agregados. Posteriormente se determinó  $D_P$  y  $D_A$  a las imágenes originales, a las convertidas a escala de grises, a las convertidas a escala de grises con optimización del contraste y a las binarizadas (el umbral se fijó de forma automática por el programa de análisis de imágenes). Se evaluó si se presentaron cambios en las dimensiones

fractales al procesar las imágenes.

#### **5.4.4.7 Número de agregados**

El establecimiento del tamaño de muestra adecuado para determinar dimensiones fractales es importante, porque los fractales naturales muestran características fractales sólo en un sentido estadístico, lo que exige analizar un número de agregados que sea representativo estadísticamente (Dathe *et al.*, 2001).

Por lo anterior, se estudió el efecto del número de agregados sobre las dimensiones fractales. Bajo las condiciones establecidas anteriormente, se tomaron imágenes de cultivos de 7 días y se determinaron  $D_P$  y  $D_A$  para tamaños de muestras de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 1000 agregados; se estableció el número de agregados para el cual los valores de las dimensiones fractales tendían hacia un valor constante y el error estándar era menor o igual a 0.01.

#### **5.4.5 Seguimiento de la concentración de biomasa**

El seguimiento de la concentración de biomasa se hizo a través de la determinación del peso fresco (PF) y del peso seco (PS) de los agregados.

Se filtraron al vacío 3 ml de caldo de cultivo en un papel filtro puesto previamente a peso constante (Whatman No. 1). Para la determinación del peso fresco, la muestra obtenida se pesó y por diferencia de pesos se obtuvo la biomasa fresca. Para la determinación del peso seco, la muestra filtrada se secó a 70 °C en una estufa durante 24 horas y el contenido de biomasa como peso seco se obtuvo por diferencia de pesos.

### **5.5 Análisis estadístico**

Se utilizó el programa de estadística Sigma Stat V2.3 para:

- Realizar la estadística descriptiva de los datos obtenidos.
- Evaluar la normalidad de las distribuciones de área, perímetros y longitudes del eje mayor de los agregados, en el cálculo de las dimensiones fractales.
- Calcular el coeficiente de regresión y evaluar la significancia de las líneas de regresión en los gráficos de la ley de potencia.

Para todos los casos el nivel de significancia  $\alpha$  fue de 0.05.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Adecuación de una metodología de análisis de imágenes

#### 6.1.1 Selección del equipo

En el Cuadro 6.1 se presentan los niveles de aumento disponibles en los microscopios evaluados para la toma de imágenes.

Cuadro 6.1 Niveles de aumento de los microscopios evaluados para la toma de las imágenes

Microscopio	Aumento mínimo	Aumento máximo	Aumentos disponibles
Estereoscópico	7.5X	112.5X	12
Óptico	40X	1000X	4

El Cuadro muestra un intervalo amplio de niveles de aumento en cada microscopio, aunque hubo una mayor flexibilidad con el estereoscopio ya que tenía 12 niveles de aumento respecto de los 4 del óptico. Adicionalmente, el mínimo nivel de aumento del microscopio óptico fue 5 veces mayor al del estereoscópico siendo adecuado este último para observar un agregado completo por su tamaño mayor de 0.05 mm.

La Figura 6.1 muestra imágenes de agregados de células en suspensión de *Beta vulgaris* tomadas con los niveles de aumento mas bajos de cada microscopio; comparativamente la Figura 6.2 presenta una imagen de agregados de látex que se usó para determinar la dimensión fractal  $D_A$  durante el proceso de agregación (Chakraborti et al., 2003).

En el Cuadro 6.2 se observa que el número y el tamaño de los objetos de la imagen tomada con el estereoscopio fueron similares con los de la imagen de la literatura. El parecido en el tamaño de los objetos indicó que el nivel de aumento usado para capturar la imagen de las partículas de látex fue cercano al de 0.75X del estereoscopio; además la semejanza con el número de objetos señala que el campo de observación fue cercano en los dos casos.

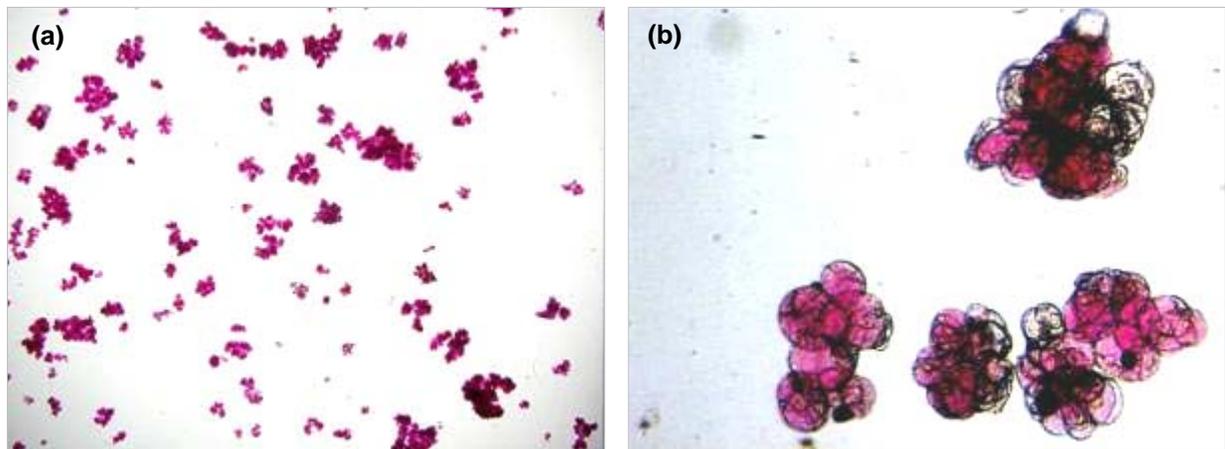


Figura 6.1 Imágenes de agregados de *Beta vulgaris* tomadas con los niveles de aumento mas bajos de cada microscopio. a) Microscopio estereoscópico (7.5X) y b) Microscopio óptico (40X).

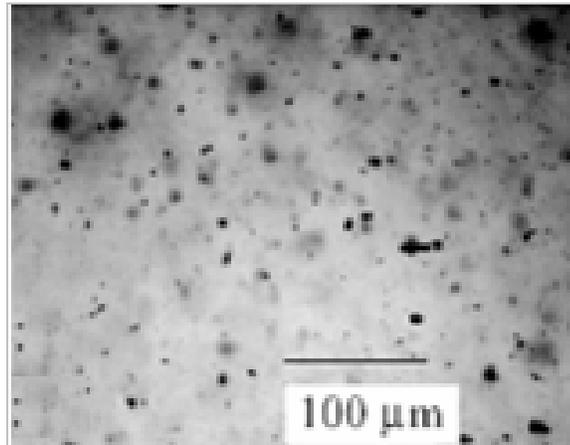


Figura 6.2 Imagen de partículas de látex usada para calcular la dimensión fractal  $D_A$  durante un proceso de agregación (Tomada de Chakraborti et al., 2003)

Cuadro 6.2 Propiedades de las imágenes tomadas con los microscopios evaluados

Imagen	Número objetos	Tamaño de los objetos (píxeles)*
Estereoscopio	117	$4.05 \pm 0.19$
Microscopio	4	$9.74 \pm 0.2$
Literatura	87	$3.71 \pm 0.17$

\*Los valores representan la media del logaritmo del área  $\pm$  el error estándar

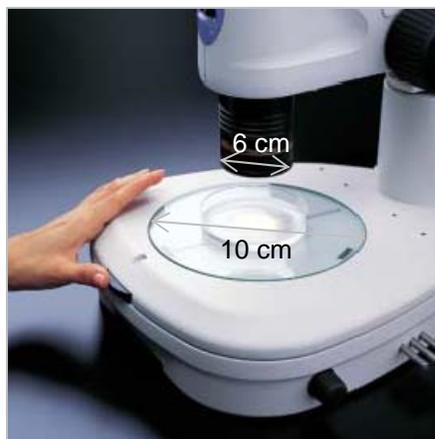
Por el contrario, la imagen del microscopio óptico tuvo un nivel de aumento mayor que la imagen de partículas de látex, que se vio reflejado en los mayores tamaños de las partículas y

en el menor número de objetos por campo.

Estas comparaciones permitieron seleccionar el microscopio estereoscópico como equipo de trabajo, porque las imágenes obtenidas con éste presentaron características similares a las de imágenes encontradas en la literatura, y por la mayor flexibilidad en el número de niveles de aumento disponibles.

### 6.1.2 Adecuación del equipo

La Figura 6.3 muestra la geometría y el área de trabajo con base a la cual se diseñó la platina y la celda portamuestra.



*Figura 6.3 Área de trabajo del microscopio estereoscópico*

El área de trabajo del estereoscopio era una placa circular de vidrio de 18 cm de diámetro ( $254,5 \text{ cm}^2$  de área). La platina diseñada tiene 15 cm de ancho por 17 cm de largo (área total de  $255 \text{ cm}^2$ ) (Figura 6.4a). El material de construcción en su mayoría fue aluminio por su bajo peso y su fácil manejo; se usaron perfiles de aluminio para los soportes, lámina de aluminio para las superficies superiores (2 mm de espesor) y rieles de lámina para el sistema de desplazamiento.

Para la construcción de la celda portamuestra se tuvo en cuenta el diámetro del objetivo del estereoscopio (6 cm) que proporciona un campo visual máximo de  $6.6 \text{ cm}^2$  (Nikon, 2002) (Figura 6.3). La celda es de forma cuadrada con 5 cm de lado ( $25 \text{ cm}^2$ ) y 1 cm de profundidad (Figura 6.4b), está construida con vidrio normal y acrílico. Se pueden barrer cuatro campos al abarcar el área total de la celda portamuestra. La Figura 6.4c muestra el sistema de platina y caja portamuestras acoplado, las flechas sobre la imagen indican que el movimiento se puede hacer en los ejes X y Y.

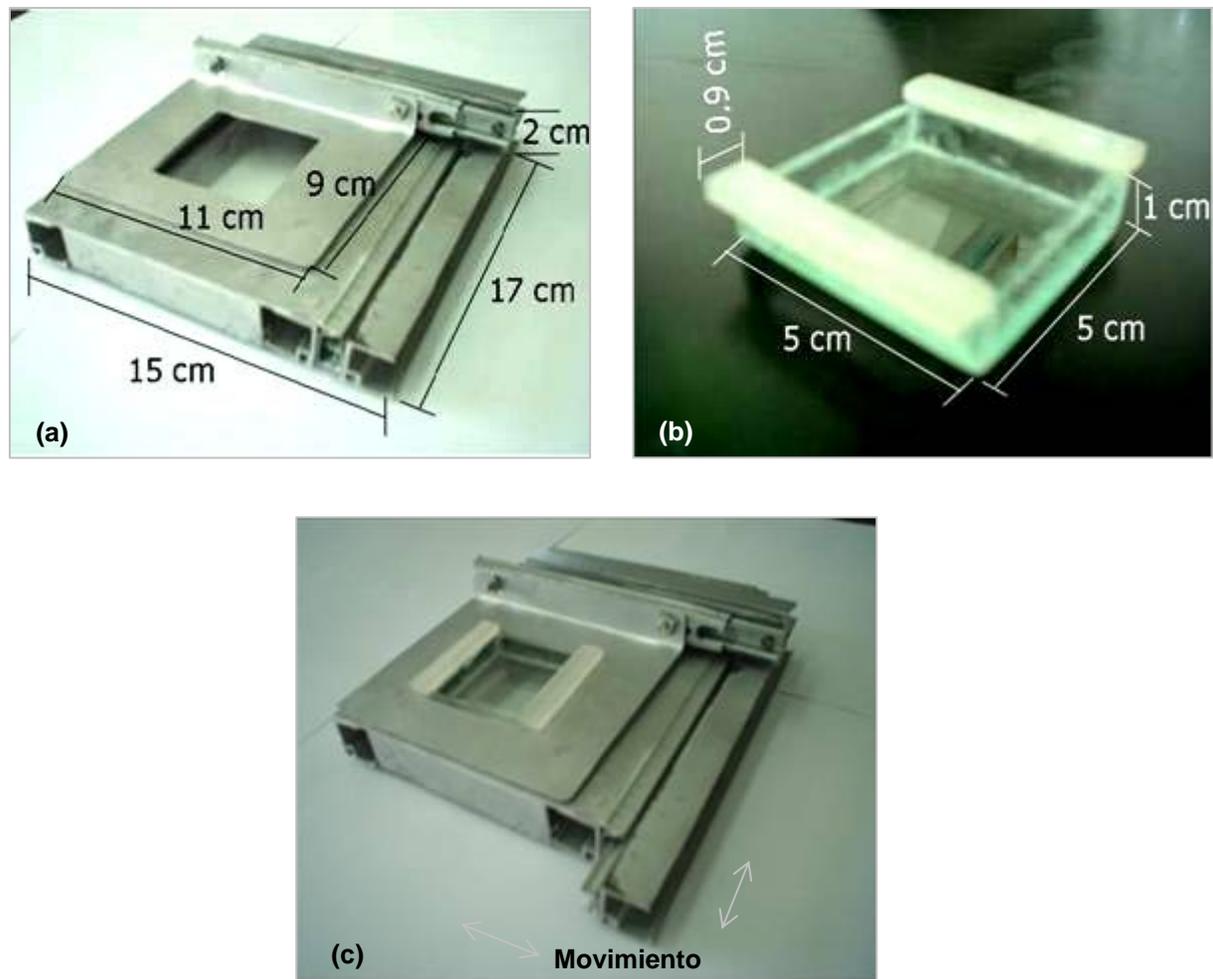


Figura 6.4 Sistema de platina y portamuestras diseñados para tomar imágenes en el microscopio estereoscópico (a) Platina (b) celda portamuestra (c) Sistema platina-portamuestra.

### 6.1.3 Dilución de la muestra

En las Figuras 6.5 a 6.7 se observa el efecto del nivel de dilución sobre las imágenes de los agregados: para la situación en la cual no hubo dilución el número de agregados individuales representó el 0,7 % del área total, lo que indica que la mayoría de la biomasa (el 19,5%) estaba agrupada formando conglomerados de agregados que impedían la medición individual (Figura 6.7); algo similar ocurrió con 1 ml de dilución en cuanto a los agregados individuales, pero en este caso aumentó el área ocupada por la biomasa (33,3%) señalando que inicialmente había una sobreposición de los agregados por la alta concentración presente (agregados de 12 días que estaban llegando al estado estacionario), que al adicionarles medio de cultivo estos se separaron cubriendo un área mayor; para 2 ml de dilución aumentó el número de agregados

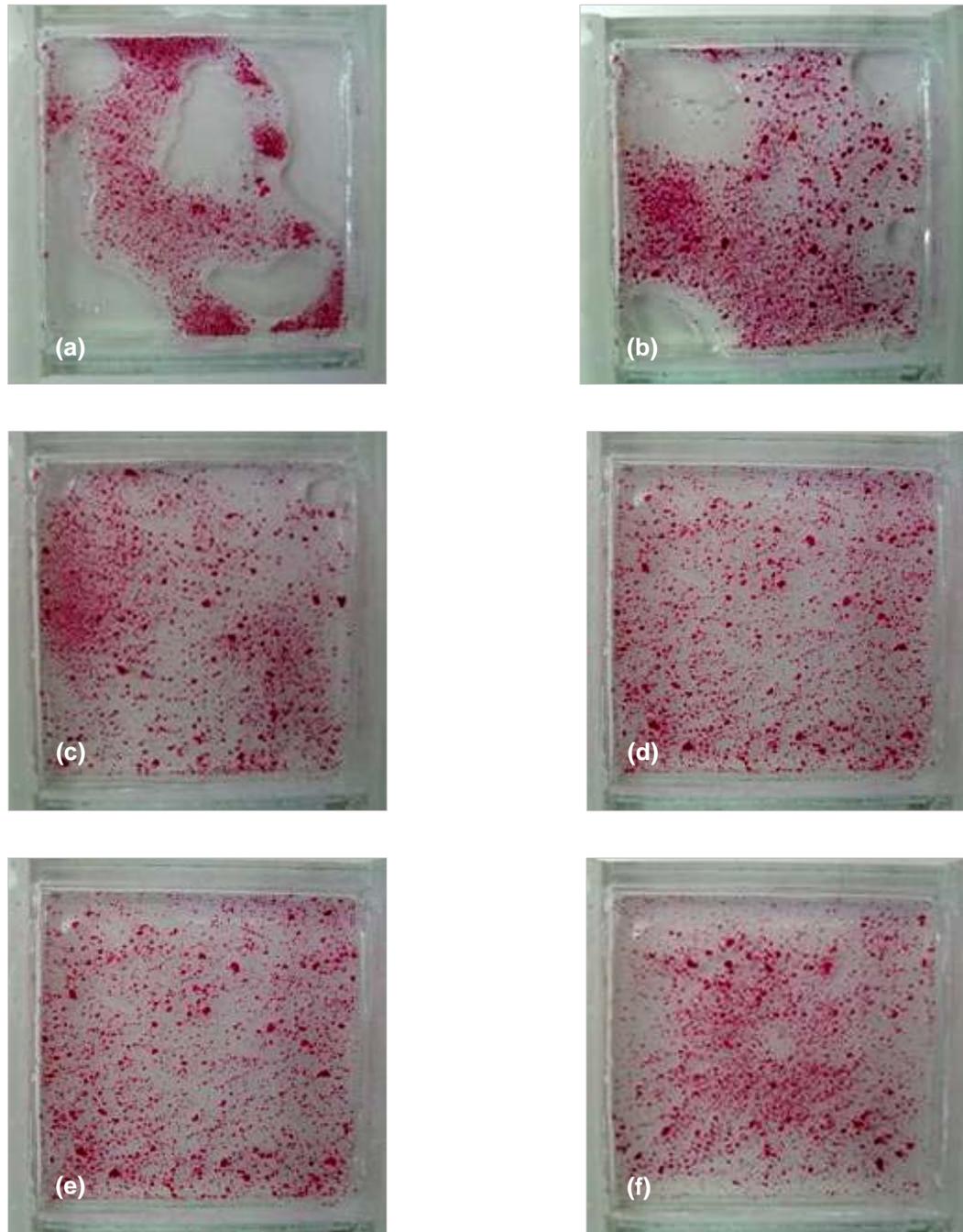


Figura 6.5 Efecto del nivel de dilución sobre las imágenes de los agregados de *Beta vulgaris* (Vista superior). a) 0 ml b) 1 ml c) 2 ml d) 3 ml e) 4 ml f) 5 ml

individuales (1,1 %) y hubo una mejor distribución de la biomasa en la celda portamuestra ya que se incrementó el área ocupada (42,7%). Usando 3 y 4 ml de dilución se obtuvo la mayor cantidad de agregados individuales (1,8 %), pero disminuyó el área cubierta por los agregados posiblemente por un nuevo sobreposicionamiento entre ellos.

