VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Morfometría de microorganismos mediante difracción y análisis fractal

Morphometry of microorganisms using diffraction and fractal analysis

Juan Carlos Ramírez Granados, César Díaz Pérez, María Fernanda Uribe Tabares, Amalia Lilia López González y José Francisco Serrano Aramburo

Departamento de Ingenierías de la División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Universidad de Guanajuato
jcramirez@ugto.mx

Resumen

En este trabajo se analizaron las características morfológicas de microorganismos, tales como levaduras, bacterias y hongos, mediante difracción de Fraunhofer, procesamiento digital de imágenes y análisis fractal, con la finalidad de identificarlos y clasificarlos. Con este propósito se determinó el tamaño de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* a través de discos de Airy y su relación con el tamaño de los microorganismos. También se obtuvieron los principales descriptores de forma de bacterias gram positivas y negativas mediante el procesamiento digital de micrografías. Estos descriptores de forma incluyeron el área, perímetro, circularidad y relación de aspecto de las bacterias. Adicionalmente, se analizaron micrografías de varios hongos filamentosos y se determinó su dimensión fractal con la intención de evaluar su crecimiento y eficiencia para ocupar el espacio disponible. La determinación de las características morfológicas de los microorganismos mediante procesamiento digital de imágenes agiliza el análisis de grupos numerosos de microorganismos y facilita su clasificación, evaluación del crecimiento y posibilita la identificación de procesos de gemación.

Palabras clave: Morfometría; microorganismos, procesamiento digital de imágenes; difracción; análisis fractal.

Introducción

La morfometría de microorganismos, es decir, la cuantificación sistemática de sus descriptores de forma, tamaño y organización espacial, constituye el fundamento de la identificación fenotípica en bacteriología, micología clínica y biotecnología industrial. Cocos, bacilos, levaduras y hongos filamentosos se distinguen primariamente por atributos geométricos cuantificables: la circularidad, la relación de aspecto (AR), el área proyectada, el perímetro y la relación entre los ejes de la célula o la colonia. La identificación correcta de esos morfotipos determina decisiones que van desde el control de procesos fermentativos hasta el diagnóstico clínico de infecciones.

La observación macroscópica de colonias, complementada con pruebas bioquímicas y microscopía convencional, ha sido el recurso histórico, pero existen algunas limitaciones. Las combinaciones posibles entre categorías morfológicas generan patrones de difícil clasificación inequívoca (Arango *et al.,* 2013). La medición morfométrica manual bajo microscopio es subjetiva, de bajo rendimiento estadístico y difícil de estandarizar entre operadores; la inspección visual de una población celular heterogénea requiere tiempo proporcional al número de células analizadas y produce estimaciones con alta variabilidad inter-observador. Las técnicas moleculares introducen variabilidad adicional por la enzima polimerasa, el protocolo de extracción de ácidos nucleicos y las condiciones de ciclado térmico, lo que afecta la reproducibilidad entre laboratorios (Bustin *et al.,* 2009; Arango *et al.,* 2013). Muchas técnicas moleculares requieren además un procesamiento destructivo de la muestra, lo que limita o impide el seguimiento temporal de un mismo cultivo (Arango *et al.,* 2013). Para hongos filamentosos, la dificultad se agudiza: la densidad euclidiana promedia la heterogeneidad espacial del cultivo y oculta variaciones locales de relevancia biológica, en particular las estructuras miceliales intermedias entre filamento libre y pellet compacto que no son bien descritas por parámetros como el área o la compacidad (Papagianni, 2006).

El procesamiento digital de imágenes ofrece ventajas cuantitativas sobre los métodos convencionales. Automatiza la extracción de descriptores morfológicos sobre poblaciones de cientos de células

simultáneamente, eliminando la variabilidad inter-observador e incrementando la potencia estadística sin aumentar el tiempo de análisis. No destruye la muestra y permite el seguimiento temporal del mismo cultivo. Para estructuras biológicas de complejidad irregular como el micelio filamentoso, la dimensión fractal (D_f) aporta un índice cuantitativo de complejidad espacial; que los descriptores euclidianos clásicos no capturan y que es sensible a la arquitectura micelial y a su relación con la actividad metabólica (Papagianni, 2006). Los métodos ópticos no destructivos amplían aún más esas capacidades: la difracción de luz láser convierte la forma, el tamaño y el índice de refracción de una célula en un patrón de difracción cuantificable y específico, sin contacto con la muestra (Arango *et al.,* 2013).

En este trabajo se analizaron las características morfológicas de microorganismos, tales como levaduras, bacterias y hongos mediante difracción de Fraunhofer, procesamiento digital de imágenes y análisis fractal con la finalidad de identificarlos y clasificarlos. Con este propósito se determinó el tamaño de levaduras a través de la generación de discos de Airy y su relación con el radio de las células, ya que la posición del primer mínimo de intensidad del patrón óptico proporciona una firma no-destructiva del tamaño celular y es sensible a la dinámica de crecimiento y al estado fisiológico de la población. También se obtuvieron los principales descriptores de forma de bacterias Gram positivas y negativas mediante análisis digital de micrografías. Estos descriptores, que incluyeron el área, perímetro, circularidad y relación de aspecto, traducen la heterogeneidad visual de la micrografía en métricas matemáticas capaces de diferenciar cambios en la pared celular, elongaciones asociadas a distintos estados metabólicos y la transición morfológica entre morfotipos. Adicionalmente, se analizaron micrografías de hongos filamentosos y se determinó su dimensión fractal con la intención de evaluar su crecimiento y eficiencia para ocupar el espacio disponible a través de la D_f que cuantifica el grado de ramificación, la autosemejanza y la intrincación geométrica del micelio, lo que representa directamente su eficiencia metabólica, la transferencia local de masa y oxígeno, y su estrategia adaptativa para colonizar el sustrato. La determinación de las características morfológicas de los microorganismos mediante procesamiento digital de imágenes ayuda a automatizar el análisis de grupos numerosos de microorganismos y facilita su análisis.

Marco teórico

Difracción de Fraunhofer y discos de Airy

Los descriptores de forma de un objeto difractante se manifiestan físicamente en el patrón de luz que ese objeto proyecta cuando es atravesado por un haz coherente. El régimen de Fraunhofer se establece cuando la distancia entre el objeto y el plano de observación supera con margen suficiente tanto las dimensiones del objeto como la longitud de onda (λ); bajo esa condición, los frentes de onda en el detector son tratables como planos. Una célula opera como una abertura oclusiva circular cuya función de transmitancia $t(\xi, \eta)$ determina, por transformada de Fourier, la distribución de intensidad del patrón difractado. Para una apertura circular de radio *r*, la evaluación analítica de esa transformada produce el patrón de anillos de Airy cuya distribución de intensidad es:

$$I(\theta) \propto \left(\frac{2J_{1(x)}}{x}\right)^2 \qquad \text{Ec. 1}$$

donde $x = \frac{2\pi r \sin\theta}{\lambda}$. El primer cero de J_1 cae en x ≈ 3.8317, de donde se extrae el factor 1.22 de la ecuación fundamental de difracción circular:

$$r = \frac{1.22\lambda L}{d} \qquad \text{Ec. 2}$$

donde *d* es el diámetro del primer anillo oscuro en el patrón de difracción, *L* es la distancia entre la muestra y la pantalla de proyección, y *λ* es la longitud de onda de la fuente coherente. Esta relación vincula directamente el radio r de la célula con magnitudes ópticas medibles. Aquí, la ecuación 2 se aplica a levaduras individuales cuya geometría aproximadamente esférica permite la aplicación del modelo.