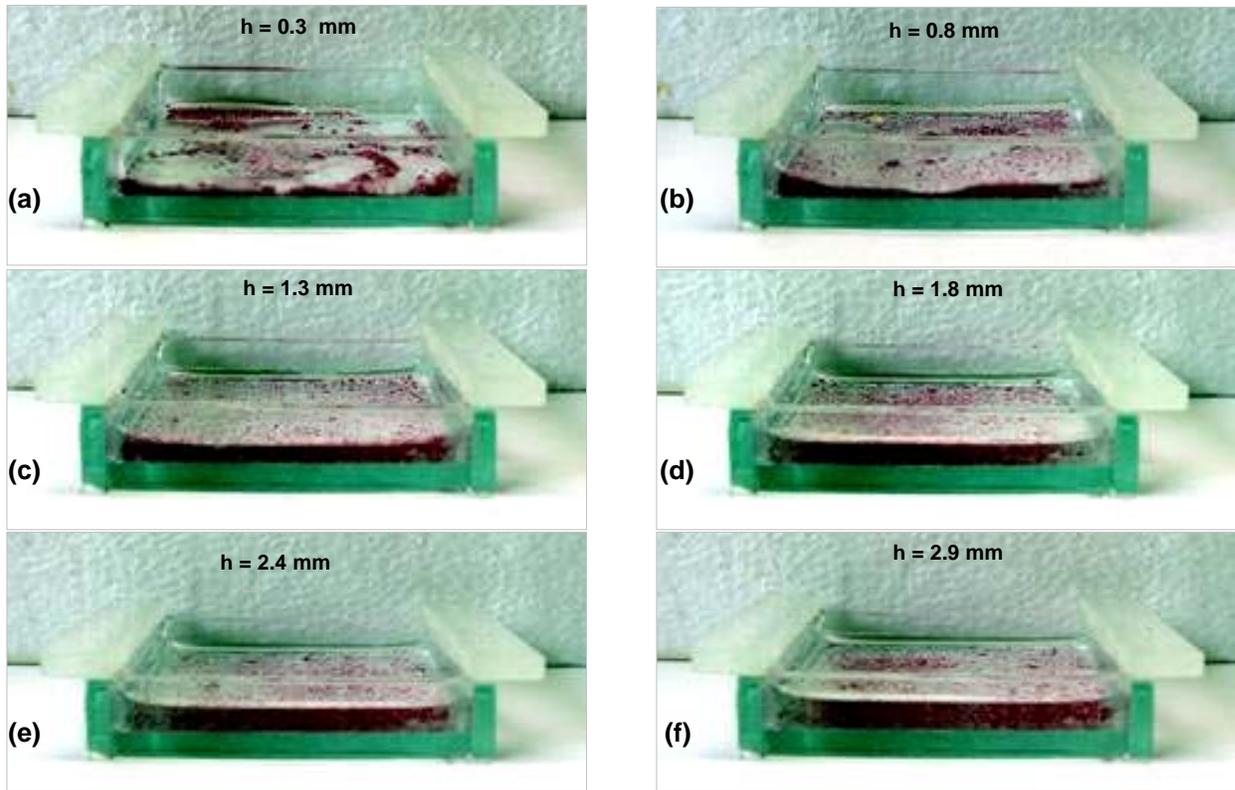


Figura 6.6 Efecto del nivel de dilución sobre las imágenes de los agregados de Beta vulgaris (Vista frontal). a) 0 ml b) 1 ml c) 2 ml d) 3 ml e) 4 ml f) 5 ml. ( $h$  representa la altura del líquido en la caja)

Finalmente para 5 ml de dilución, el número de agregados individuales disminuyó al 1,5 % del

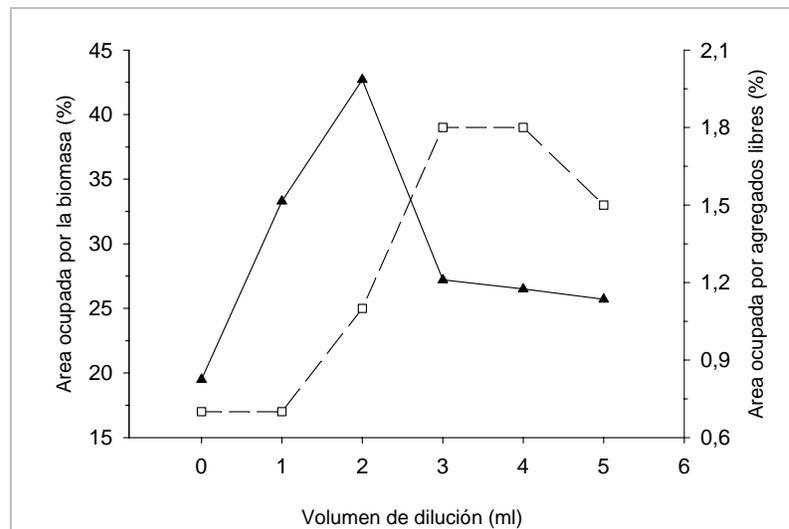


Figura 6.7 Áreas ocupadas por los agregados de acuerdo al nivel de dilución: ( $\blacktriangle$ ) biomasa total y ( $\square$ ) agregados individuales

área, sin cambiar significativamente el área total ocupada. Esto indicó que se podía trabajar con 3 o 4 ml de dilución porque fueron los que presentaron un mayor número de agregados individuales para la medición.

Por otro lado, debido a que los agregados de *Beta vulgaris* pueden alcanzar tamaños mayores a 1 mm (Jiménez-Aparicio *et al.*, 1996), con los volúmenes de dilución de 0 y 1 ml no se consiguió la altura de líquido necesaria para cubrir estos agregados (Figuras 6.6 a y b), con 2 ml de volumen de dilución se logró una altura 1,3 mm (Figura 6.6 c) que aún no cubría algunos agregados; con 3 ml se garantizó que prácticamente todos los agregados quedaran cubiertos de líquido y no se formara más de una capa de agregados (Figura 6.6 d). Aunque con 4 y 5 ml de volumen de dilución todos los agregados quedaron cubiertos de líquido, se observó la aparición de más de una capa de agregados (Figuras 6.6 e y f) que podía ocasionar problemas en la toma de las imágenes por sobreposicionamiento.

Estos resultados permitieron determinar que el volumen de dilución con el cual se logró que los agregados quedaran cubiertos por el líquido y que se formara una sola capa de agregados; fue el de 3 ml, el cual se siguió usando para diluir las muestras en el presente estudio.

#### **6.1.4 Volumen de muestra**

La Figura 6.8 y el Cuadro 6.3 se muestra el efecto del volumen de muestra sobre la calidad de las imágenes y la dimensión fractal.

En la Figura 6.8a se observa que con un volumen de 0.4 ml los agregados individuales se encontraban dispersos en el área de la imagen ocupando solamente el 10.9 % del área total disponible (Cuadro 6.3) quedando espacios libres sin aprovechar por la baja concentración de biomasa presente; esta área correspondió a 220 agregados por imagen en promedio. Con un tamaño de muestra de 0.5 ml (Figura 6.8b) se disminuyeron los espacios libres y área aprovechada fue la más alta (13,7 %) de todas; al igual que el número de agregados individuales por imagen que fue de 269.

Con la muestra de 0.7 ml el área cubierta disminuyó al 11.9% (Figura 6.8c), debido a que la alta concentración de biomasa (agregados) originó la formación de algunos conglomerados de agregados, los cuales se sobreposicionaron reflejando una menor área; el número de agregados individuales también disminuyó (250) a causa del sobreposicionamiento de los mismos.

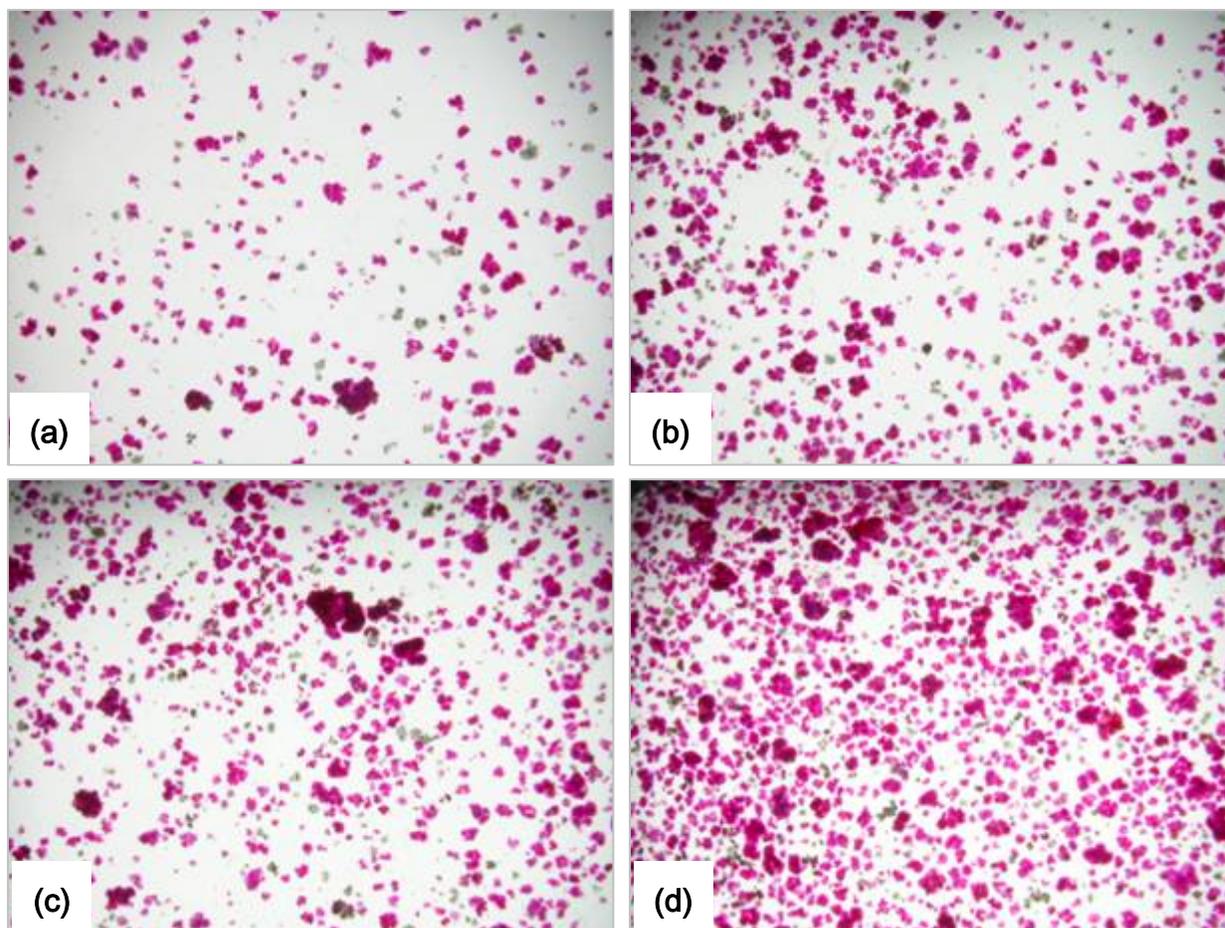


Figura 6.8 Efecto del volumen de muestra sobre las imágenes de agregados de Beta vulgaris. a) 0.4 ml b) 0.5 ml c) 0.7 ml d) 1 ml (imágenes de agregados de 12 días diluidos con 3 ml de medio acondicionado tomadas a 0.75X)

Cuadro 6.3 Número de agregados y área ocupada por imagen para diferentes tamaños de muestra

Volumen muestra (ml)	Agregados por imagen*	Área ocupada (mm <sup>2</sup> )*	Área (% del total)
0.4	220 ± 15 <sup>a</sup>	27.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	10.9
0.5	269 ± 19 <sup>a</sup>	34.3 ± 6.1 <sup>a</sup>	13.7
0.7	250 ± 21 <sup>a</sup>	29.8 ± 6.2 <sup>a</sup>	11.9
1.0	217 ± 14 <sup>a</sup>	23.1 ± 1.4 <sup>b</sup>	9.2

\*Los valores representan la media de 6 imágenes ± el error estándar. Los valores seguidos por diferente letra son significativamente diferentes (Prueba de Tukey,  $\alpha = 0.05$ )

Con la muestra de 1 ml, el porcentaje del área útil ocupada por los agregados (9.2%) fue el mas

bajo a causa de la mayor cantidad de biomasa, que produjo un aumento en el sobreposicionamiento respecto al encontrado con 0.7 ml; en la Figura 6.8d fueron evidentes las zonas de altas concentraciones de agregados que se agruparon formando conglomerados; esto causó que el número de agregados individuales también disminuirá.

Los resultados anteriores, y la recomendación de Pepin *et al.*, (1999) de seleccionar un tamaño de muestra que ocupe entre un 10 y un 15% del área de la imagen; permitieron concluir que se podría trabajar con cualquiera de los tres primeros tamaños de muestra (0.4, 0.5 ó 0.7 ml), pero se decidió continuar el estudio con un volumen de muestra de 0.5 ml, ya que fue el que presentó los mayores valores en cuanto al número de agregados por imagen (269) y la mayor área útil ocupada (13.7%).

### 6.1.5 Escala de observación

En la Figura 6.9 se aprecian imágenes típicas de agregados de *Beta vulgaris* de 7 días tomadas con las cuatro escalas de observación evaluadas en el estereoscopio. Para los aumentos de 0.75X y 1X no existió una diferencia marcada en el tamaño y número de los agregados, ya que el aumento total y la resolución para estas dos escalas fueron cercanos (Cuadro 6.4).

Para las escalas de 2X y 4X se lograron aumentos de 33 y 67 veces, por lo que el número de objetos por imagen disminuyó (Cuadro 6.4), pero aumentó el tamaño de los mismos. En cuanto a la morfología de los agregados, se observaron formas más irregulares con las escalas de 0.75X y 1X que para las de 2X y 4X donde las formas aparecieron más lisas y regulares como consecuencia de que a escalas mayores la resolución también aumentó, mostrando un mayor nivel de detalle en los objetos observados.