Procesamiento digital de micrografías de bacterias

El procesamiento computacional de micrografías digitales proporciona la caracterización morfométrica directa de poblaciones bacterianas. La rutina parametrizada en ImageJ extrae descriptores de forma de modo automatizado desde imágenes de microscopía de campo claro, igualando la precisión de la medición manual experta (Cabral *et al.,* 2026; Nai *et al.,* 2021). El empleo de un objetivo de inmersión de alta apertura numérica (AN), optimizado para trabajar a 100x, proporciona el límite de resolución física indispensable: el criterio de Rayleigh fija ese umbral entre 0.2 y 0.3 µm, resolución necesaria para delimitar con precisión los contornos celulares individuales. Sobre esas micrografías, la rutina extrae cuatro descriptores euclidianos por célula: área proyectada, perímetro, circularidad (razón entre su área y la de un círculo de igual perímetro) y relación de aspecto (cociente entre el eje mayor y el eje menor de la elipse equivalente ajustada). Estos cuatro descriptores traducen la heterogeneidad visual de la micrografía en métricas matemáticas objetivas. La circularidad captura desviaciones de la esfericidad ideal propias de diferentes estados de la pared celular o de la formación de diplococos en morfotipos cocoides; un coco perfecto se aproxima al valor máximo de 1, mientras que cualquier elongación lo reduce. La relación de aspecto discrimina morfotipos con mayor sensibilidad a la elongación: en bacilos, el eje mayor supera significativamente al eje menor, produciendo valores distintos de los observados en cocos. El área proyectada captura diferencias de tamaño celular entre cepas y estadios del ciclo de crecimiento. El perímetro es sensible a la rugosidad del contorno, que varía con el estado de la pared celular y las condiciones del cultivo. Juntos, los cuatro descriptores permiten identificar cambios plásticos en la morfología bacteriana, la transición entre morfotipos, y patrones poblacionales asociados a procesos de división celular. Cabral *et al*. (2026) validaron que descriptores morfométricos automatizados sobre imágenes de campo claro de levaduras de fisión detectan adaptaciones geométricas inducidas por estrés ambiental con precisión estadística comparable a la medición manual, lo que sustenta la robustez del principio de medición para poblaciones de morfología variada. El preprocesamiento de la imagen determina la validez estadística de los descriptores. La umbralización binariza una imagen suavizada. En cultivos donde las bacterias forman pares, cadenas o racimos, la binarización simple fusiona contornos adyacentes; sin embargo, el algoritmo Watershed delimita células contiguas individuales.

Análisis fractal y dimensión fractal del micelio de hongos filamentosos

Los descriptores euclidianos de la sección anterior resultan inadecuados para estructuras biológicas ramificadas e irregulares. En el micelio fúngico, el área y el perímetro dejan de ser propiedades intrínsecas porque su valor numérico depende de la escala de medición elegida. La geometría fractal resuelve esa limitación; la dimensión fractal D_f cuantifica el grado en que una estructura ocupa el espacio que la contiene, tomando valores no enteros entre 1 para una línea simple y cercanos a 2 para estructuras ramificadas de complejidad creciente. En el micelio filamentoso, la D_f captura el grado de ramificación hifal, la autosemejanza del patrón de crecimiento y la intrincación geométrica de la red de hifas, parámetros que representan directamente la eficiencia metabólica del hongo, su capacidad de transferencia local de masa y oxígeno, y su estrategia adaptativa para colonizar el espacio disponible (Papagianni, 2006).

El procedimiento para estimar D_f en una imagen biológica binarizada de micelio es el conteo de cajas, implementado en ImageJ mediante la herramienta Fractal Box Counter (Nai *et al.,* 2021). Una retícula de cajas cuadradas de lado ε se superpone sobre la imagen y se contabiliza N(ε), el número de cajas que contienen al menos un píxel de la estructura. Al repetir con tamaños decrecientes (potencias de dos: 2, 4, 8, 16, 32 y 64 píxeles), la relación entre ε y N(ε) sigue la ley de potencias:

$$N(\varepsilon) \propto \varepsilon^{-D_f} \qquad \text{Ec. 3}$$

La transformación logarítmica produce una relación lineal entre log N(ε) y log ε cuya pendiente en valor absoluto corresponde a D_f . El coeficiente de determinación R^2 del ajuste log-log valida la naturaleza fractal del objeto analizado.

La aplicación directa del conteo de cajas sobre imágenes binarizadas de micelio sin preprocesamiento mezcla dos magnitudes conceptualmente distintas: la dimensión fractal del contorno, D_{BS} (rugosidad del borde externo), y la dimensión fractal de masa, D_{BM} (patrón de ramificación y distribución espacial en el plano). La esqueletización reduce cada filamento a una línea de un píxel de ancho preservando la topología de las ramificaciones; sobre el esqueleto, el conteo de cajas estima únicamente D_{BS}. Papagianni (2006) documentó con datos cuantitativos sobre *Aspergillus niger* que los pellets compactos alcanzan D_{BS} entre 2.20 y 2.50 y D_{BS} entre 1.55 y 1.62, mientras que el micelio filamentoso disperso converge en D_{BM} @ D_{BS} @ 1.21 -1.30

(fractal de masa puro). Esta separación permite usar D_{BS} como indicador de la complejidad arquitectónica del micelio sin que el grosor variable de las hifas distorsione la estimación (Papagianni, 2006). En el contexto del presente trabajo, actúa como índice cuantitativo que vincula la complejidad geométrica espacial observada en las micrografías de hongos con su dinámica de crecimiento y su eficiencia para ocupar el espacio disponible.

Metodología

Material biológico

Los microorganismos analizados fueron levaduras *Saccharomyces cerevisiae*; hongos filamentosos *Aspergillus niger, Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum* y *Alternaria sp*; así como rizobacterias con códigos internos 104, 265 y 318 conservadas en la colección de microorganismos del Laboratorio de Investigación de la Universidad de Guanajuato, campus Celaya-Salvatierra, sede Mutualismo.

Estimación del radio celular mediante difracción de Fraunhofer

Se preparo una solución acuosa con *S. cerevisiae* al 1% (p/v) utilizando 1 L de agua destilada. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas en factores de 10 hasta obtener una dilución final de 10^{-6} células/ml. Cada dilución se transfirió a tubos Falcon estériles, los cuales se etiquetaron según su concentración y se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

El montaje del sistema de proyección se realizó utilizando una caja oscura. En el interior de la caja se colocó un soporte universal con 2 pinzas para bureta, puestas verticalmente una sobre la otra y separadas 1 cm entre sí. En la base de la caja se acondicionó una pantalla de proyección blanca con una escala para facilitar las mediciones. Ver Figura 1.

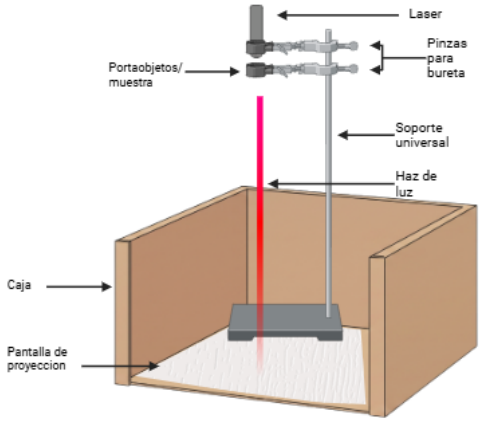


Figura 1. Esquema del sistema de proyección empleado para la obtención de los patrones de difracción.