Cuadro 6.4 Escalas de observación evaluadas para la medición de las dimensiones fractales

Escala de Observación	Aumento total	Resolución $\mu\text{m}/\text{píxel}$	Agregados por imagen*
0.75X	12.5X	28.6	65 $\pm$ 7
1X	16.8X	21.7	39 $\pm$ 3
2X	33.6X	10.4	9 $\pm$ 1
4X	67.2X	5.5	3 $\pm$ 1

\*Corresponden a la media de 5 imágenes  $\pm$  el error estándar

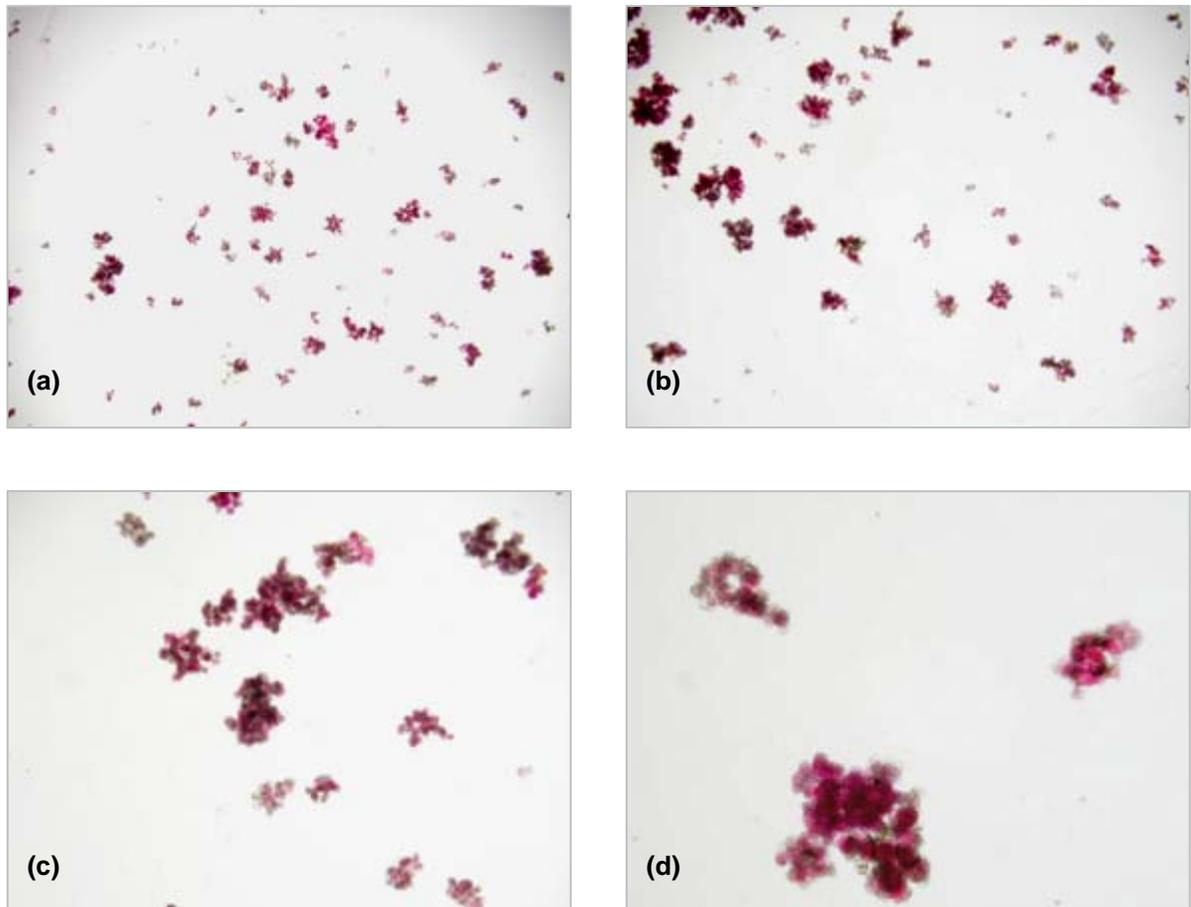


Figura 6.9 Imágenes de agregados de *Beta vulgaris* obtenidas con diferentes escalas de observación. (a) 0.75X (b) 1X (c) 2X (d) 4X

Los valores de  $D_P$  y  $D_A$  se calcularon con las medidas de área y perímetro de 250 agregados capturados en varias imágenes de acuerdo a la escala de observación (Cuadro 6.4).

En la Figura 6.10 se muestra la gráfica del logaritmo natural del perímetro contra el logaritmo natural del área de los agregados tomados con la escala de 0.75X; a partir de esta gráfica se determinó  $D_P$ . De forma semejante se calcularon  $D_P$  y  $D_A$  para los demás aumentos evaluados.

En la Figura 6.11 se observa que con las cuatro escalas de observación analizadas se presentó un comportamiento fractal evidenciado por los valores del  $D_P$  y  $D_A$ .

El valor más alto de  $D_P$  se obtuvo con 0.75X (1.33) señalando que a esta escala los agregados aparecieron más irregulares en su periferia; a medida que aumentó el zoom de observación (mayor acercamiento al objeto)  $D_P$  disminuyó hasta alcanzar un valor de 1.14 con 4X, revelando que al aumentar el nivel de amplificación se observaron las formas regulares y lisas de los

objetos (valores bajos de  $D_P$ ). Para las escalas de 1X y 2X se obtuvo el mismo valor (1.27), indicando que en este intervalo de observación los agregados fueron autosimilares en el perímetro.

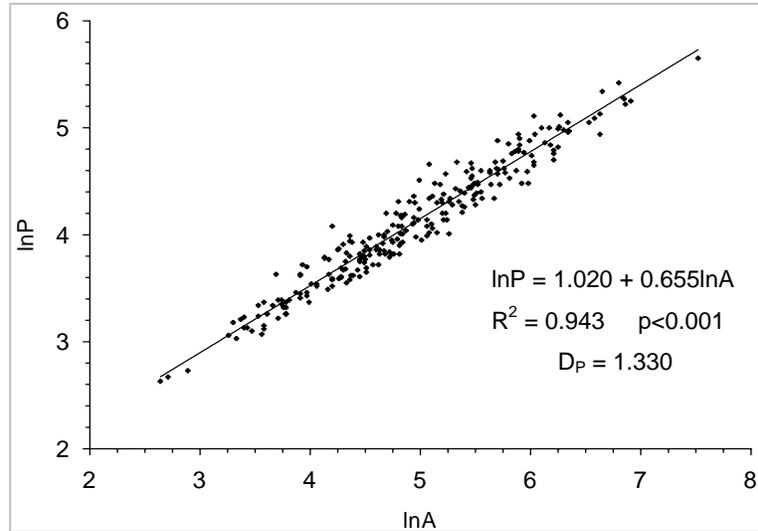


Figura 6.10 Gráfica de  $\ln P$  vs  $\ln A$  usada para calcular  $D_P$  ( $n = 250$ )

La disminución en la dimensión fractal a medida que aumentó la escala de observación también fue observada por Dathe *et al.* (2001) al trabajar los métodos de conteo de cajas y de dilatación en el estudio de estructuras porosas de suelo. Dichos autores sugieren que este resultado confirma que los objetos naturales sólo presentan características fractales en un intervalo limitado de escalas de observación. El hecho de que no se haya observado una autosimilitud en las escalas analizadas no representa problema alguno, pues el mismo Mandelbrot (2003) señala que para estos casos la dimensión fractal puede servir para cuantificar la rugosidad de los agregados, más no como evidencia de una verdadera geometría fractal.

Los valores de  $D_A$  mostraron un comportamiento parecido al de  $D_P$  (en cuanto al aumento de la complejidad): a medida que se aumentó la escala de observación los valores de  $D_A$  crecieron desde 1.70 para 0.75X hasta 1.93 para 4X; indicando que lo que apareció como ramificaciones (valor bajo de  $D_A$ ) en la escala de 0.75X, apareció como líneas lisas y regulares (alto valor de  $D_A$ ), en la escala de 4X. Esto comprueba que los agregados de *Beta vulgaris* no presentaron una autosimilitud en las cuatro escalas de observación, ya que no se conservó la misma morfología en los diferentes niveles de observación analizados.

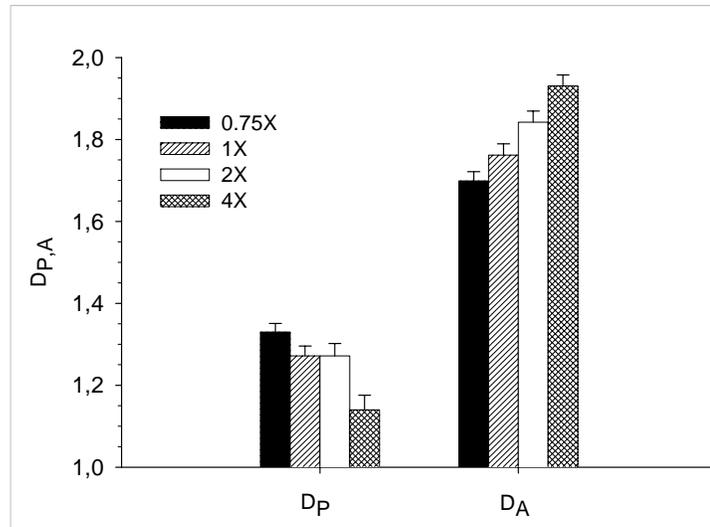


Figura 6.11 Efecto de la escala de observación sobre  $D_P$  y  $D_A$ . Los valores corresponden a 250 agregados  $\pm$  error estándar

En resumen, aunque los agregados presentaron valores de  $D_P$  y  $D_A$  fraccionarios en las cuatro escalas de observación analizadas, no se observó una autosimilitud de escala; y a medida que la escala aumentó desde 0.75X hasta 4X los valores de la dimensión fractal mostraron una menor complejidad en la morfología de los agregados.

Aunque era posible continuar trabajando con cualquiera de las cuatro escalas de observación (en todas se obtuvieron valores de  $D_P$  y  $D_A$  fraccionarios) se decidió continuar con la escala 1X, ya que ésta presentó un número grande de agregados por imagen facilitando el análisis de un mayor número de objetos por campo; y porque fue autoafin (iguales valores de  $D_P$ ) en cuanto a la periferia con la escala de 2X.

### 6.1.6 Edición de la imagen

La imagen original se analizó sin ningún tipo de procesamiento, esta tenía la ventaja de mostrar los agregados a color facilitando su identificación respecto del fondo de la imagen y al ruido que esta pudiese tener (Figura 6.12a). Al convertir la imagen a escala de grises (Figura 6.12b) no se logró una mejora en la calidad de la imagen, este es un paso intermedio para otros procesos de edición y tiene mayor utilidad cuando se va a realizar un análisis de textura de la imagen (Quevedo *et al.*, 2002); la única ventaja es que en este modo las imágenes ocuparon menos memoria.

Cuando se realizó la optimización del contraste de la imagen (Figura 6.12c) los píxeles de alta

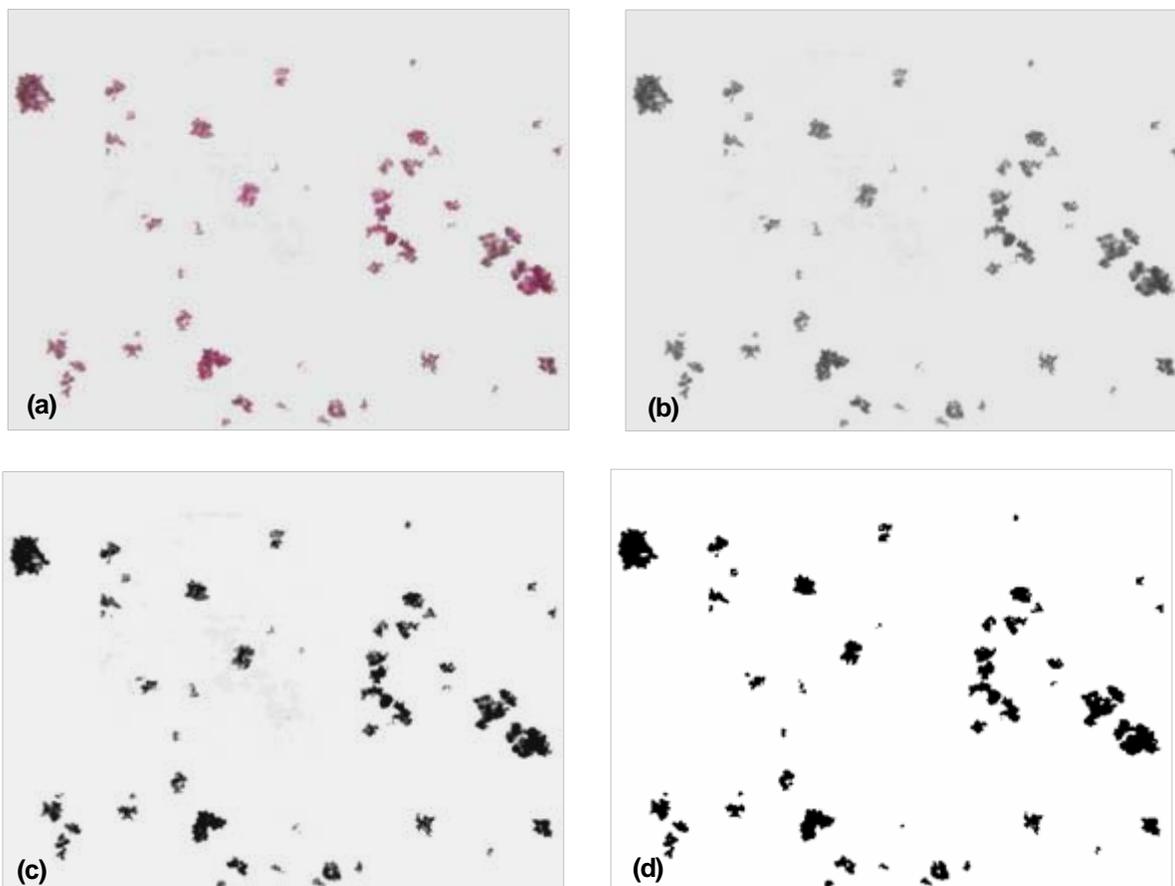


Figura 6.12 Imágenes editadas de agregados de *Beta vulgaris* de 7 días a) Original, (b) Escala de grises (c) Optimización del contraste, (d) Binaria

intensidad de grises se hicieron más oscuros y los de baja intensidad más claros, logrando un mayor contraste entre los elementos de la imagen y el fondo; de esta manera los agregados aparecieron más nítidos y se facilitó su identificación. La operación de binarización convirtió las imágenes al modo blanco y negro (Figura 6.12d) dejándolas en condiciones de ser analizadas de forma automática. Una desventaja de trabajar en los modos escala de grises, binario y con la imagen contrastada fue la dificultad para diferenciar un agregado pequeño del ruido que llevaba la imagen, ya que todos los objetos aparecían del mismo color.

La Figura 6.13 presenta las dimensiones fractales de los agregados a medida que la imagen fue editada,  $D_p$  cambió de 1.25 (imagen original) a 1.26 (imagen en escala de grises e imagen contrastada) y a 1.15 (imagen binarizada) mostrando que los procesos de conversión a escala de grises y el de optimización de contraste no afectaron la irregularidad del contorno de los agregados; el pequeño cambio observado en el valor de  $D_p$  entre la imagen original y la imagen en escala de grises, pudo deberse a errores en la medición, ya que fue difícil tomar el mismo

punto de referencia para medir los agregados en la imagen original y en la que estaba en modo de grises. El proceso de optimización del contraste no tuvo efecto sobre el contorno de los agregados al no cambiar el valor de  $D_P$ ; pero la binarización si afectó significativamente el valor de la dimensión fractal al disminuir su valor de 1.26 a 1.15, lo que sugiere que este procesamiento hizo más lisos y regulares los contornos de los agregados. La binarización de una imagen convierte la intensidad de los píxeles que varía entre 0 y 255 (escala de grises) a píxeles con intensidades de 0 ó 255 (blanco y negro), por lo cual se pudo perder información de la imagen, ya que píxeles con intensidades bajas que hubiesen estado ubicados en los bordes de los agregados desaparecieron a cambiar su intensidad a 255 (blanco), eliminándose de esta forma parte de la rugosidad de los agregados. Ahammer *et al.* (2001); encontraron que en la medida en que se procesaba una imagen, el valor de la dimensión fractal disminuía; ellos atribuyen este comportamiento a la variación biológica del espécimen durante la observación, pero no al efecto del procesamiento. Como en el presente estudio no se encontró evidencia para llegar a la misma conclusión, se mantiene la hipótesis de que los cambios en las dimensiones fractales si fueron consecuencia del procesamiento realizado a la imagen.