Las muestras se prepararon colocando una gota de la dilución correspondiente sobre un portaobjetos mediante una pipeta Pasteur, en los extremos cortos del portaobjetos se colocaron separadores de 0.5 cm de altura, sobre estos se fijó un segundo portaobjetos. El conjunto de portaobjetos y la muestra se fijaron con la pinza inferior del soporte universal, procurando evitar derramar el líquido. En la pinza superior se fijó un diodo láser, alineándolo de manera que el haz de luz incidiera perpendicularmente sobre la muestra, para el estudio se utilizaron dos láseres con longitudes de onda de 657 y 516 nm. Una vez alineado el sistema, se apagaron completamente las fuentes de iluminación de la habitación para favorecer la observación del patrón de difracción.

Al atravesar la muestra, el haz láser generó patrones de difracción correspondientes a los discos de Airy, los cuales fueron registrados mediante fotografías digitales que posteriormente se analizaron con el software ImageJ, donde se determinó el diámetro del primer anillo oscuro de cada disco observado. Finalmente se calculó el radio de la partícula a la que pertenece cada patrón de discos mediante la Ec. 2.

Análisis fractal de micelio fúngico

Se preparó el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez esterilizado y alcanzada la temperatura adecuada para la manipulación, se vertió el medio en cajas Petri estériles dentro de una campana de flujo laminar. Después de la solidificación del medio, se procedió a inocularlo con el micelio de cada uno los hongos. El inoculo se obtuvo mediante un sacabocados previamente esterilizado en la llama de un mechero, con el cual se extrajo un disco de micelio. Cada disco se colocó cuidadosamente en el centro de una caja Petri con medio PDA. Posteriormente cada caja fue sellada y etiquetada con nombre la cepa correspondiente y la fecha de inoculación. Finalmente, las cajas inoculadas se incubaron a 27°C.

El registro fotográfico del crecimiento de los hongos filamentosos para su análisis fractal se realizó cada 24 horas durante los cinco días posteriores a la inoculación. Las imágenes se capturaron utilizando la cámara con un aumento fijo de 4X, manteniendo las mismas condiciones de captura en todas las mediciones para garantizar uniformidad.

Las imágenes de los micelios fueron procesadas mediante el software ImageJ. Inicialmente las imágenes se convirtieron a escala de grises de 8 bits. Luego, se aplicó un umbral de intensidad (Threshold) para eliminar el fondo y obtener imágenes binarias. Las imágenes resultantes fueron sometidas a un proceso de esqueletización, reduciendo las hifas a líneas de un píxel de grosor sin alterar la estructura ramificada. Finalmente, la dimensión fractal se determinó utilizando el complemento FracLac mediante el método de conteo de cajas. Los valores obtenidos de D_f se emplearon como indicador de la complejidad estructural del micelio, donde valores cercanos a 2 representan una colonización del espacio altamente eficiente.

Morfometría digital de bacterias

Las cepas bacterianas se cultivaron en medio PDA. Una vez esterilizado y enfriado a la temperatura adecuada para su manipulación, el medio se vertió en cajas Petri estériles dentro de una campana de flujo laminar. Tras la solidificación del medio, cada cepa se inoculó mediante la técnica de estriado. Las cajas se sellaron y etiquetaron con el código correspondiente de la cepa y la fecha de siembra. Posteriormente se incubaron a 30 °C durante 5 días. Al finalizar el periodo de incubación se agregaron 4 mL de solución salina estéril (NaCl al 0.9%) sobre la superficie del cultivo. Luego, las colonias se suspendieron mediante un barrido suave utilizando un asa bacteriológica estéril. La suspensión bacteriana se recuperó con una pipeta estéril y se transfirió a un tubo Falcón estéril para la preparación de las diluciones seriadas en factores de 10 hasta obtener una dilución final de 10^{-3}. De cada dilución se prepararon frotis y se realizó la tinción de Gram. Las muestras se observaron en un microscopio óptico empleando los objetivos 10X, 40X y 100X y un ocular de 10X. Se obtuvieron micrografías digitales de cada muestra para su posterior análisis morfométrico digital.

Las micrografías obtenidas mediante microscopía óptica con el objetivo de 100X fueron analizadas utilizando el software ImageJ. Inicialmente, las imágenes fueron convertidas a escala de grises de 8 bits. Con el propósito de reducir el ruido presente en las imágenes, se aplicó un filtro gaussiano con un valor de $\sigma=1$. Luego, las bacterias fueron resaltadas ajustando el umbral de intensidad, obteniendo una imagen binaria sin fondo. Para separar bacterias adyacentes o superpuestas, se aplicó la función Watershed. Una vez segmentadas las imágenes, se realizó el análisis de partículas con la herramienta Analize Particles. Para cada célula se obtuvieron las descripciones morfológicas: área, perímetro, circularidad y relación de aspecto. Los valores de circularidad y relación de aspecto se utilizaron para la clasificación morfológica de las bacterias. Se consideraron como cocos a las células cuya circularidad sea cercana a 1. Adicionalmente se generaron histogramas de distribución de tamaño celular con el fin de evaluar la heterogeneidad de las poblaciones bacterianas y detectar posibles polimorfismos o indicios de contaminación.

ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Resultados

Morfometría de levaduras mediante difracción y discos de Airy

Se evaluó el tamaño promedio de levaduras *S. cerevisiae* a través de 77 patrones de difracción independientes para cuantificar el efecto de las variables ópticas y biológicas. En la Tabla 1 se muestran las condiciones experimentales establecidas para obtener los discos de Airy.

Tabla 1. *Clasificación de patrones de difracción de acuerdo con su condición experimental y longitud de onda.*

Condición experimental	Longitud de onda	Número de patrones de difracción
Levadura sin dextrosa	516 nm	35
Levadura sin dextrosa	657 nm	15
Levadura con dextrosa	657 nm	19
Levadura con dextrosa	517 nm	8
Total		77

En la Fig. 2 se muestran algunos de los discos de Airy analizados en ImageJ para las muestras sin dextrosa y empleando dos láseres distintos para comprobar el efecto físico de la longitud de onda en el fenómeno de la difracción.

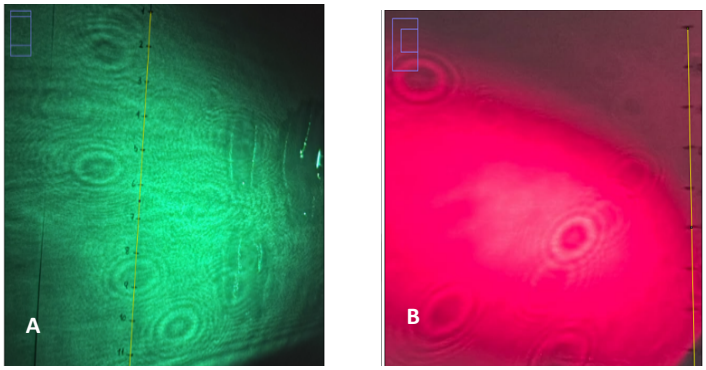


Figura 2. Patrones de difracción generados por Saccharomyces cerevisiae. En la parte A se observan discos de Airy con anillos concéntricos y simétricos obtenidos con un láser verde con λ=516 nm y sin dextrosa; mientras que en la parte B se usó un láser con λ=657 nm.

Con el láser rojo se observó una expansión en el tamaño de los anillos en comparación con el láser verde. Debido a que las células mantuvieron su condición basal sin estímulo metabólico de carbono, los patrones conservaron una simetría geométrica regular, demostrando que la variación en el diámetro del anillo corresponde a la modificación de la longitud de onda de la fuente incidente.