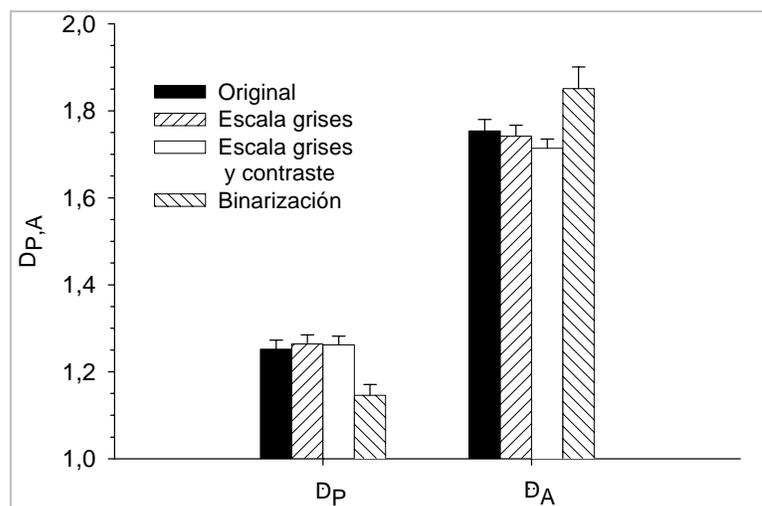


Figura 6.13 Efecto de la edición de la imagen sobre  $D_P$  y  $D_A$ . Los valores corresponden a 250 agregados  $\pm$  error estándar.

Los valores de  $D_A$  disminuyeron desde 1.75 (original) a 1.74 (escala grises) y a 1.71 (optimización de contraste) (Figura 6.13); pero aumentaron hasta 1,87 en las imágenes binarizadas; nuevamente el cambio a escala de grises no afecta la morfología de los agregados y el pequeño cambio que se presentó puede deberse al error de medición explicado con anterioridad. Al realizar la optimización del contraste este procesamiento afectó  $D_A$  y los

agregados aparentemente fueron mas ramificados y menos compactos; como el algoritmo de optimización de contraste tomó los píxeles claros y les disminuyó su intensidad, es posible que algunos píxeles (pertenecientes a los agregados) de intensidad baja hayan desaparecido al disminuir su intensidad y ahora aparezcan como pertenecientes al fondo de la imagen de tal forma que ya no son contabilizados en la mediciones de los agregados, afectando el valor de  $D_A$ , ya que estos dejan huecos dentro de los agregados haciéndolos aparecer menos compactos y llenando en menor proporción el espacio.

El proceso de binarización tuvo un efecto marcado sobre  $D_A$ , cambiándola de 1.75 a 1.87; en este caso los agregados aparecen más compactos, menos ramificados y ocupan el plano en una mayor proporción; posiblemente por el mismo efecto de convertir los píxeles a blancos y negros, algunos de la periferia pudieron desaparecer eliminando ramificaciones y por ende aumentando  $D_A$ .

Para no alterar la morfología natural de los agregados y de esta forma no afectar los valores en las dimensiones fractales; y en vista de que las imágenes originales eran de buena calidad en cuanto a luminosidad y contraste que no necesitaron de un procesamiento para su análisis posterior; se decidió continuar el trabajo con las imágenes originales sin hacerles ningún tipo de procesamiento, y realizar las mediciones de forma manual ya que la medición automática necesitaba un proceso de binarización.

### 6.1.7 Número de agregados

En la Figura 6.14 se observa la dependencia de las dimensiones fractales y el error estándar con respecto al número de agregados analizados.

De acuerdo a las Figuras 6.14a y b, para tamaños de muestra menores a 300 agregados los valores en las dimensiones fractales mostraron una alta dependencia con el número de agregados, variando desde 1.222 hasta 1.280 para  $D_P$ , y desde 1.806 hasta 1.840 para  $D_A$ ; indicando que para tamaños de muestra menores a 300 no se podían determinar valores representativos de la población de agregados. Para tamaños de muestra mayores a 300 agregados las dimensiones fractales mostraron una tendencia a estabilizarse alrededor de un punto, aunque este comportamiento es más evidente con  $D_P$  que con  $D_A$ , la cual sólo mostró una tendencia más clara a partir de 700 agregados.

Respecto de los errores en las dimensiones fractales, se presentó una alta variabilidad de las muestras para tamaños menores a 300, aunque esta fue mayor para el caso de  $D_A$  que tuvo

errores desde 0.046 para muestras de 50 agregados y 0.020 para 300, siendo errores aún altos para los propósitos de encontrar diferencias en las dimensiones fractales de 0.01 unidades.

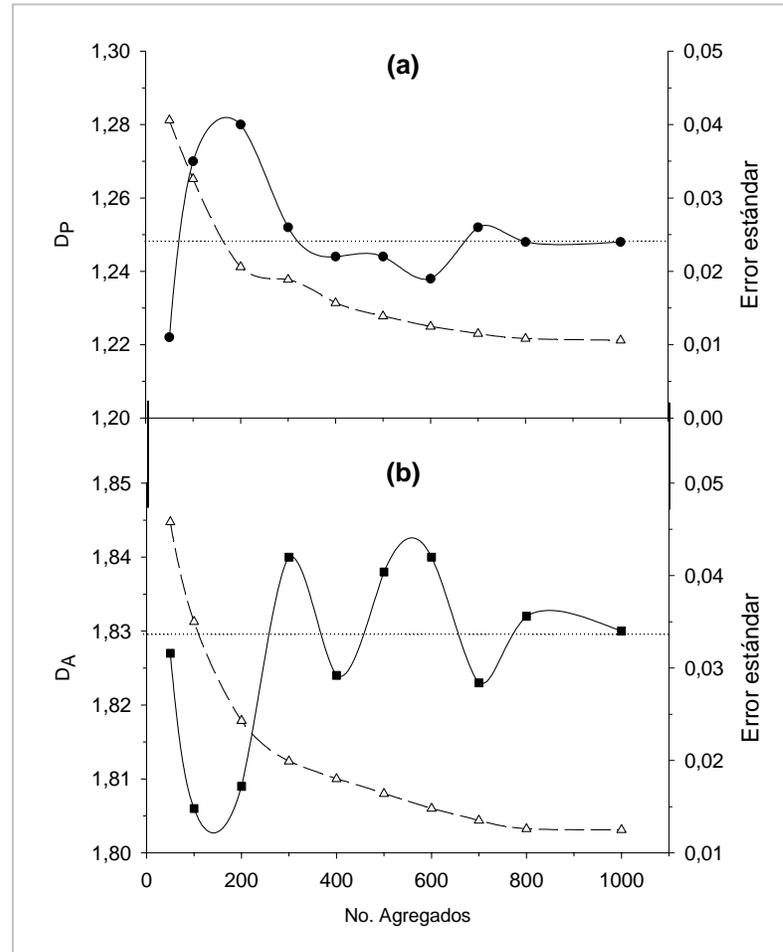


Figura 6.14 Efecto del número de agregados sobre las dimensiones fractales (■) y el error estándar (Δ).  
(a)  $D_P$  (b)  $D_A$

Para tamaños de muestra superiores a 800 agregados  $D_P$  se estabilizó en 1.248, pero  $D_A$  aún presentó una variación de 0,004. Aunque estos valores quedaron dentro del intervalo de aceptación ( $\pm 0.01$ ) del presente estudio, los errores aún estaban por arriba del valor deseado (0.01) y era necesario aumentar el tamaño de la muestra para disminuir el error.

Debido a que solamente se evaluó hasta un tamaño de muestra de 1000 agregados, se decidió determinar la diferencia mínima que podría detectarse en un análisis estadístico usando 1000 agregados. Utilizando el software libre Ps (Dupont y Plumer, 2004) se obtuvieron las diferencias mínimas detectables para tamaños de muestra de 250 y 1000 agregados (los cálculos se hicieron con una significancia de 0.05 y una potencia de 0.8).

Cuadro 6.5 Diferencias mínimas detectables de entre dimensiones fractales para diferentes tamaños de muestra

Tamaño de muestra (n)	250	1000
Diferencia mínima ( $\Delta D_{\min}$ )	0.08	0.02

De acuerdo a los valores de el Cuadro 6.5, con un tamaño de muestra de 250 agregados no era posible encontrar diferencias menores a 0.08 en las dimensiones fractales, ya que el error fue alto; con un tamaño de muestra de 1000 agregados la mínima diferencia que se podría detectar era de 0.02, valor aceptable para los propósitos de este estudio, por lo cual se decidió trabajar con este número de agregados para continuar con la segunda parte del trabajo.

### 6.1.8 Condiciones para el análisis de imágenes en la determinación de las dimensiones fractales de agregados de *Beta vulgaris*

En el Cuadro 6.6 se resumen las condiciones establecidas para el análisis de imágenes en la determinación de las dimensiones fractales de los agregados de *Beta vulgaris* crecidos en suspensión.

Cuadro 6.6 Condiciones del análisis de imágenes establecidas para determinar dimensiones fractales

1. Microscopio para toma de imágenes :	Estereoscópico
2. Adecuación del equipo :	Platina y celda portamuestra
3. Dilución de la muestra :	6:1 con medio acondicionado
4. Volumen de muestra :	0.5 ml
5. Escala de observación :	Zoom de 1X
6. Edición de la imagen :	Ninguna
7. Número de agregados :	1000

## 6.2 Evaluación de $D_p$ y $D_A$ durante el crecimiento de agregados en suspensión de *Beta vulgaris* crecidos en matraces.

### 6.2.1 Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento tuvo una duración de 18 días (Figura 6.14), y el comportamiento fue

típico para un cultivo de células vegetales en suspensión. Se identificaron cuatro fases de crecimiento: periodo lag desde el día 0 al 3, en donde las células se adaptaron para iniciar el crecimiento; crecimiento exponencial del día 3 al 12, allí las células presentaron la mayor velocidad de división; una fase estacionaria del día 12 al 15, donde la velocidad de división celular disminuyó pero las células crecieron en tamaño y una fase de muerte celular después del día 15. La velocidad específica de crecimiento del cultivo fue  $0.1833 \text{ d}^{-1}$  y el tiempo de duplicación fue 3.8 d, valores superiores a los encontrados por Rodríguez-Monroy y Galindo (1999) ( $\mu = 0.116 \text{ d}^{-1}$  y  $t_d = 6 \text{ d}$ ); estas discrepancias posiblemente fueron debidas a la diferencia en los tamaño del inóculo y a la edad del cultivo.

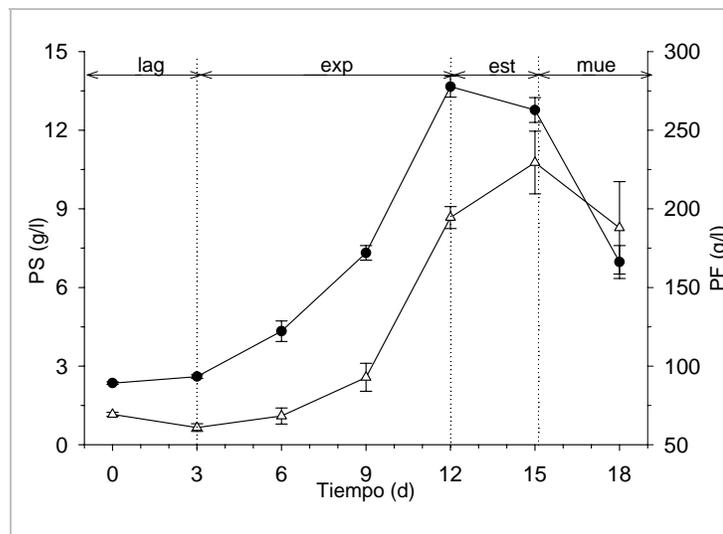


Figura 6.15 Cinética de crecimiento de *Beta vulgaris* en matraces. PS: Peso seco (●), PF: Peso fresco (Δ). Los valores representan la media de tres muestras  $\pm$  el error estándar

### 6.2.2 Cambios en el tamaño de los agregados

Como consecuencia del crecimiento, los agregados cambiaron su tamaño a lo largo del tiempo (Figura 6.16); estos iniciaron con un área de  $0.0586 \text{ mm}^2$ , durante la fase lag no hubo cambio en el tamaño ya que las células no habían empezado a crecer y se estaban adaptando a las condiciones del medio para iniciar la división celular. En el día 3 se inició el crecimiento y el área aumentó hasta el día 9 alcanzando un valor de  $0.1604 \text{ mm}^2$  siendo el máximo alcanzado; este intervalo correspondió parcialmente a la fase exponencial de crecimiento en donde la división celular permitió la aparición de nuevas células en la periferia de los agregados aumentando su tamaño. Antes de llegar a la fase estacionaria los agregados disminuyeron su tamaño llegando al día 12 con un área de  $0.484 \text{ mm}^2$ , señalando que durante este periodo los

agregados no crecieron, aunque el aumento de la biomasa en el mismo periodo indica lo contrario; este comportamiento se explica porque en esta etapa las células estaban en plena expansión (aumento de biomasa) lo que produjo el rompimiento de los agregados en otros de menor tamaño (Yeoman y Street, 1973).

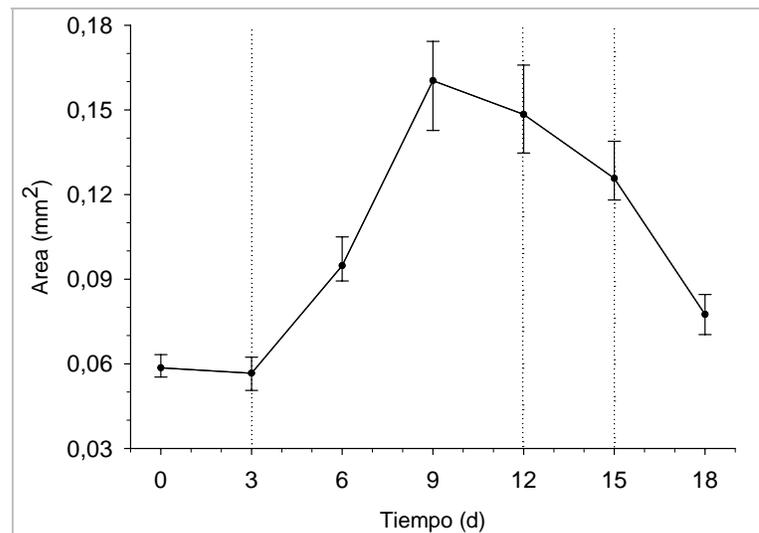


Figura 6.16 Cambios de área de los agregados de *Beta vulgaris* crecidos en matraces. Los valores representan la mediana de 1000 agregados con un intervalo de confianza del 95%.

Durante la fase estacionaria el área disminuyó hasta 0,1257 mm<sup>2</sup>, corroborando las observaciones de Yeoman y Street (1973) quienes afirman que durante la fase estacionaria los agregados se rompen en otros de menor tamaño en la medida que las células se expanden. En la fase de muerte celular los agregados siguieron reduciendo el área hasta 0,07751 mm<sup>2</sup> en el día 18; durante este tiempo las células empezaron a morir y a romperse desintegrando los agregados y disminuyendo su tamaño.

### 6.2.3 Cambios en la dimensión fractal $D_p$

La cinética inició con un valor de  $D_p$  de 1.31 (Figura 6.17), indicando que los agregados presentaron un contorno irregular al inicio del cultivo. Durante la fase lag y parte del periodo de crecimiento exponencial (hasta el día 6) la dimensión fractal disminuyó a 1.24, mostrando que durante estos seis días el perímetro de los agregados se hizo más liso y regular probablemente debido a la elasticidad de la pared celular (Arenas-Ocampo *et al.*, 2004) como producto del crecimiento tanto de la biomasa como del tamaño de los agregados.

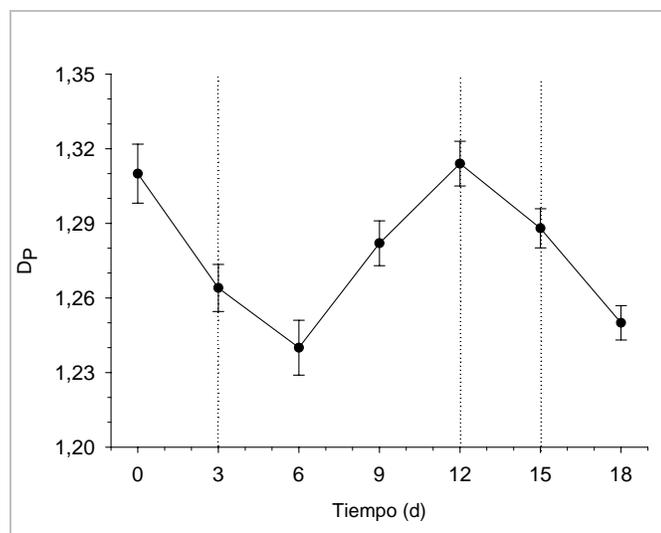


Figura 6.17 Cambios de la dimensión fractal  $D_p$  durante el crecimiento de *Beta vulgaris* en matraces. Los valores corresponden a 1000 agregados  $\pm$  el error estándar.