Por otra parte, al evaluar las muestras de *S. cerevisiae* cultivadas con dextrosa se obtuvieron patrones de difracción generados con láseres de 517 y 657 nm. Algunos patrones de difracción presentaron una marcada deformación en su geometría. Estos discos de Airy perdieron su simetría concéntrica circular característica para adoptar una morfología elíptica y elongada. Este fenómeno óptico corrobora de manera indirecta la existencia de procesos de gemación, donde la formación de la yema altera el eje geométrico de la partícula y, en consecuencia, deforma el perfil de difracción resultante como se muestra en la Figura 3.

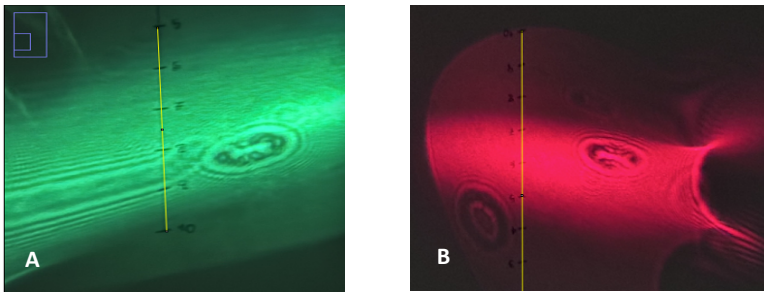


Figura 3. Patrones de difracción asimétricos debido a la adición de dextrosa a la levadura para propiciar su reproducción usando un láser verde (parte A) y un láser rojo (parte B).

Para cada patrón de difracción se determinó el diámetro del primer anillo oscuro del disco de Airy mediante análisis de imagen con el software ImageJ. Estos valores fueron empleados para calcular el radio de cada partícula mediante la ecuación 2. Los resultados correspondientes se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. *Tamaño estimado de las levaduras y forma del disco de Airy bajo diferentes condiciones metabólicas.*

Configuración	Diámetro del primer anillo oscuro en disco de Airy (cm)	Radio de la célula (µm)	Observaciones
Láser verde (l=516 nm). Con dextrosa	0.49 ± 0.25	88.80 ± 43.20	Patrón concéntrico base, simetría circular regular
Láser rojo (l=657 nm). Con dextrosa	0.50 ± 0.19	100.00 ± 44.40	Ligera expansión del radio por incremento físico de λ
Láser rojo (l=657 nm). Sin dextrosa	0.84 ± 0.37	66.40 ± 41.90	Pérdida de simetría axial, reducción del radio R
Láser verde (l=516 nm). Sin dextrosa	1.00 ± 0.36	39.25 ± 17.80	Máxima elongación elíptica y contracción severa de R

En las muestras de *Saccharomyces cerevisiae* sin dextrosa, las células fueron mantenidas en un estado metabólico basal, que se caracteriza por una morfología fundamentalmente esférica y un diámetro estable (~0.48-0.49 cm). Por el contrario, la incorporación de dextrosa como fuente de carbono activó la transición hacia la fase logarítmica de crecimiento, induciendo el proceso biológico de gemación y división celular. La formación de la yema provoca una elongación asimétrica en la estructura de la levadura.

Morfometría de bacterias por segmentación digital

El análisis morfológico de las cepas bacterianas 104, 265 y 318 junto con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, partió de imágenes captadas por microscopía óptica y procesadas después en ImageJ con los parámetros de segmentación mostrados en la Tabla 3 a fin de obtener los parámetros morfométricos de cada microorganismo, tales como su área, perímetro, diámetro de Feret máximo, circularidad, relación de aspecto, redondez y solidez.

Tabla 3. *Parámetros del algoritmo de segmentación e intervalos críticos en ImageJ.*

Parámetro	Bacterias	Saccharomyces cerevisiae
Dilución de trabajo	1:1000	1:100
Herramienta de segmentación	Analyze Particles (ImageJ)	Analyze Particles (ImageJ)
Intervalo de área aceptado	0.20–3.14 µm²	7.00–78.50 µm²
Intervalo de circularidad aceptado	0.55–1.00	0.65–1.00
Estándar de calibración in silico	Línea de referencia de 0.75 µm sobre un coco representativo	Línea de referencia de 8.0 µm sobre una célula individual sin gemación
Fundamento del valor de referencia	Parámetro promedio documentado en la literatura microbiológica para cocos	Cercano al diámetro crítico de 7.94 µm reportado para S. cerevisiae
Criterio de exclusión de partículas	Objetos fuera del intervalo de área/circularidad; fusiones no resueltas por Watershed	Objetos fuera del intervalo de área/circularidad; fusiones no resueltas por Watershed

En la Figura 4 se aprecian varios pares de siluetas de la cepa 104 en contacto directo, compatibles con diplococos, es decir, cocos que permanecen unidos tras una división celular reciente. La célula C29 (relación de aspecto = 2.402, circularidad = 0.573) y la C31 (relación de aspecto = 2.039, circularidad = 0.624) ejemplifican este patrón: el Watershed delimita un contorno único y alargado en lugar de dos siluetas circulares independientes, lo que reduce artificialmente la circularidad medida sin que exista una irregularidad real del margen celular. La célula C16, de mayor área del grupo (1.558 µm²), es consistente con una fase de crecimiento activo previa a la división.

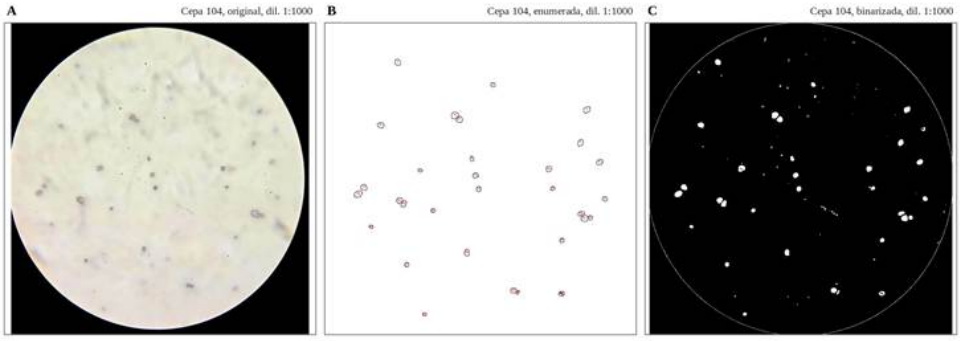


Figura 4. Micrografías de la cepa 104 (dilución 1:1000): imagen original (A), imagen enumerada (B) e imagen binarizada tras la segmentación (C).

En el caso de las bacterias, el área fue el parámetro con mayor coeficiente de variación: 40.20% (0.85 µm², DE = 0.34), según se reporta en la Tabla 4. El perímetro mostró un comportamiento similar, aunque con un coeficiente de variación ligeramente menor (20.44%). French *et al*. (2017) encontraron algo parecido en cultivos genéticamente homogéneos de *Escherichia coli* donde el área y la longitud celular capturan variación fisiológica ligada al estado de división y a la síntesis activa de pared celular. La circularidad fue de 0.843 (DE = 0.102); mientras que la relación de aspecto fue de: 1.343 (DE = 0.299). Takashimizu y Liyoshi (2016) advirtieron que el software tiende a subestimar la circularidad de forma sistemática conforme una silueta se alarga, lo cual no equivale a mayor irregularidad de contorno. Por eso se agregó la redondez para corregir el sesgo del eje mayor que fue de 0.772. Por su parte, la solidez fue de 0.896 con un coeficientes de variación de apenas el 5.26%. El tamaño y la elongación de cada célula parecen no afectar significativamente la convexidad del contorno bacteriano. French *et al*. (2017) atribuyen esto a que la solidez responde menos a cambios puntuales de tamaño y más a la integridad estructural de la envoltura celular. En la Tabla 4 se muestran los resultados de los descriptores de forma para las cepas bacterianas 104, 265 y 318.