En el día 6,  $D_p$  empezó a aumentar alcanzando el máximo valor el día 12 (1.314) coincidiendo con la terminación de la fase exponencial, en donde ha cesado el crecimiento celular y era de esperarse la mayor irregularidad de los agregados por la presencia de un alto número de células hijas en la periferia producto de dicha división. Durante la fase estacionaria el valor de  $D_p$  volvió a disminuir hasta 1.288, los agregados presentaron menor rugosidad en la periferia, esto correlacionó con la disminución del tamaño durante este periodo, ya que la expansión celular fragmentó los grandes agregados en otros pequeños y de menor rugosidad. En la fase de muerte celular  $D_p$  disminuyó a 1.25 el día 18 porque los agregados se hicieron más lisos como consecuencia de la desintegración por muerte celular.

#### 6.2.4 Cambios en la dimensión fractal $D_A$

En la Figura 6.18 se presenta el comportamiento de  $D_A$  durante el crecimiento de los agregados. La cinética inició con un valor de 1.692, el más bajo de todos, lo que sugiere que en este momento los agregados presentaron el menor grado de compactación y una baja ramificación. Ubicando este valor dentro del intervalo de variación de  $D_A$  (de 1 a 2), es alto, señalando que los agregados de *Beta vulgaris* al iniciar el cultivo eran relativamente compactos, poco ramificados y llenaban una buena proporción del plano.

Aunque no hubo cambios significativos en la biomasa y en el tamaño, durante el periodo lag se observaron variaciones en la morfología ( $D_p$  y  $D_A$ ), lo cual es un indicio de los cambios que

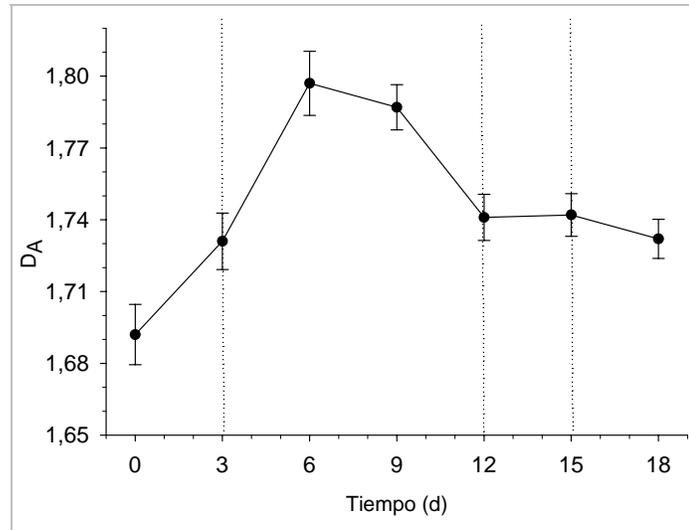


Figura 6.18 Cambios de la dimensión fractal  $D_A$  durante el crecimiento de *Beta vulgaris* en matraces. Los valores corresponden a 1000 agregados  $\pm$  el error estándar.

experimentaron los agregados antes de iniciar la división. Yeoman y Street (1973) señalan que en el periodo lag las células vacuoladas se prepararan para la división celular, y uno de los cambios mas notorios es el aumento en el volumen del citoplasma; que debe traer como consecuencia la disminución de la rugosidad de la periferia (disminución de  $D_P$ ) y una mayor compactación de los agregados al llenar mas el espacio (aumento de  $D_A$ ); lo cual esta de acuerdo con el comportamiento observado en los valores de  $D_P$  y  $D_A$  durante ese periodo. El aumento de  $D_A$  entre el los días 3 y el 6 se atribuye a la división celular: al aparecer nuevas células, éstas fueron ocupando los espacios vacíos y compactando el agregado. Desde el día 6 y hasta el final del periodo de crecimiento exponencial  $D_A$  disminuyó, ya que en el día 6 las células hijas habían llenado los espacios disponibles en el agregado, en consecuencia no era posible una mayor compactación del mismo (aumento de  $D_A$ ), y como la división celular se da en la periferia de los agregados (King y Street, 1973), la aparición de células hijas se manifestó como nuevas ramificaciones en la superficie, ocasionando una disminución de  $D_A$  hasta el cese de la división celular (posiblemente el día 9). La disminución de  $D_A$  observada hasta el día 12 pudo ser consecuencia de la expansión celular que rompió los agregados en otros más pequeños de menor compactación y más ramificados. En el transcurso del periodo estacionario  $D_A$  se mantuvo constante (1.742 en el día 15), por lo que no hubo cambios en el grado de compactación y ramificación de los agregados aunque estos si disminuyeron su tamaño. En la fase de muerte celular se observó una pequeña disminución en el valor de  $D_A$  (1.732 en el día 18) debido a la lisis celular que se manifestó como cuerpos poco compactos y más ramificados.

Al comparar los valores de  $D_A$  obtenidos para *Beta vulgaris* (1.692 – 1.797) con los de otros agregados biológicos, se observó que fueron más cercanos al de agregados de *Zoogloea ramigera* ( $D_A = 1.69$ ) que al de *Saccharomyces cerevisiae* ( $D_A = 1.92$ ) encontrados por Logan y Wilkinson (1991); lo que permite concluir que el grado de compactación y ramificación entre agregados de *Beta vulgaris* y de *Zoogloea ramigera* fueron similares en las condiciones en que se estudiaron. Esta comparación no se puede generalizar para todas las condiciones, ya que la naturaleza fractal es función del tipo de organismo y las condiciones de mezclado (Logan y Wilkinson, 1991).

Con base a los cambios de biomasa, tamaño,  $D_P$  y  $D_A$  que se observaron durante la cinética de crecimiento de *Beta vulgaris*, en el Cuadro 6.7 se resumen las formas representativas que ilustran la evolución de la morfología de los agregados en diferentes etapas del ciclo de crecimiento. Los tamaños están proporcionados de acuerdo a la variación del área de los agregados y se representaron los cambios en la rugosidad y en el grado de compactación de los agregados.

### **6.3 Evaluación de $D_P$ y $D_A$ durante el crecimiento de agregados en suspensión de *Beta vulgaris* crecidos en biorreactor**

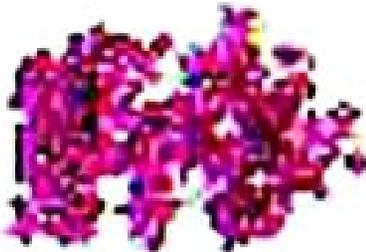
#### **6.3.1 Cinética de crecimiento**

En la Figura 6.19 se observa la cinética de crecimiento de los agregados crecidos en el biorreactor. La cinética duró 18 días, y el comportamiento fue típico para un cultivo de células vegetales en suspensión, aunque no se identificó una fase de crecimiento estacionario para el peso seco, el peso fresco si mostró una etapa estacionaria entre los días 15 y 18.

Se presentaron cinco etapas de crecimiento: periodo lag desde el día 0 al 3, en donde las células se adaptaron para iniciar el crecimiento y el peso seco no mostró variación alguna, pero el peso fresco si aumentó indicando que las células incorporaron agua, fenómeno que no se observó en el cultivo en matraces.

Para el peso seco hubo un periodo de crecimiento exponencial hasta el sexto día; le siguió una etapa de crecimiento lineal que duró 6 días, luego un periodo de desaceleración donde las velocidad de crecimiento disminuyó, y finalmente se presentó un periodo de crecimiento estacionario y muerte celular después del día 15; aunque no fue evidente la fase estacionaria para el peso seco, ésta pudo presentarse en un periodo de tiempo entre los días 15 y 18,

Cuadro 6.7 Características morfológicas de agregados de *Beta vulgaris* durante su crecimiento en matraces

Día	Peso seco (g/l)	Área (mm <sup>2</sup> )	D <sub>P</sub>	D <sub>A</sub>	Imagen	Descripción
0	2.35	0.0586	1.310	1.692		Agregado pequeño, contorno irregular, compactación media
6	4.33	0.0948	1.240	1.797		Agregado grande, contorno poco irregular, compacto
12	13.66	0.1484	1.314	1.741		Agregado grande, Contorno irregular, compactación intermedia
18	6.97	0.0775	1.250	1.732		Agregado pequeño, contorno poco irregular, compactación intermedia

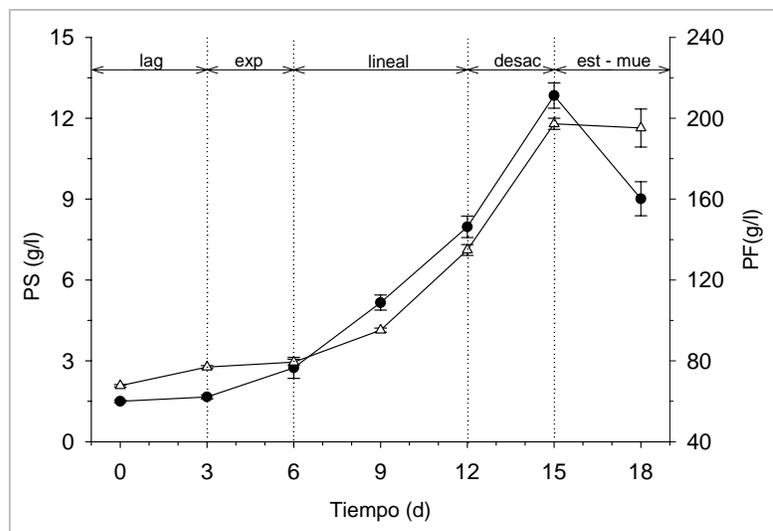


Figura 6.19 Cinética de crecimiento de *Beta vulgaris* en biorreactor. PS: Peso seco (●), PF: Peso fresco (Δ). Los valores representan la media de 3 muestras  $\pm$  el error estándar

pues se desconoce lo sucedido en ese lapso de tiempo ya que no se hizo ninguna medición; con el peso fresco se observó una fase estacionaria entre los días 15 y 18. La velocidad específica de crecimiento del cultivo fue  $0.1721 \text{ d}^{-1}$  y el tiempo de duplicación fue 4.0 d, valores superiores a los encontrados por Rodríguez-Monroy y Galindo (1999) ( $\mu = 0.050 \text{ d}^{-1}$  y  $t_d = 14 \text{ d}$ ); estas discrepancias fueron debidas posiblemente a la diferencia en los tamaño del inóculo y a la edad del cultivo. El crecimiento de las células en el biorreactor fue levemente menor que en los matraces ( $\mu = 0.1833 \text{ d}^{-1}$  y  $t_d = 3.8 \text{ d}$ ), lo cual se atribuye la estrés hidrodinámico que experimentaron las células en el biorreactor y que afectó el crecimiento.

### 6.3.2 Cambios en el tamaño de los agregados

La cinética inició con un área de  $0.0411 \text{ mm}^2$  (Figura 6.20), tamaño que fue más bajo que el de los matraces en el mismo día ( $0.0586 \text{ mm}^2$ ), esta diferencia se debió al esfuerzo cortante del agitador, ya que antes de tomar la muestra, el contenido del biorreactor fue agitado para obtener una muestra representativa, y a pesar de que el tiempo de agitación fue corto (20 min), éste fue suficiente para reducir el tamaño de los agregados.

El tamaño aumentó desde el día cero hasta el día 9 cuando alcanzó el máximo valor del área ( $0.0922 \text{ mm}^2$ ), este incremento se produjo por la incorporación de agua durante la fase lag, la división celular y la expansión de las células durante el crecimiento exponencial y parte del lineal. En el día 9 se detuvo el crecimiento de los agregados a pesar de que la biomasa continuó aumentando (Figura 6.19), es posible que en este punto los agregados hayan crecido

lo suficiente que algunas células en expansión hayan ocasionado la ruptura de estos en otros de menor tamaño (Yeoman y Street, 1973) ayudado por las fuerzas de corte que también pudieron haber limitado el tamaño de los agregados.

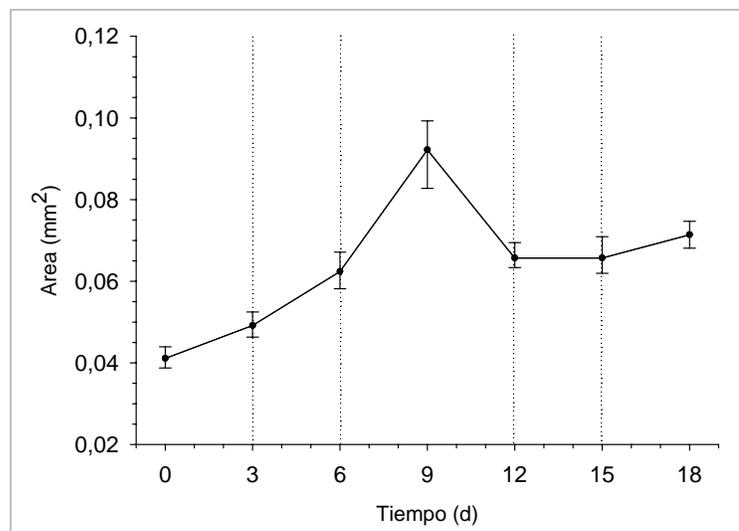


Figura 6.20 Cambios de área de los agregados de *Beta vulgaris* crecidos en biorreactor. Los valores representan la mediana de 1000 agregados con un intervalo de confianza del 95%.

Entre el día 12 y el 15 que correspondió al periodo de desaceleración, el tamaño se mantuvo constante en  $0.0654 \text{ mm}^2$  y después del día 15, los agregados incrementaron su tamaño hasta  $0.0714 \text{ mm}^2$  en el día 18, este aumento fue consecuencia de la incorporación de agua que experimentaron las células en este periodo (aumento del peso fresco y disminución del peso seco).

En general se observó que las fuerzas de corte limitaron el tamaño de los agregados, pues en los matraces la distribución de tamaños abarcó un intervalo de  $0.104 \text{ mm}^2$  con un valor máximo de  $0.1604 \text{ mm}^2$ , mientras que en el biorreactor las áreas fueron más homogéneas con un intervalo de distribución de tamaños de  $0.051 \text{ mm}^2$  y un valor máximo de  $0.0922 \text{ mm}^2$ .

### 6.3.3 Cambios en la dimensión fractal $D_p$

En la Figura 6.21 se presenta el comportamiento de la dimensión fractal  $D_p$  durante el crecimiento de *Beta vulgaris* en el biorreactor. A diferencia de los cultivos en matraces donde el cultivo inició con un valor de 1.31, en el biorreactor empezó con 1.204 como consecuencia de los esfuerzos cortantes que se aplicaron en el tiempo cero; estos ocasionaron la disminución de la rugosidad de la periferia de los agregados haciéndolos más lisos y regulares.

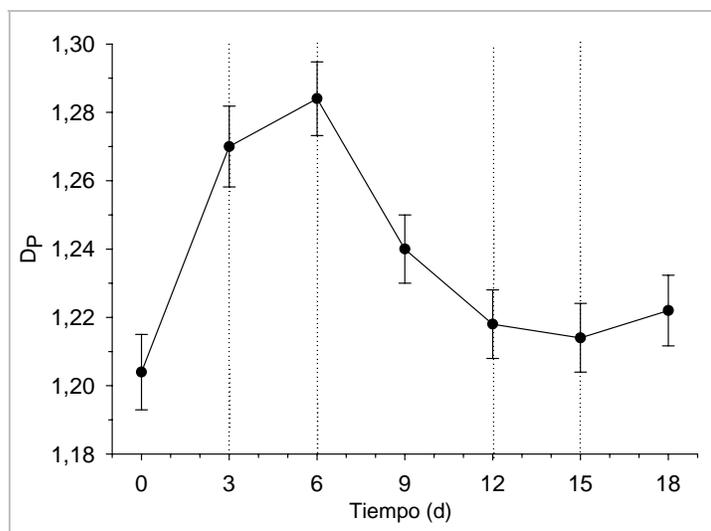


Figura 6.21 Cambios de la dimensión fractal  $D_p$  durante el crecimiento de *Beta vulgaris* en biorreactor. Los valores corresponden a la media de 1000 agregados  $\pm$  el error estándar.

Se observó un aumento de  $D_p$  desde el día cero hasta el sexto cuando alcanzó el máximo valor (1.284); este periodo de aumento correspondió a las fases lag y exponencial del crecimiento, en la fase lag el incremento de  $D_p$  no fue atribuye al aumento de biomasa, pues durante ese tiempo no hubo división celular, pero pudo ser consecuencia de la incorporación de agua por parte de los agregados; durante la fase exponencial el aumento de  $D_p$  se produjo por la división celular, ya que al ir apareciendo nuevas células en la periferia del agregado este se hizo más rugoso. Después del sexto día  $D_p$  disminuyó hasta el día 15 (1.214) y aunque la biomasa continuó aumentando, los agregados se hicieron menos rugosos, nuevamente, este fue un efecto de los esfuerzos cortantes, que para el tamaño alcanzado por los agregados, eran importantes. Desde el día 9 al 15, la disminución de  $D_p$  se vio acentuada por la ruptura de los agregados debida a la expansión celular, produciéndose agregados pequeños de poca rugosidad. Después del día 15 disminuyó el contenido de biomasa, pero hubo un leve incremento en el tamaño de las células y en la dimensión fractal, posiblemente por la incorporación de agua a las células, o por una reagregación causada por la agitación, lo cual aumentó el tamaño y la rugosidad de los agregados.

#### 6.3.4 Cambios en la dimensión fractal $D_A$

En la Figura 6.22 se presenta el comportamiento de la dimensión fractal  $D_A$  durante el crecimiento de *Beta vulgaris* en biorreactor. En el tiempo cero los agregados tuvieron un valor de  $D_A$  de 1.698 parecido al del cultivo en matraces (1.692), señalando que los esfuerzos cortantes que se aplicaron para homogenizar el tanque tuvieron un mínimo efecto sobre el

grado de compactación y ramificación de los agregados. Desde el día cero al día 6  $D_A$  se incrementó hasta el valor máximo de 1.738, y al igual que para  $D_P$  esta parte correspondió las fases lag y exponencial del crecimiento. El aumento de  $D_A$  durante la fase lag correlaciona con el hecho de que hubo una incorporación de agua y aumento de tamaño, que se manifestó en una mayor compactación de los agregados.

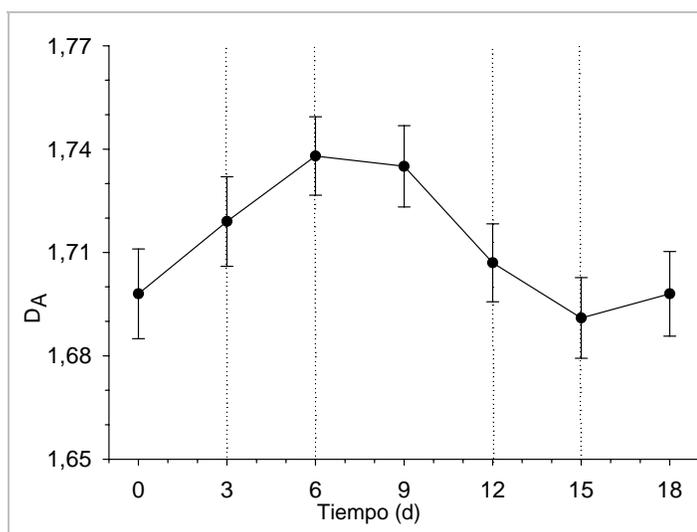


Figura 6.22 Cambios de la dimensión fractal  $D_A$  durante el crecimiento de *Beta vulgaris* en biorreactor. Los valores corresponden a 1000 agregados  $\pm$  el error estándar.

En el periodo exponencial el incremento de  $D_A$  indica que se aumentó la compactación y disminuyó el grado de ramificación debido a la aparición de nuevas células que fueron ocupando los espacios libres en el agregado, además de los esfuerzos cortantes que pudieron tener un efecto de compactación (Chakraborti *et al.*, 2003). Después del día sexto y hasta el 15,  $D_A$  disminuyó continuamente, en este periodo se presenta la fragmentación y ruptura de los agregados en otros pequeños de menor compactación y mayor ramificación; nuevamente en esta etapa los esfuerzos cortantes jugaron un papel importante en el rompimiento de los agregados. Entre los días 15 y 18  $D_A$  se incrementó levemente hasta 1.698, como consecuencia del pequeño aumento de tamaño experimentado en esos días, lo que hizo que se ocuparan más espacios vacíos y aumentara la compactación.

Con base a los cambios de biomasa, tamaño,  $D_P$  y  $D_A$  que se observaron durante la cinética de crecimiento de *Beta vulgaris*, en el Cuadro 6.8 se resumen las formas representativas que ilustran la evolución de la morfología de los agregados en diferentes etapas del ciclo de crecimiento. Los tamaños están proporcionados de acuerdo a la variación del área de los

Cuadro 6.8 Características morfológicas de agregados de *Beta vulgaris* durante su crecimiento en biorreactor

Día	Peso seco (g/l)	Área (mm <sup>2</sup> )	D <sub>p</sub>	D <sub>A</sub>	Imagen	Descripción
0	1.50	0.0411	1.204	1.698		Agregado pequeño, contorno poco irregular, compactación media
6	2.74	0.0624	1.284	1.738		Agregado mediano, contorno irregular, compactación media
9	5.16	0.0922	1.240	1.735		Agregado grande, contorno poco irregular, compactación media
15	12.84	0.0657	1.214	1.691		Agregado mediano, contorno poco irregular, compactación media
18	9.01	0.0714	1.222	1.698		Agregado mediano, contorno poco irregular, compactación intermedia

agregados y se representaron los cambios en la rugosidad y en el grado de compactación de los agregados.

#### 6.4 Relaciones entre los cambios de $D_P$ y $D_A$ con los cambios en la biomasa y tamaño de los agregados celulares de *Beta vulgaris* crecidos en matraces y biorreactor

Los resultados anteriores sugieren que los cambios de biomasa, tamaño y dimensiones fractales estaban relacionados a lo largo del crecimiento de las células, tanto en los matraces como en el biorreactor.

##### 6.4.1 Biomasa y tamaño

En la Figura 6.23 es evidente la relación existente entre la concentración de biomasa y el tamaño de los agregados crecidos en matraces y biorreactor. Para las dos situaciones se observó que al aumentar la biomasa aumentó el tamaño de los agregados en forma lineal hasta el valor máximo (0.1604 mm<sup>2</sup> en matraces y 0.0922 mm<sup>2</sup> en biorreactor). A partir de este punto, el tamaño disminuyó rápidamente en el biorreactor y lentamente en los matraces hasta que hubo una tendencia a estabilizarse a altas concentraciones de biomasa.

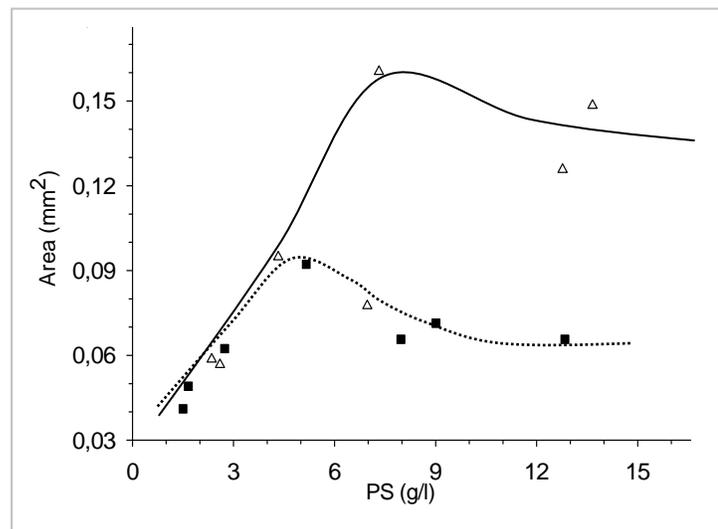


Figura 6.23 Relación entre la concentración de biomasa y el tamaño de los agregados crecidos en matraces (Δ) y biorreactor (■)

Este comportamiento concuerda con los resultados de Yeoman y Street (1973) quienes observaron que los agregados crecen en tamaño en la medida en que se presenta la división celular (aumento de la biomasa) alcanzando un valor máximo en donde la expansión de algunas células dentro del agregado ocasionan su rompimiento en otros de menor tamaño,

después continua una disminución del área al romperse los agregados por efecto de la expansión celular, obteniéndose agregados pequeños que no cambian su tamaño en forma apreciable.

El tamaño de los agregados fue prácticamente igual en matraces y biorreactor para concentraciones menores a 4 g/l, para biomases mayores los agregados crecidos en los matraces aumentaron significativamente de tamaño en comparación a los del biorreactor alcanzando áreas del 200% respecto de estos últimos. En el biorreactor el tamaño de los agregados empezó a disminuir en una concentración de biomasa menor que en matraces, evidenciando que los esfuerzos de corte controlaron el área de los agregados manteniendo un tamaño uniforme durante el crecimiento; estos resultados no coincidieron con los de Rodríguez-Monroy y Galindo (1999) quienes bajo condiciones similares de crecimiento encontraron el mismo tamaño para agregados crecidos en matraces y biorreactor; la diferencia puede radicar en la forma usada para medir el tamaño, ya que estos últimos lo hicieron a través de un Coulter Counter y en el presente trabajo se hizo a través de análisis de imágenes.

#### 6.4.2 Biomasa y dimensión fractal $D_p$

En la Figura 6.24 se presenta el comportamiento de  $D_p$  respecto de la biomasa para los agregados crecidos en matraces y biorreactor. Las gráficas muestran que puede existir una relación entre  $D_p$  y la biomasa, aunque los perfiles obtenidos para matraces y biorreactor fueron diferentes.

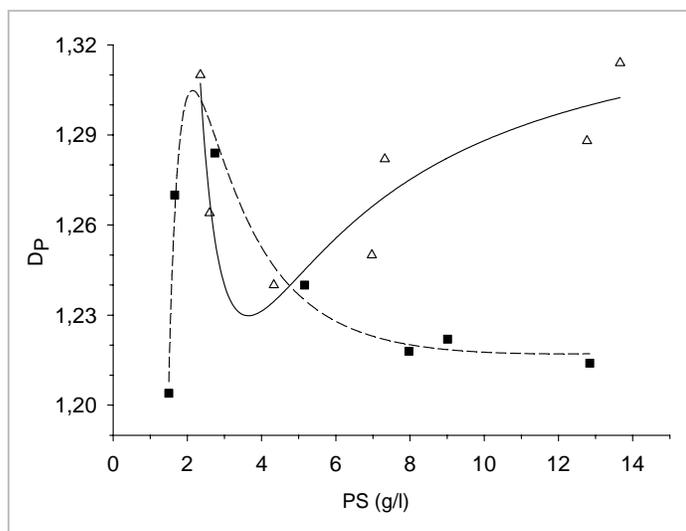


Figura 6.24 Relación entre la concentración de biomasa y la dimensión fractal  $D_p$  de los agregados crecidos en matraces ( $\Delta$ ) y biorreactor ( $\blacksquare$ )

En los matraces el valor de  $D_p$  fue alto al iniciar el crecimiento, luego disminuyó rápidamente para pequeños cambios de biomasa alcanzando un mínimo de 1.24 para 4.33 g/l de masa seca; a partir de este punto  $D_p$  aumentó continuamente llegando a 1.314 para la máxima biomasa (13.66 g/l). Aunque en este punto se alcanzó la concentración del estado estacionario,  $D_p$  continuó incrementándose de forma lenta, en esta etapa el tamaño de los agregados estaba disminuyendo (figura 6.20) y es posible que esos pequeños agregados tenían una rugosidad mayor que la de los agregados grandes, explicando el pequeño aumento de  $D_p$  para altas concentraciones de biomasa.

Para el caso de los agregados crecidos en biorreactor el comportamiento fue contrario al observado en matraces, el valor de  $D_p$  fue bajo (1.204) para biomasa bajas, y aumentó rápidamente con el incremento de la biomasa hasta llegar a 1.284 en 2.74 g/l de masa seca, posteriormente al aumentar la biomasa,  $D_p$  disminuyó continuamente tendiendo asintóticamente hacia un valor fijo cercano a 1.21 cuando se llegó a la fase estacionaria del crecimiento. A diferencia de los matraces, el valor de  $D_p$  no se incrementó a partir de este punto, esto por el posible efecto limitante de los esfuerzos cortantes sobre la rugosidad de los agregados. Al comparar los valores de  $D_p$  de los agregados crecidos en los dos sistemas para una misma biomasa, los de los matraces siempre presentaron valores mayores a los de biorreactor para biomasa superiores a 4.5 g/l, indicando que a pesar de que en los dos sistemas las células están en división celular, en el reactor hubo otro factor que limitó el aumento de irregularidad de la frontera de los agregados; este factor fue el esfuerzo cortante ejercido por el agitador sobre la periferia de los agregados, que los hizo lisos y regulares respecto a los crecidos en matraces en donde fueron más irregulares y sinuosos.

#### **6.4.3 Biomasa y dimensión fractal $D_A$**

Los perfiles de las curvas de biomasa contra dimensión fractal  $D_A$  fueron similares para los agregados crecidos en matraces y los crecidos en el biorreactor (Figura 6.25); para los dos casos la cinética empezó con valores bajos de  $D_A$  y en la medida en que se presentó la división celular hasta una concentración de 4,33 g/l (matraces) y 2,74 (biorreactor), los valores aumentaron hasta alcanzar los valores máximos 1,797 (matraces) y 1,738 (biorreactor); este comportamiento se presentó durante la fase de crecimiento exponencial en donde la división celular llenó los espacios libres dentro del agregado aumentando su compactación, que se manifestó en el aumento de  $D_A$ ; el punto máximo correspondió a la máxima compactación alcanzada por el agregado.

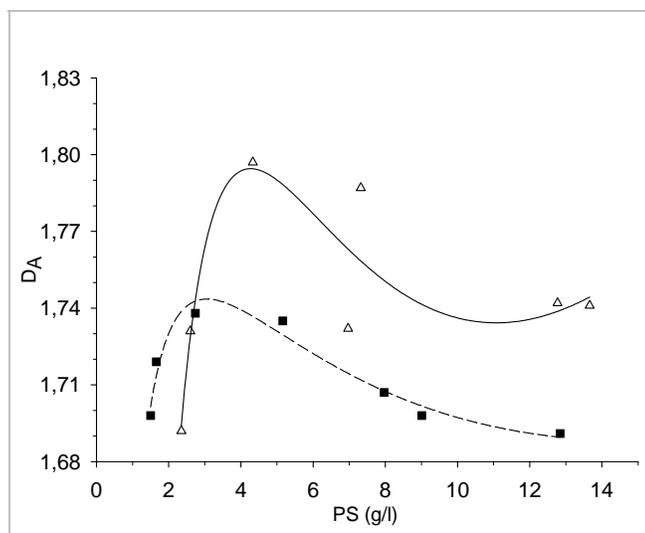


Figura 6.25 Relación entre la concentración de biomasa y la dimensión fractal  $D_A$  de los agregados crecidos en matraces ( $\Delta$ ) y biorreactor ( $\blacksquare$ )

A partir del valor máximo,  $D_A$  disminuyó a medida que aumentó la biomasa, aunque para los matraces hubo un incremento para altas concentraciones de biomasa; esto correspondió a la disminución de la compactación de los agregados por posteriores rompimientos causados por las células en expansión o por lisis y muerte celular en la última etapa del crecimiento.

Al igual que para los casos anteriores, las diferencias en las curvas obtenidas para los dos sistemas evidenciaron el efecto de las condiciones en que se realizaron los cultivos, para los matraces se obtuvieron agregados más compactos y menos ramificados, mientras que en el biorreactor estos fueron poco compactos y llenaron en menor proporción el plano, contrario a los resultados obtenidos por Chakraborti et al. (2003) quienes trabajando con partículas de látex obtuvieron agregados más compactos a medida que se aumentó el esfuerzo cortante.