Tabla 4. *Estadísticos descriptivos morfométricos de las cepas bacterianas.*

Descriptor de forma	Cepa 104 (n = 32)	Cepa 265 (n = 20)	Cepa 318 (n = 64)
Área (µm²)	0.85 ± 0.34 (CV = 40.20%)	0.38 ± 0.14 (CV = 37.21%)	0.33 ± 0.11 (CV = 33.87%)
Perímetro (µm)	3.49 ± 0.71 (CV = 20.44%)	2.40 ± 0.46 (CV = 19.31%)	2.28 ± 0.41 (CV = 18.14%)
Diámetro de Feret máximo (µm)	1.26 ± 0.25 (CV = 19.46%)	0.87 ± 0.15 (CV = 17.72%)	0.83 ± 0.14 (CV = 17.23%)
Circularidad	0.843 ± 0.102 (CV = 12.05%)	0.816 ± 0.116 (CV = 14.24%)	0.785 ± 0.108 (CV = 13.82%)
Relación de aspecto	1.343 ± 0.299 (CV = 22.29%)	1.349 ± 0.167 (CV = 12.38%)	1.398 ± 0.178 (CV = 12.70%)
Redondez	0.772 ± 0.131 (CV = 16.95%)	0.752 ± 0.093 (CV = 12.37%)	0.727 ± 0.091 (CV = 12.50%)
Solidez	0.896 ± 0.047 (CV = 5.26%)	0.873 ± 0.049 (CV = 5.62%)	0.873 ± 0.051 (CV = 5.88%)

Nota: M = media aritmética ± DE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación (DE / M × 100). Las células de menor circularidad y mayor relación de aspecto dentro de cada cepa corresponden mayoritariamente a diplococos no resueltos por el algoritmo de Watershed.

Morfometría de Saccharomyces cerevisiae

En *S. cerevisiae*, el área promedio fue de 27.86 µm² (DE = 12.30, CV = 44.13%). Este resultado es congruente con lo reportado por Ginovart *et al*. (2018), quienes, al analizar imágenes digitales de *S. cerevisiae* en cultivo aerobio y microaerofílico, encontraron distribuciones de área marcadamente heterogéneas y con frecuencia bimodales, producto de la coexistencia de células recién formadas, células en crecimiento activo y células en gemación dentro de una misma muestra. La dilución 1:100 aquí empleada, sin una fase de crecimiento controlada, hace previsible una asincronía poblacional comparable a la registrada por esos autores.

La circularidad promedio de la levadura (0.902, DE = 0.066, CV = 7.36%) resultó más alta y homogénea que la de cualquiera de las tres cepas bacterianas, mientras que la relación de aspecto promedio (1.306, DE = 0.306) fue la más baja de los cuatro grupos, aunque con el coeficiente de variación más alto del conjunto completo (23.41%). Esta combinación, circularidad alta en promedio, pero con una cola de valores elongados,

es coherente con la coexistencia de una población vegetativa y una subpoblación en gemación activa descrita por Guadalupe-Daqui *et al*. (2021), quienes documentaron cambios en la relación de aspecto y en la solidez asociados de manera específica a la etapa de gemación durante la fermentación. Al aplicar un umbral morfológico de relación de aspecto igual o superior a 2.0, dos células del conjunto (LV1100-M14 y LV1100-M15, equivalentes al 5.9% de la muestra) se identifican como candidatas a gemación activa, con una relación de aspecto promedio de 2.376 y una redondez promedio de 0.421, en contraste con la subpoblación vegetativa restante (n = 32), cuya relación de aspecto promedio de 1.239 y redondez promedio de 0.817 describen contornos considerablemente más regulares (Tabla 5).

La solidez promedio de *S. cerevisiae* (0.926, DE = 0.019) fue la más alta y, con un coeficiente de variación de apenas 2.09%, la menos dispersa de las siete variables medidas en las cuatro poblaciones de este estudio. Este hallazgo refuerza la utilidad de la solidez como parámetro de control de calidad de la segmentación: un contorno celular levaduriforme correctamente binarizado debería aproximarse a la convexidad casi perfecta de una elipse, tal como reportaron Guadalupe-Daqui *et al*. (2021) al validar su análisis automatizado en ImageJ frente a la medición manual, con una discrepancia promedio inferior al 4%.

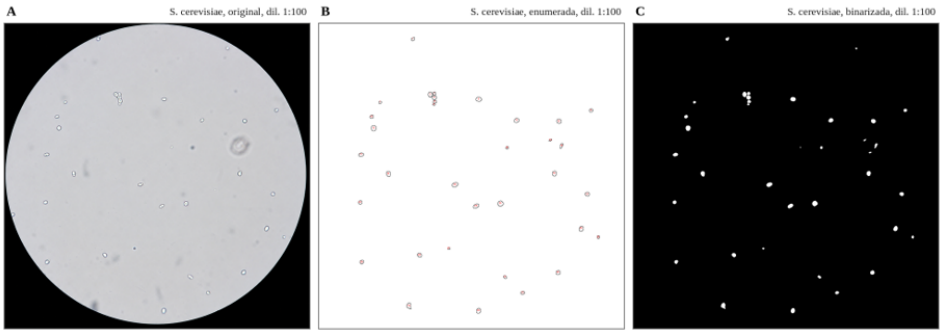


Figura 5. Micrografía de S. cerevisiae (dilución 1:100): imagen original, imagen enumerada e imagen binarizada tras la segmentación en ImageJ.

La Figura 5 evidencia una población asincrónica, con siluetas ovoides de contorno regular junto a formas notoriamente elongadas. Las bacterias LV1100-M14 y LV1100-M15, con relaciones de aspecto de 2.351 y 2.401 y redondeces de apenas 0.425 y 0.417, se identifican morfológicamente como yemas en formación activa, dado que el contorno binarizado incluye simultáneamente a la célula madre y a la yema aún no separada por completo, lo que genera una silueta compuesta de mayor elongación y menor redondez que la de una bacteria individual madura. En contraste, la bacteria LV1100-M23, de mayor área del conjunto (49.958 µm²) y con circularidad de 0.929, es compatible con una célula vegetativa madura sin evidencia de gemación.

Tabla 5. *Perfil morfométrico poblacional de Saccharomyces cerevisiae.*

Descriptor de forma	S. cerevisiae (n = 34)
Área (µm²)	27.86 ± 12.30 (CV = 44.13%)
Perímetro (µm)	19.21 ± 4.77 (CV = 24.83%)
Diámetro de Feret máximo (µm)	6.91 ± 1.69 (CV = 24.51%)
Circularidad	0.902 ± 0.066 (CV = 7.36%)
Relación de aspecto	1.306 ± 0.306 (CV = 23.41%)
Redondez	0.794 ± 0.128 (CV = 16.07%)
Solidez	0.926 ± 0.019 (CV = 2.09%)

Nota. La muestra (n = 34) reúne bacterias capturadas en un solo instante de una suspensión sin sincronización previa, por lo que integra de manera simultánea una población vegetativa y células en distintas etapas del ciclo de gemación, condición de asincronía poblacional consistente con lo

descrito por Ginovart et al. (2018) para cultivos de S. cerevisiae en fase de crecimiento activo. Al segmentar la muestra según un umbral morfológico de relación de aspecto igual o superior a 2.0, la subpoblación vegetativa (n = 32, 94.1%) mostró una relación de aspecto promedio de 1.239 (DE = 0.145) y una redondez de 0.817 (DE = 0.088), mientras que la subpoblación candidata a gemación activa (n = 2, 5.9%) mostró una relación de aspecto de 2.376 (DE = 0.035) y una redondez de 0.421 (DE = 0.006).