#### 6.4.4 Análisis conjunto biomasa-tamaño-dimensión fractal $D_P$

En la Figuras 6.26 a y b se observa que para los matraces existe una relación directa entre la biomasa, el área y  $D_P$  para pesos secos superiores a 5 g/l, es decir, que a partir este punto a medida que aumentó la biomasa, también aumentaron el tamaño y  $D_P$  de los agregados; para biomasa menores a 5 g/l, el área aumentó con la biomasa pero  $D_P$  disminuyó. En el caso del biorreactor se identifican tres regiones: para biomasa menores a 3 g/l existe una relación directa entre el área,  $D_P$  y la biomasa (las tres crecieron), para biomasa en el intervalo 3-5 g/l, aumentaron la biomasa y el área pero disminuyó  $D_P$ , y finalmente para biomasa mayores a 5 g/l, el área y  $D_P$  disminuyeron a medida que se incrementó la biomasa, lo que valida el efecto de

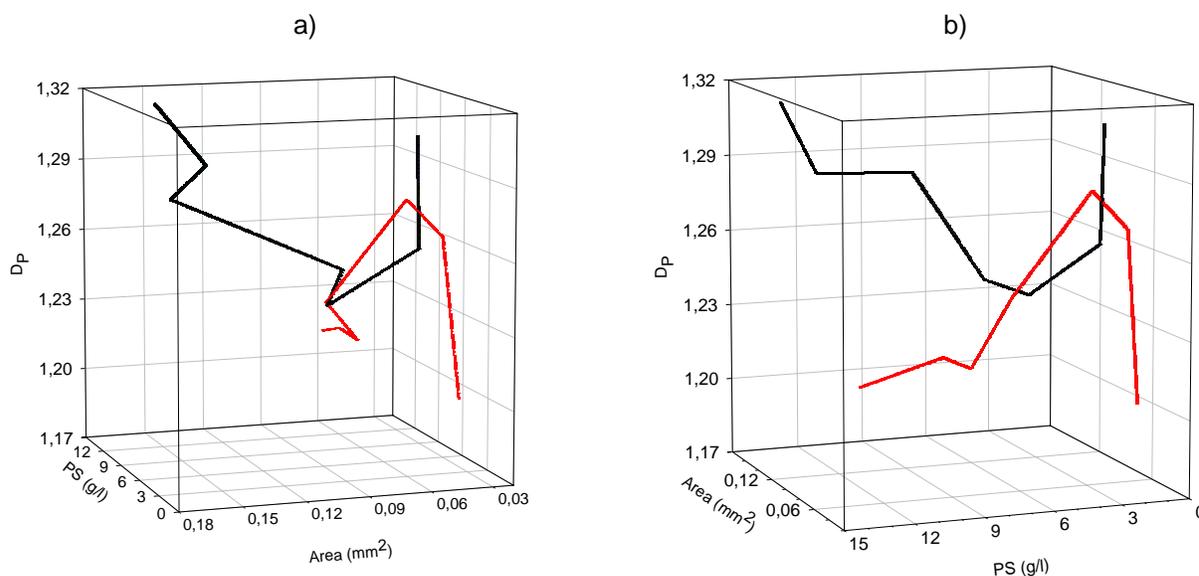


Figura 6.26 Relación entre la concentración de biomasa, el tamaño y  $D_p$  de los agregados crecidos en matraces (—) y biorreactor (—). a) Vista frontal del área b) Vista frontal de la biomasa.

los esfuerzos cortantes sobre la morfología y tamaño de los agregados: para biomazas superiores a 5 g/l ( fases exponencial y estacionaria) los agregados aumentaron su biomasa pero su tamaño y rugosidad estuvo limitada por los esfuerzos de corte del agitador.

#### 6.4.5 Análisis conjunto biomasa-tamaño-dimensión fractal $D_A$

En la Figuras 6.27 a y b se aprecia el comportamiento conjunto de la concentración de biomasa, el tamaño y la dimensión fractal  $D_A$  de los agregados crecidos en matraces y biorreactor. En los matraces se presentó un comportamiento irregular y no existió una relación general entre la concentración de biomasa, el tamaño y  $D_A$ ; se identificaron cuatro zonas características: para biomazas menores a 4.5 g/l hubo una relación directa entre el peso seco, el área y  $D_A$  (las tres aumentaron), para biomazas hasta 7.5 g/l los agregados continuaron aumentando de tamaño pero disminuyó  $D_A$  (disminuyó la compactación), para pesos secos menores a 13.8 g/l se redujo el tamaño y la compactación de los agregados (inicio del rompimiento de los agregados por expansión celular), finalmente con biomazas superiores se llegó a la fase estacionaria en donde cayó levemente el tamaño pero  $D_A$  permaneció constante (continuo el rompimiento de los agregados pero este no afectó la compactación).

Los agregados del biorreactor presentaron un comportamiento homogéneo, se observan tres zonas: hasta un peso seco de 2.5 g/l la relación fue directa entre tamaño,  $D_A$  y biomasa (las tres aumentaron); entre 2.5 y 5 g/l creció el tamaño de los agregados y la compactación permaneció

constante ( $D_A$  permaneció constante), finalmente para biomazas superiores a 5 g/l el tamaño y  $D_A$  disminuyeron mostrando nuevamente el posible efecto del corte en esta parte del crecimiento; al final de la cinética se observó un pequeño aumento del tamaño y de  $D_A$  como consecuencia de la incorporación de agua o por una posible reagregación.

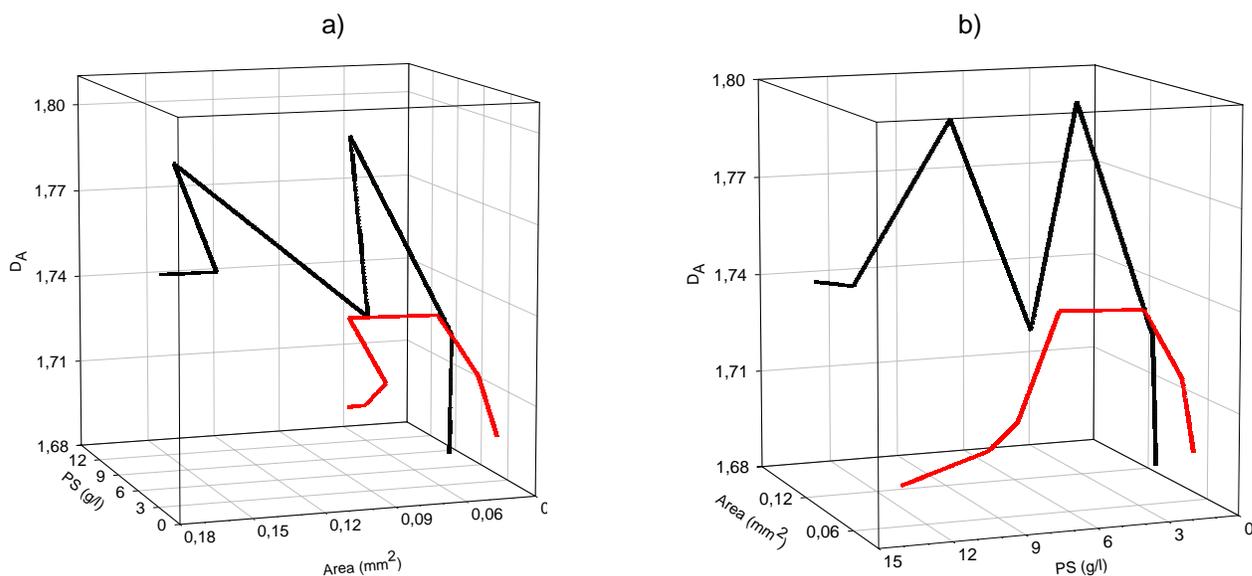


Figura 6.27 Relación entre la concentración de biomasa, el tamaño  $D_A$  de los agregados crecidos en matraces (—) y biorreactor (—). a) Vista frontal del área b) Vista frontal de la biomasa

### 6.5 Efecto del estrés hidrodinámico sobre las diferencias morfológicas y de dimensión fractal encontradas entre los cultivos crecidos en matraces y biorreactor

Se determinó si las interacciones partícula-remolino fueron las principales responsables del estrés hidrodinámico en el cultivo de las células de *Beta vulgaris* en el biorreactor, y como consecuencia de las diferencias encontradas entre los agregados crecidos en matraces y en el tanque. Se calculó el tamaño de los remolinos (escala de mezcla de Kolmogorov) para los agregados crecidos en matraces y biorreactor.

La entrada de potencia por unidad de volumen para los matraces ( $11 \text{ W/m}^3$ ) y el biorreactor ( $313 \text{ W/m}^3$ ) fue obtenida por (Juarez *et al.*, 2002) quienes trabajaron el cultivo de *Beta vulgaris* en condiciones similares a las trabajadas en este estudio. Los valores de otras propiedades de los caldos de cultivo fueron:

- Matraces:

Densidad: 1007 kg/m<sup>3</sup> (Doran, 1995)

Viscosidad: 1\*10<sup>-3</sup> kg/m s (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999)

- Biorreactor:

Densidad: 1007 Kg/m<sup>3</sup> (Doran, 1995)

Viscosidad:

Como el caldo tuvo un comportamiento pseudoplástico, se tomaron los valores extremos de la viscosidad (mínima: 1\*10<sup>-3</sup> kg/m s y máxima: 2.02\*10<sup>-2</sup> kg/m s) (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999)

Usando la ecuación 2.11 se obtuvieron los valores de la escala de Kolmogorov:

$$\lambda = \left( \frac{\left( \frac{1 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}}{1007 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}} \right)^3}{\left( \frac{11 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}}{1007 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}} \right)} \right)^{\frac{1}{4}} = 9.73 \cdot 10^{-5} \text{ m} = 97.3 \text{ } \mu\text{m} \text{ (matraces)}$$

De igual forma se obtuvieron los valores obtenidos para el reactor. En el Cuadro 6.9 se presentan los valores de la escala de Kolmogorov y los diámetros promedio de los agregados obtenidos en el presente trabajo.

*Cuadro 6.9 Escalas de mezcla de Kolmogorov y tamaños de agregados obtenidos en el crecimiento de Beta vulgaris en matraces y biorreactor*

	<b>Matraces</b>	<b>Biorreactor</b>	
Escala de Kolmogorov (μm)	97.3	42	398
Intervalo de tamaño de agregados (μm)	268 - 451	228 - 342	

Para los matraces el tamaño de los remolinos fue inferior al del tamaño de los agregados, indicando que las interacciones partícula – remolinos pudieron ser significativas en el daño por esfuerzos cortantes sobre los agregados. Por otro lado, al inicio del cultivo en el biorreactor

cuando la viscosidad era baja, el tamaño de los remolinos fue menor al tamaño de los agregados señalando que los esfuerzos de corte ocasionados por las interacciones células – remolinos pudieron ser los principales responsables del estrés hidrodinámico que experimentaron los agregados; sin embargo, a medida que las células crecieron el caldo de cultivo aumentó la viscosidad y al final del crecimiento el tamaño de los remolinos fue mayor que el de los agregados disminuyendo el efecto de las interacciones células – remolino sobre el estrés hidrodinámico de los mismos.

Aunque estos resultados muestran que el efecto del estrés hidrodinámico por interacción partícula-remolino pudo ser significativo sobre los agregados crecidos en matraces, esto no se vio reflejado en la morfología de los agregados, ya que estos presentaron grandes tamaños y alta rugosidad en la periferia. Por otro lado, este mecanismo tampoco explicó los resultados obtenidos en el biorreactor donde los agregados fueron pequeños y con baja rugosidad; pues la escala de mezcla de Kolmogorov no siempre fue menor al tamaño de los agregados, condición necesaria para atribuir los efectos hidrodinámicos a las interacciones partícula-remolino.

Las interacciones célula – remolino no son el único mecanismo responsable del daño celular por estrés hidrodinámico, hay otros mecanismos que pueden ser relevantes en el daño celular: colisión entre células, colisión de células con el agitador, colisión de células con las partes estacionarias del recipiente, generación de fuerzas de corte en las capas límite y estelas cerca de objetos sólidos en el reactor especialmente en el agitador, generación de fuerzas de corte cuando las burbujas se eleva en el líquido y rompimiento de las burbujas en la superficie del líquido.

Doran (1995) afirma que en el caso de cultivos con aireación (como en el presente estudio) el mecanismo de daño es diferente y está asociado con el estallamiento de las burbujas en la superficie ya que el rompimiento de la delgada película de burbuja y el rápido flujo desde el borde de ésta hacia el líquido genera altas fuerzas de corte capaces de dañar ciertos tipos de células. De esta manera es posible que este último mecanismo haya sido el responsable de las diferencias en la morfología y la dimensión fractal obtenidas entre los agregados crecidos en matraces y biorreactor.

## 7. CONCLUSIONES

- Se adecuó una metodología de análisis de imágenes que permitió medir la dimensión fractal de los agregados de *Beta vulgaris* crecidos en suspensión en matraces y biorreactor. Las condiciones establecidas fueron: adquisición de las imágenes con un microscopio estereoscópico al cual se le diseñó y construyó un sistema de platina y portamuestra, volumen de muestra de 0.5 ml diluidos con 3 ml de medio de cultivo acondicionado, objetivo de observación de 1X, análisis de imágenes sin editar y medición de 1000 agregados por cada muestra.
- Los agregados celulares de *Beta vulgaris* crecidos en matraces y en biorreactor presentaron comportamiento fractal manifestado a través de las dimensiones fractales  $D_P$  y  $D_A$ .
- Los agregados de *Beta vulgaris* no son autosimilares respecto de las escalas de observación analizadas, sugiriendo que la autoafinidad puede estar restringida a un intervalo de escalas de observación pequeño.
- El crecimiento de los agregados fue más rápido en los matraces ( $\mu = 0.1833 \text{ d}^{-1}$ ) que en el biorreactor ( $\mu = 0.1721 \text{ d}^{-1}$ ) alcanzándose biomásas de 13.66 g PS/l en los matraces y 12.84 g PS/l en el biorreactor en cinéticas que duraron 18 días.
- La dimensión fractal  $D_P$  osciló entre 1.24 - 1.314 en matraces, y entre 1.204 - 1.284 en biorreactor, indicando que en general los agregados crecidos en matraces presentaron un perímetro más sinuoso que los del biorreactor.
- La dimensión fractal  $D_A$  cambió entre 1.692 - 1.797 en matraces, y entre 1.691 - 1.738 en biorreactor; señalando que los agregados crecidos en el biorreactor fueron menos compactos y más ramificados que los obtenidos en matraces.
- Las diferencias encontradas en el tamaño y en  $D_P$  y  $D_A$  entre los agregados crecidos en matraces y biorreactor son el reflejo de las diferentes condiciones de cultivo (principalmente esfuerzos cortantes) presentes en cada uno de estos sistemas.
- Existen relaciones entre la concentración de biomasa, el tamaño de los agregados y las dimensiones fractales  $D_P$  y  $D_A$  para los agregados crecidos en matraces y biorreactor.
- Los perfiles de las curvas de biomasa contra tamaño de los agregados son similares para

matraces y biorreactor, aunque los tamaños en los matraces siempre fueron mayores a los alcanzados en el biorreactor.

- La relación entre la biomasa,  $D_P$  y  $D_A$  para los agregados crecidos en matraces fue diferente a la obtenida para los agregados en el biorreactor, como consecuencia de los diferentes ambientes hidrodinámicos que experimentaron los agregados.
- El mecanismo de las interacciones célula – remolino no es aplicable para explicar las diferencias en morfología y dimensiones fractales encontradas entre los agregados crecidos en matraces y biorreactor.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahammer, H., T. T. J. Devaney and H. A. Tritthart. 2001. Fractal dimension for a cancer invasion model. *Fractals* 9: 61-76.
- Alamilla-Beltrán, L., J. J. Chanona-Pérez, A. R. Jiménez-Aparicio, and G. F. Gutiérrez-López. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering* 67: 179-184.
- Amaral, A. L., M. A. Pereira, M. da Motta, M. N. Pons, M. Mota, E.C. Ferreira and M.M. Alves. 2004. Development of image analysis techniques as a tool to detect and quantify morphological changes in anaerobic sludge: II. Application to a granulate deterioration process triggered by contact with oleic acid. *Biotechnology and Bioengineering* 87: 194-199.
- Araya-Kroff, P., A.L. Amaral, L. Neves, E. C. Ferreira, M. N. Pons, M. Mota and M. M. Alves. 2004. Development of image analysis techniques as a tool to detect and quantify morphological changes in anaerobic sludge: I. Application to a granulation process. *Biotechnology and Bioengineering* 87: 184-193.
- Arenas-Ocampo, M.L., G. Salcedo-Morales, G. Trejo-Tapia, M. Rodríguez-Monroy y A. Jiménez-Aparicio. 2004. Mecanoquímica de la pared de células vegetales cultivadas in vitro sometidas al proceso de permeabilización. *Biótica* 1: 34-42.
- Barletta, B. J. and G. V. Barbosa-Cánovas. 1993. Fractal analysis to characterize ruggedness changes in tapped agglomerated food powders. *Journal of Food Science* 58: 1030-1046.
- Bellouti, M., M. Alves, J. M. Novais and M. Mota. 1997. Flocs vs granules: differentiation by fractal dimension. *Water Research* 31: 1227-1234.
- Bernard, F., J. Bossu and S. Gaillard. 2001. Identification of living oligodendrocyte developmental stages by fractal analysis of cell morphology. *Journal of Neuroscience Research* 65: 439-445.
- Berzin, I., B. Cohen, D. Mills, I. Dinstein and J. C. Merchuk. 2000. RHIZOSCAN: A semiautomatic Image processing system for characterization of the morphology and secondary metabolite concentration in hairy root cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 70: 17-24.
- Bower, C., C. Washington and T. S. Purewal. 1997. the use of image analysis to characterize aggregates in a shear field. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 127: 105-112.
- Buczowski, S., P. Hildgen and L. Cartilier. 1998. Measurements of fractal dimension by box-counting: a critical analysis of data scatter. *Physica A* 252: 23-34.
- Büchs, J., U. Maier, C. Milbradt and B. Zoels. 2000. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flask at low liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering* 68: 589-593.