Análisis comparativo entre bacterias y levaduras

Al integrar los cuatro grupos en un mismo plano de circularidad y relación de aspecto (Figura 6), las poblaciones bacterianas y la levadura ocupan regiones parcialmente superpuestas, pero con densidades marginales distinguibles. La nube de puntos de *S. cerevisiae* se concentra de forma compacta hacia circularidades superiores a 0.85 con relaciones de aspecto entre 1.0 y 1.5, con escasos valores dispersos hacia relaciones de aspecto mayores a 2.0 que corresponden a las yemas en formación. La nube de la cepa 318 se extiende de manera más homogénea hacia circularidades inferiores a 0.85, sin un agrupamiento marginal tan definido como el de la levadura, mientras que las nubes de las cepas 104 y 265 ocupan una posición intermedia, con colas de dispersión hacia relaciones de aspecto superiores a 1.7 asociadas a diplococos. Este patrón de distribución es consistente con la escala morfológica documentada por Liu *et al*. (2019) para organismos modelo de referencia, en la cual las levaduras conservan un contorno más regular que buena parte de las morfologías bacterianas, aun cuando ambos grupos puedan presentar subpoblaciones elongadas asociadas a procesos de división celular.

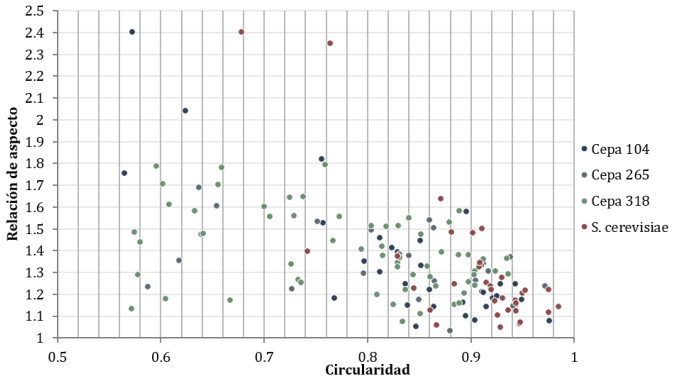
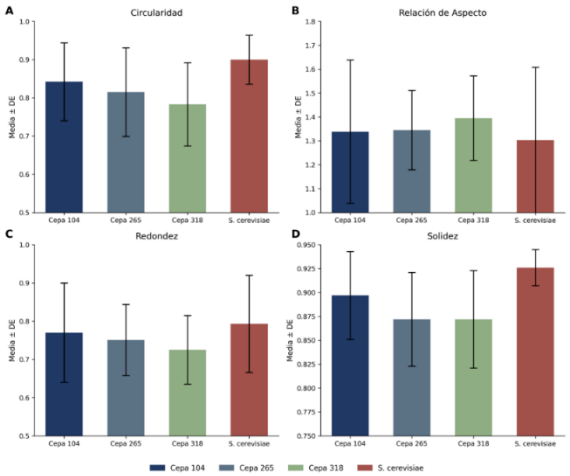


Figura 6. Distribución de circularidad y relación de aspecto por grupo (cepas bacterianas 104, 265, 318 y levadura S. cerevisiae).

Con el fin de interpretar de manera conjunta los cuatro descriptores adimensionales del estudio, la comparación entre grupos se representa mediante un panel de gráficos de barras (2×2), uno por cada descriptor (circularidad, relación de aspecto, redondez y solidez), en el que la altura de cada barra



corresponde a la media del grupo y las barras de error representan una desviación estándar hacia cada lado de la media (Figura 7).

Figura 7. Panel comparativo de descriptores morfológicos adimensionales para las tres cepas bacterianas y Saccharomyces cerevisiae.

La Figura 7 confirma una jerarquía morfológica consistente entre circularidad, redondez y solidez. *S. cerevisiae* encabeza los tres descriptores (0.902, 0.794 y 0.926, respectivamente), seguida por la cepa 104 (0.843, 0.772 y 0.896) y, en tercer lugar, por las cepas 265 y 318, con descriptores similares entre sí. En circularidad y en redondez, la barra de la cepa 265 (0.816 y 0.752) se ubica ligeramente por encima de la de la cepa 318 (0.785 y 0.727), con barras de error que no llegan a solaparse por completo; en solidez, ambas barras resultan practicamente indistinguibles (0.873 en los dos casos, con una diferencia de apenas 0.0003 entre ellas) y sus intervalos de Desviación Estandar se superponen casi en su totalidad, por lo que la jerarquía S. cerevisiae > cepa 104 > cepa 265 > cepa 318 se sostiene con claridad para circularidad y redondez. La superposición de los intervalos de error entre las cepas 265 y 318 en el panel de solidez indica ausencia de separación clara entre ambas cepas para ese descriptor, mientras que la amplitud de los intervalos de error en el panel de relación de aspecto para la cepa 104 y para *S. cerevisiae* refleja la coexistencia de subpoblaciones en distintos estados de división dentro de cada muestra.

El panel de solidez exhibe, además, las barras de error más estrechas de las cuatro poblaciones (DE entre 0.019 y 0.051, CV entre 2.09% y 5.88%), en marcado contraste con la amplitud de las barras de error observadas para el área y el perímetro en las Tablas 3 y 4 (CV entre 18.14% y 44.13%). Esta homogeneidad visual respalda la interpretación de la solidez como el descriptor morfométrico más estable y robusto de todo el conjunto: con independencia del grupo analizado, el contorno celular tiende a conservar una convexidad casi constante, mientras que el tamaño absoluto de la célula fluctúa de manera considerablemente mayor en función del estado de crecimiento y de división.

En conjunto, estos resultados muestran que la combinación de circularidad, relación de aspecto, redondez y solidez permite diferenciar patrones morfológicos entre las cepas bacterianas, y entre estas y *S. cerevisiae*. La correspondencia entre los valores promedio, la dispersión representada en las barras de error y los extremos individuales identificados en cada grupo respalda, además, la fiabilidad del flujo de segmentación empleado, calibrado y validado según los criterios discutidos por Liu *et al*. (2019) y por Guadalupe-Daqui *et al*. (2021) para el análisis automatizado de microorganismos en campo claro.

Dimensión fractal y lacunaridad miceliar

El comportamiento cinético de la dimensión fractal D_f y de la lacunaridad Λ fue cuantificado en cuatro especies fúngicas fitopatógenas: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* spp. y *Aspergillus niger*, a lo largo de su respectivo ciclo de colonización. El ajuste fractal de las estructuras miceliares fue verificado mediante el método de conteo de cajas (box-counting), procesado en ImageJ/FracLac; en las cuatro especies se obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) iguales o superiores a 0.995, lo cual respalda el comportamiento de escalamiento potencial dentro del intervalo analizado, en concordancia con el criterio establecido por Papagianni (2006) para *A. niger* en cultivo sumergido. A diferencia de ese estudio, centrado en un único fermentador agitado, en el presente diseño fueron comparadas cuatro especies bajo condiciones equivalentes de monitoreo, lo que permitió contrastar sus cinéticas de ramificación y relleno espacial.

Cinética de la dimensión fractal en hongos filamentosos

Como se observa en la Figura 8, Para los valores iniciales de D_f para las cuatro especies fueron superiores a 1.39, lo cual indica que, en el momento de la primera lectura, la red miceliar ya había superado la fase de extensión de una hifa germinativa aislada, cuyo valor esperado de D_f se aproxima a 1 y se encontraba en una etapa de ramificación. A partir de ese punto, en las cuatro especies se observó un incremento sostenido de D_f durante los primeros cuatro días, seguido de un régimen de meseta; este patrón fue consistente con la transición descrita por Papagianni (2006), entre el crecimiento disperso inicial y el desarrollo de agregados suficientemente ramificados cuya dimensión fractal deja de responder proporcionalmente al tiempo. En *Fusarium oxysporum*, D_f pasó de 1.414 (día 1) a 1.788 (día 8); fue cuantificado un incremento acumulado de 0.374 unidades y una tasa media de 0.053 unidades por día. El coeficiente de variación (CV = 8.42%) fue el segundo más bajo del conjunto, lo que sugiere que, superada la fase exploratoria inicial, la progresión

estructural se mantuvo relativamente estable. En *Aspergillus niger* se registró la media más alta de todo el conjunto (*M* = 1.756, *DE* = 0.125, CV = 7.10%); valores cercanos al máximo (1.838) fueron alcanzados ya en el día 4, y la meseta más alta y estable de las cuatro especies fue sostenida hasta el día 8. Esta combinación de D_f elevada y baja dispersión relativa fue interpretada en función de la tendencia, documentada por Papagianni (2006), de *A. niger* a desarrollar agregados densamente ramificados de tipo pellet o clump, en contraste con morfologías filamentosas dispersas.

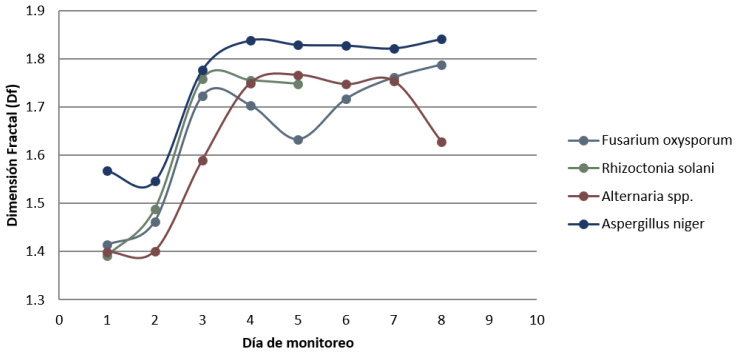


Figura 8. Cinética de la dimensión fractal D_f para Fusarium oxysporum, Rhizoctonia solani, Alternaria spp. y Aspergillus niger.

En *Alternaria* spp. se registró el único caso de reversión neta dentro del conjunto de datos: tras alcanzar su valor máximo en el día 5 (D_f = 1.767), la dimensión fractal descendió hasta 1.627 en el día 8, por debajo incluso de los valores obtenidos entre los días 4 y 7. Esta caída tardía fue interpretada como compatible con procesos de fragmentación o senescencia hifal que reducen la complejidad de ramificación. En *Rhizoctonia solani*, por su parte, fueron alcanzados valores de D_f prácticamente indistinguibles de los de las otras tres especies (1.759 en el día 3; meseta en torno a 1.75 hasta el día 5) en apenas cinco días de monitoreo.

Tabla 6. Estadística descriptiva de la dimensión fractal D_f por especie.

Especie	Ciclo (día)	Df inicial	Df final	M	DE	CV(%)
Fusarium oxysporum	1–8	1.414	1.788	1.650	0.139	8.42
Rhizoctonia solani	1–5	1.391	1.748	1.628	0.176	10.80
Alternaria spp.	1–8	1.399	1.627	1.629	0.156	9.56
Aspergillus niger	1–8	1.568	1.841	1.756	0.125	7.10

Nota: D_f = dimensión fractal de masa (método box-counting); M = media aritmética de los registros diarios; DE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación. Los coeficientes de determinación (R^2) de los ajustes log–log oscilaron entre 0.995 y 0.999 en las especies.

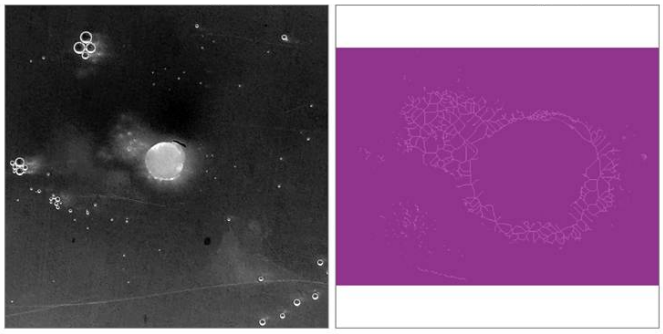


Figura 9. Panel de divergencia cinética a las 48 horas de colonización (día 2).

En la Figura 9 se muestra una imagen *F. oxysporum*y su correspondiente imagen binarizada de conteo de cajas en ImageJ/FracLac (B, D). En este caso, el hongo conserva una red exploratoria dispersa y de bordes difusos, con baja densidad de conexiones internas.

Dinámica de la lacunaridad, anastomosis y reorganización interna de la red miceliar

La lacunaridad complementa a la dimensión fractal ya que cuantifica la heterogeneidad en la distribución espacial de la biomasa, es decir, el grado en que la red presenta huecos internos frente a una ocupación homogénea del espacio. En tres de las cuatro especies, *F. oxysporum*, *R. solani* y *A. niger*, fue registrada una tendencia neta decreciente de *Λ* a lo largo del monitoreo. Este patrón fue interpretado como el paso de un frente de exploración disperso y heterogéneo, propio de las primeras horas de colonización cuando las hifas buscan recursos hasta lograr una red consolidada mediante anastomosis, es decir, la fusión física de hifas que entran en contacto y que da origen a asas o ciclos dentro de la red. Este proceso permite la redistribución de citoplasma y de recursos entre regiones antes conectadas por una única ruta, y tiene como efecto observable el relleno progresivo de los espacios vacíos detectados por el análisis de conteo de cajas, reduciendo así *Λ*. Fricker *et al.* (2017) señalan que los sistemas miceliares que saturan primero su dimensión de masa tienden también a extenderse con mayor rapidez.

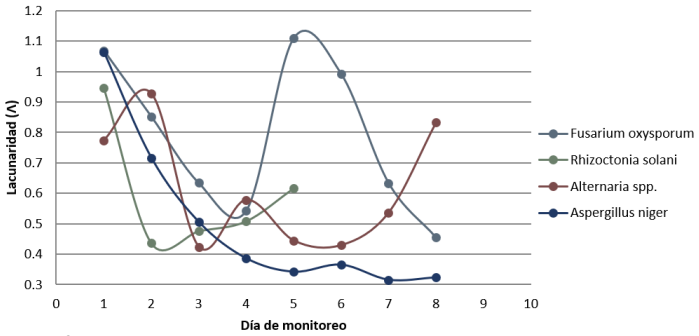


Figura 10. Dinámica del Índice de lacunaridad (Λ) a lo largo del tiempo de colonización para las cuatro especies fúngicas.