- Burrough, P. A. 1981. Fractal dimension of landscapes and other environmental data. *Nature* 294: 240-242.
- Byrne, E. P., J. J. Fitzpatrick, L. W. Pampel and N. J. Titchener-Hooker. 2002. Influence of shear on particle size and fractal dimension of whey protein precipitates: implications for scale-up and centrifugal clarification efficiency. *Chemical Engineering Science* 57: 3767-3779.
- Calet, P. J. C., R. G. J. M. van der Lans and K. Ch. A. M. Luyben. 1996. Hydrodynamical interactions between particles and liquid flows in biochemical applications. *The Chemical Engineering Journal* 62: 193-206.
- Cazalé, A., M. Rouet-Mayer, H. Barbier-Brygoo, Y. Mathieu and C. Laurière. 1998. Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspension. *Plant Physiology* 116: 659-669.
- Cohen, I., I. Goldin, Y. Kozlovsky and E. Ben-Jacob. 1999. Continuous and discrete models of cooperation in complex bacterial colonies. *Fractals* 7: 235-247.
- Chakraborti, R. K., J. F. Atkinson and J. E. Van Benschoten. 2000. Characterization of alum floc by image analysis. *Environmental Science and Technology* 34: 3969-3976.
- Chakraborti, R.K., K. H. Gardner, J. F. Atkinson and J. E. Van Benschoten. 2003. Changes in fractal dimension during aggregation. *Water Research* 37: 873-883.
- Chanona P., J., L. Alamilla B. y G. F. Gutiérrez L. 2001. Caos y geometrías de fractales, herramientas auxiliares para evaluar la complejidad del entorno biológico. *Biotecnología* 5: 117-125.
- Chanona P., J. J., L. Alamilla B., R. R. Farrera R. R. Quevedo, J.M. Aguilera and G.F. Gutiérrez L. 2003. Description of the convective air-drying of a food model by means of the fractal theory. *International Journal of Food Science and Technology* 9: 207-213.
- Chattopadhyay, S., A. K. Srivastava, S. S. Bhojwani and V. S. Bisaria. 2002. Production of Podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93: 215-220.
- Chawla, H. S. 2000. Introduction To Plant Biotechnology. Science Publising, Inc. Enfield (NH), USA.
- Da Motta, M., M. Pons, N. Roche and H. Vivier. 2001. Characterization of activated sludge by automated image analysis. *Biochemical Engineering Journal* 9: 165-173.
- Dathe, A., S. Eins, J. Niemeyer and G. Gerold. 2001. The surface fractal dimension of the soil-pore interface as measured by image analysis. *Geoderma* 103: 203-229.
- Dong, P. 2000. Test of a new lacunarity estimation method for image texture analysis. *International Journal of Remote Sensing* 21: 3369-3373.
- Doran, P. M. 1995. Bioprocess Engineering Principles. Academic Press, London, Ca.
- Dupont, W. D and W. D. Plumer. PS: Power and Sample Size Calculation. 2004. [En línea]. Disponible: <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize> , 4 de agosto de 2004.

- Fadda, G.C. D. Lairez. 2002. Evidence for a rigid structure in lysozyme fractal aggregates. *Physica A* 304: 271-275.
- Fedorov , B. A., B. B. Fedorov and P. W. Schmidt. 1993. An analysis of the fractal properties of the surfaces of globular proteins. *Journal of Chemical Physics* 99: 4076-4083.
- Feliz, G., M. Regenass and T . Boller. 2000. Sensing of osmotic pressure changes in tomato cells. *Plant Physiology* 124: 1169-1179.
- Filippov , A. V., M. Zurita and D. E. Rosner. 2000. Fractal-like aggregates: relation between morphology and physical properties. *Journal of Colloid and Interface Science* 229: 261-273.
- Foroutan-pour, K., P . Dutilleul and D.L. Smith. 1999. Advances in the implementation of the box-counting method of fractal dimension estimation. *Applied Mathematics and Computation* 105: 195-210.
- Gamborg, O., R. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- González, R. C., R. E. Woods and S. L. Eddins. 2004. Digital Image Processing Using MATLAB. Prentice Hall, New Jersey.
- Gorczyca, B. and J. Ganczarczyk. 1996. Image analysis of alum coagulated mineral suspensions. *Environmental Technology* 17: 1361-1369.
- Guan, J., T. D. Wait, R. Amal H. Bustamante and R. Wukasch. 1998. Rapid determination of fractal structure of bacterial assemblages in wastewater treatment: implications to process optimisation. *Water Science and Technology* 38: 9-15.
- Guez, J. S., J. Ph. Cassar, F. Wartelle, P. Dhulster and H. Suhr. 2004. Real time in situ microscopy for animal cell-concentration monitoring during high density culture in bioreactor. *Journal of Biotechnology* 111: 335-343.
- Hagiwara, T., H. Wang, T. Suzuki and R. Takai. 2002. Fractal analysis of ice crystals in frozen food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3085-3089.
- Hanagata, N., A. Ito, H. Uehara F. Asari, T. Takeuchi, and I. Karube. 1993. Behavior of cell aggregate of *Carthamus tinctorius L.* cultured cells and correlation with red pigment formation. *Journal of Biotechnology* 30: 259-269.
- Hay, G. J., T. Blaschke, D. J. Marceau and A. Bouchard. 2003. A comparison of three image-object methods for the multiscale analysis of landscape structure. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* 57: 327-345.
- Heydarian, S. M., A. P. Ison, M. D. Lilly and P. A. Ayazi. 2000. Turbulent breakage of filamentous bacteria in mechanically agitated batch culture. *Chemical Engineering Science* 55: 1775-1784.
- Huang, H. 1994. Fractal properties of flocs formed by fluid shear and differential settling. *Physic Fluids* 10: 3229-3234.

- Hulst, A. C., M. M. T. Meyer, H. Breteler and J. Tramper. 1989. Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiophene production and cell growth. *Current Advances in Applied Microbiology and Biotechnology* 30: 18-25.
- Ibaraki, Y. and K. Kenji. 2001. Application of image analysis to plant cell suspension cultures. *Computers and Electronics in Agriculture* 30: 193-203.
- Jianfeng, X., S. Zhiguo and F. Pusun. 1998. Suspension culture of compact callus aggregate of *Rhodiola sachalinensis* for improved salidroside production. *Enzyme and Microbial Technology* 23: 20-27.
- Jiménez-Aparicio, A., G. Gutiérrez-López y M. Rodríguez-Monroy. 1996. Caracterización reológica e hidrodinámica del cultivo de células de betabel (*B. vulgaris* L.) productoras de betalaínas en un biorreactor tipo tanque agitado, pp: 105-112. En: M. Hübinge, F. Murr y J. Aguilera (eds.). Propiedades físicas de los alimentos, Tomo I. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Jiménez A., A. y G. Gutiérrez. 1999. Production of food related colorants by culture of plant cells: The case of betalains. *Advances in Experimental Medicine and Biology*:195-210.
- Jin, B., B. Wilén and P. Lant. 2003. A comprehensive insight into floc characteristics and their impact on compressibility and settleability of activated sludge. *Chemical Engineering Journal* 95: 221-234.
- Jin, B., B. Wilén and P. Lant. 2004. Impact of morphological, physical and chemical properties of sludge flocs on dewaterability of activated sludge. *Chemical Engineering Journal* 98: 115-126.
- Juárez S., M., A. Jiménez-Aparicio, G. Gutiérrez L., G. Trejo T. and M. Rodríguez-Monroy. 2002. Broth rheology of *Beta vulgaris* cultures growing in an air lift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 12: 37-41.
- Kang, M., Y. Zeng and J. Liu. 2000. Fractal research on red blood cell aggregation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 22: 229-236.
- Kebler, M., H. J. G. ten Hoopen and S. Furusaki. 1999. The effect of the aggregate size on the production of ajmalicine and tryptamine in *Catharanthus roseus* suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 308-315.
- Kenkel, N. C. and D.J. Walker. Fractals in the biological sciences. 1996. [En línea] Disponible: <http://www.umanitoba.ca/faculties/science/botany/labs/ecology/fractals/fractal.html>, 2 de julio de 2003.
- Kieran, P. M., P. F. MacLoughlin and D. M. Malone. 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology* 59: 39-52.
- King, P. J. and H. E. Street. 1973. Growth patterns in cell cultures. pp: 269-337. En: H. E. Street (Ed). Plant tissue and cell culture (Botanical monographs). University of California Press, USA.
- Le Bon, C., T. Nicolai and D. Durand. 1999. Growth and structure of aggregates of heat-denatured B-lactoglobulin. *International Journal of Food Science and Technology* 34: 451-465.

- Logan, B. E. and D. B. Wilkinson. 1991. Fractal dimensions and porosities of *Zoogloea ramigera* and *Saccharomyces cerevisiae* aggregates. *Biotechnology and Bioengineering* 38: 389-396.
- Lovejoy, S. 1982. Area-perimeter relation for rain and cloud areas. *Science* 216: 185-187.
- Mandelbrot, B. B., D. E. Passoja and A. J. Paullay. 1984. Fractal character of fracture surfaces of metals. *Nature* 308: 721-722.
- Mandelbrot, B. B. 2003. La Geometría Fractal de la Naturaleza. Tusquets Editores, Barcelona.
- Martínez-López, F., M. A. Cabrerizo-Vílchez and R. Hidalgo-Álvarez. 2001. An improved method to estimate the fractal dimension of physical fractals based on the Hausdorff definition. *Physica A* 298: 387-399.
- Mas, S. and C. Ghommidh. 2001. On line size measurement of yeast aggregates using image analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 76: 91-98.
- McDonald, K., A. P. Jackman and S. Hurst. 2001. Characterization of plant suspension cultures using the focused beam reflectance technique. *Biotechnology Letters* 23: 317-324.
- Meijer, J. J., H. J. G. ten Hoopen, Y. M. van Gameren, K. Ch. A. M. Luyben and K. R. Libbenga. 1994. Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in por lotes and continuous culture. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 467-477.
- Meyer, J. E., M. -F. Pépin and M. A. L. Smith. 2002. Anthocyanin production form *Vaccinum pahalae*: limitations of the physical microenvironment. *Journal of Biotechnology* 93: 45-57.
- Miranda, L. 2003. Análisis de imágenes para la medición de viabilidad y morfología de cultivos de *Beta vulgaris* y *Cinchona robusta*. Tesis de maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, México.
- Miyanaga, K., M. Seki and S. Furusaki. 2000b. Quantitative determination of culture strawberry-cell heterogeneity by image analysis: effects of medium modification on anthocyanin accumulation. *Biochemical Engineering Journal* 5: 201-207.
- Miyanaga, K., M. Seki and S. Furusaki. 2000a. Analysis of pigment accumulation heterogeneity in plant cell population by image-processing system. *Biotechnology and Bioengineering* 67: 494-497.
- Nikon. 2002. Stereoscopic Zoom Microscope SMZ1500. Nikon, Japan.
- Ontiveros, J. 1994. Aislamiento de líneas celulares de *Beta vulgaris* productoras de betalaínas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Ortiz M., U. y M. D. Hinojosa R. 1998. Geometría de fractales y autoafinidad en ciencias de materiales. *Ingenierías* 1: 15-21.
- Panda, A. K., S. Mishra, V. S. Bisaria and S. S. Bhojwani. 1989. Plant cell reactors-a perspective. *Enzyme and Microbial Technology* 11: 386-397.
- Peleg, M. 1993. Fractals and foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33: 149-165.

- Peleg, M. and M. D. Normand. 1985. Characterization of the ruggedness of instant coffee particle shape by natural fractals. *Journal of Food Science* 50: 829-831.
- Peña, C., C. Reyes, P. Larralde-Corona, G. Corkidi and E. Galindo. 2002. Characterization of *Azobacter vinelandii* aggregation in submerged culture by digital image analysis. *FEMS Microbiology Letters* 207: 173-177.
- Pépin, M., J. Archambault, C. Chavarie and F. Cormier. 1995. Growth kinetics of *Vitis vinifera* cell suspension cultures: I. Shake flask cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 47: 131-138.
- Pépin, M. F., M. A. L. Smith and J. F. Reid. 1999. Application of imaging tools to plant cell culture relationship between plant cell aggregation and flavonoid production. *In Vitro Cellular and Developmental Biology, Plant* 35: 290-295.
- Pinto, L. S., L. M. Vieira, M.N. Pons, M. M. R. Fonseca and J. C. Menezes. 2004. Morphology and viability analysis of *Streptomyces clavuligerus* in industrial cultivation systems. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26: 177-184.
- Puertas, A. M., A. Fernández-Barbero and F. J. de las Nieves. 2001. Colloidal aggregation induced by attractive interactions. *Journal of Chemical Physics* 115: 5662-5668.
- Quevedo, R., C. López-G, J. M. Aguilera and L. Cadoche. 2002. Description of food surfaces and microstructural changes using fractal image texture analysis. *Journal of Food Engineering* 53: 361-371.
- Rahman, M. S. 1998. Physical meaning and interpretation of fractal dimensions of fine particles measured by different methods. *Journal of Food Engineering* 32: 447-456.
- Richard, C., M. Lescot, D. Inzé and L. De Veylder. 2002. Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 167-176.
- Robinson, D. J. and J. C. Earnshaw. 1992. Experimental study of colloidal aggregation in two dimensions: I. Structural aspects. *Physical Review A* 46: 2045-2053.
- Rodríguez-Monroy, M. and E. Galindo. 1999. Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 687-693.
- Ruprecht, A. and J. Thieme. 2000. The use of box-counting dimension for characterization of the aggregation of colloidal hematite. pp: 329. Sixth International Conference of X-Ray Microscopy. Berkeley. American Institute of Physics, USA.
- Russell, B. L., B. Rathinasabapathi and A. D. Hanson. 1998. Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiology* 116: 859-865.
- Stafford, A., P. Morris and M. W. Fowler. 1986. Plant cell biotechnology: a perspective. *Enzyme and Microbial Technology* 8: 578-587.

- Stella, A. and M. R. Braga. 2002. Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 68: 271-276.
- Suzuki, T. and T. Yano. 1990a. Fractal surface structure of food materials recognized by different molecules. *Agriculture Biology Chemistry* 54: 967-971.
- Suzuki, T. and T. Yano. 1990b. Fractal structure analysis of some food materials. *Agriculture Biology Chemistry* 54: 3131-3135.
- Talanquer, V. 2002. Fractus, Fracta, Fractal: Fractales de Laberintos y Espejos. Fondo de Cultura Económica, México.
- Tam, C. M., T. Matsuura and A. Y. Tremblay. 1991. The fractal nature of membranes. *Journal of Colloid and Interface Science* 147: 206-212.
- Tanaka, M., A. Kayama, R. Kato and Y. Ito. 1999. Estimation of the fractal dimension of fracture surface patterns by box-counting method. *Fractals* 7: 335-340.
- Tang, S., Y. Ma and I. M. Sebastine. 2001. The fractal nature of *Escherichia coli* biological flocs. *Colloidal and Surfaces B: Biointerfaces* 20: 211-218.
- Tang, P. J.A. Raper. 2002. Modelling the settling behaviour of fractal aggregates-a review. *Power Technology* 123: 114-125.
- Thomas, C. L. and G. C. Paul. 1996. Applications of image analysis in cell technology. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 35-45.
- Trejo-Tapia, G., A. Jiménez-Aparicio, M. Rodríguez G. Sepúlveda, G. Salcedo, B. Martínez, G. Gutiérrez and A. de Jesús. 1999. Influence of medium constituents on growth and betalain production in cell suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 7: 167-172.
- Trejo-Tapia, G., A. Jiménez-Aparicio, L. Villareal and M. Rodríguez. 2001. Broth rheology and morphological analysis of *Solanum chrysotrichum* cultivated in a stirred tank. *Biotechnology Letters* 23: 1943-1946.
- Trejo-Tapia, G., R. Hernández-Trujillo, J. L. Trejo-Espino, A. Jiménez-Aparicio and M. Rodríguez-Monroy. 2003. Analysis of morphological characteristics of *Solanum chrysotrichum* cell suspension cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 929-932.
- Tucker, K. G., S. Chalder, M. Al-Rubeai and C. R. Thomas. 1994. Measurement of hybridoma cell number, viability and morphology using fully automated image analysis. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 29-35.
- Vega A., L. 2003. Búsqueda automatizada de células en división (metafases) por medio de la caracterización de su textura. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Vormoor, J. and J. Thieme. 2000. Reorganization of clusters in cluster-cluster-aggregation. pp: 250. Sixth International Conference of X-Ray Microscopy. Berkeley. American Institute of Physics, USA.

Yano, T. 1996. Fractal nature of food materials. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60: 739-744.

Yeoman, M. M. and H. E. Street. 1973. General cytology of cultured cells. pp: 121-160. En: H. E. Street (Ed). *Plant tissue and cell culture (Botanical monographs)*. University of California Press, USA.