De acuerdo con la dinámica de índice de lacunaridad mostrada en la Fig. 10 y la Tabla 7, *Aspergillus niger* presentó la caída más pronunciada de todo el conjunto, de 1.064 (día 1) a 0.324 (día 8); en esta especie fue registrado también el coeficiente de variación más alto (CV = 52.45%), lo que indica la reorganización espacial más drástica entre las cuatro especies analizadas. Esta trayectoria resultó coherente con el comportamiento de D_f en la misma especie (la más alta y estable del conjunto). Ambos indicadores describen una transición rápida hacia una arquitectura de tipo pellet, densamente ocupada y con relleno interno casi completo. En *F. oxysporum* fue cuantificada una reducción igualmente sostenida (*Λ* de 1.069 a 0.455), aunque interrumpida por un repunte en el día 5 (*Λ* = 1.109); este repunte fue interpretado como un posible frente secundario de exploración hifal, previo a la consolidación final de la red.

Tabla 7. *Estadística descriptiva de la lacunaridad (Λ) por especie durante el ciclo de monitoreo.*

Especie	Ciclo (día)	Λ inicial	Λ final	M	DE	CV (%)
Fusarium oxysporum	1–8	1.069	0.455	0.786	0.252	32.09
Rhizoctonia solani	1–5	0.946	0.616	0.596	0.206	34.56
Alternaria spp.	1–8	0.774	0.833	0.618	0.199	32.24
Aspergillus niger	1–8	1.064	0.324	0.502	0.264	52.45

Nota. Valores mayores de lacunaridad indican una distribución de biomasa más heterogénea (mayor proporción de huecos); valores menores reflejan redes más homogéneas y con mayor relleno interno logrado por anastomosis y ramificación secundaria.

En *Alternaria* spp. se observó la única trayectoria de Λ con forma de "U". El valor de lacunaridad disminuyó de 0.774 (día 1) a un mínimo de 0.424 (día 3), permaneció bajo en los días 3 y 5 (0.42–0.45), con un repunte intermedio en el día 4 (Λ = 0.578), y volvió a descender a un segundo valor mínimo, prácticamente equivalente al primero, en el día 6 (Λ = 0.429). A partir de ahí ascendió de forma sostenida durante los dos últimos días de monitoreo, pasando de 0.537 (día 7) a 0.833 (día 8), este último el valor más alto de toda la serie, y superando así el nivel registrado el día 1. Esta fase final de ascenso coincidió temporalmente con la caída de D_f observada en el mismo intervalo al evaluar la dinámica temporal de la dimensión fractal, lo que refuerza la lectura de que ambos indicadores registraron un mismo evento estructural tardío. Dicho evento fue interpretado como una probable senescencia hifal, en la cual la vacuolización y la eventual autólisis de segmentos de hifas más antiguos fragmentan conexiones que antes sostenían el relleno logrado por anastomosis, de modo que se reabren espacios vacíos dentro de la red y, simultáneamente, se reduce la complejidad de ramificación detectable por el análisis de imagen, produciendo el descenso de D_f y el ascenso de Λ observados de manera especular hacia el final del ciclo. Este patrón en "U", acompañado del descenso especular en D_f, constituye evidencia indirecta de que, al menos en esta especie, el proceso de consolidación de la red no es unidireccional y puede revertirse antes de completarse.

En *Rhizoctonia solani* fue registrada una de las caídas más abruptas de todo el conjunto de datos: de Λ = 0.946 (día 1) a Λ = 0.437 (día 2), una reducción del 53.8% en 24 horas. Esta reducción porcentual fue apenas superada por la registrada en *Alternaria* spp. entre los días 2 y 3 (54.3%); sin embargo, a diferencia de ese caso, en *R. solani* la caída ocurrió en el primer intervalo de su propio ciclo de colonización, sin un incremento previo que la antecediera. Este patrón de consolidación inmediata, concentrado en las primeras 48 horas, es una evidencia de una cinética de anastomosis y colonización acelerada.

Contraste taxonómico

Uno de los hallazgos más relevantes es que, en apenas cinco días, en *Rhizoctonia solani* fueron alcanzados valores de D_f y de Λ comparables a los que en *F. oxysporum*, *Alternaria* spp. y *A. niger* fueron alcanzados hacia el día 8, es decir, entre 1.6 y 2.3 veces más rápido. Esta diferencia de velocidad de crecimiento se debe a que *R. solani* es un colonizador necrotrófico agresivo de hifas anchas y escasamente septadas, cuya estrategia prioriza la ocupación rápida y completa del sustrato disponible por encima de la construcción de estructuras de exploración. Este perfil resulta congruente con el eje de compromiso entre velocidad de extensión y comportamiento fractal descrito por Fricker *et al*. (2017) donde los sistemas miceliares que saturan tempranamente su dimensión de masa tienden a extenderse con mayor rapidez que aquellos que permanecen como fractales de borde a cambio de la resiliencia y economía de largo alcance que ofrecen las redes exploratorias. Los datos aquí presentados ubican a *R. solani* en la estrategia de saturación temprana.

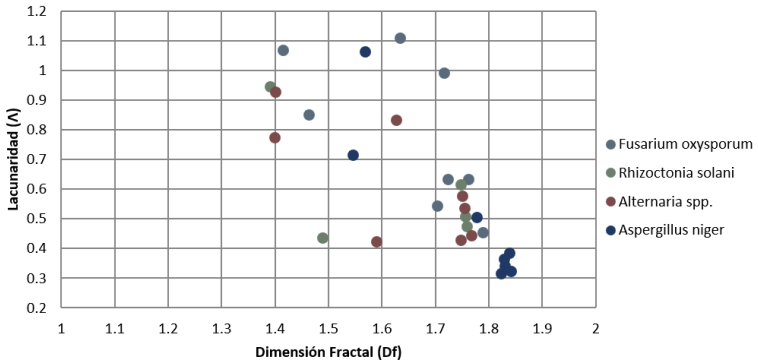


Figura 11. Análisis de correlación conjunta y trayectorias en el espacio de fase D_f vs Λ para el contraste taxonómico.

En la Figura 11 se observa que la agrupación de los puntos de *R. solani* y *A. niger* hacia la región de D_f alta y Λ baja, frente a la dispersión más amplia de *F. oxysporum* y *Alternaria spp*., ilustra el compromiso entre velocidad de saturación estructural y comportamiento fractal descrito por Fricker et al. (2017).

En *A. niger* fue observado un comportamiento cinético más cercano al de *R. solani* que al de *F. oxysporum* o *Alternaria* spp.: valores máximos de D_f fueron alcanzados en el día 3–4, y la dispersión relativa más baja del conjunto (CV = 7.10% en D_f) fue mantenida durante el resto del ciclo. Este resultado fue consistente con la tendencia de *A. niger* a desarrollar agregados compactos de tipo pellet, lo que sugiere que dicha propensión a la agregación densa constituye un rasgo intrínseco de la especie. Por otra parte, en *F. oxysporum* y en *Alternaria* spp., fueron observados cambios graduales. Esto sugiere que no todas las especies siguen la misma cinética de consolidación: mientras en *A. niger* la complejidad estructural fue saturada tempranamente y mantenida estable, en *F. oxysporum* fue documentada una progresión más paulatina, y en *Alternaria* spp. ocurrió una fase de reorganización y pérdida de complejidad hacia el final del ciclo.

En conjunto, los resultados obtenidos respaldan la propuesta de Papagianni (2006), según la cual la dimensión fractal puede sustituir, con ventaja de sensibilidad, a un número considerable de descriptores morfométricos clásicos, y sugieren que la lacunaridad aporta información complementaria y no redundante sobre la dinámica de redistribución de biomasa dentro de la red. Leídos bajo el marco de redes miceliares de Fricker *et al*. (2017), D_f y Λ fueron interpretados como dos caras del mismo proceso: la primera, el grado de ramificación estructural alcanzado mediante anastomosis y crecimiento denso; la segunda, el grado en que dicha estructura dejó de comportarse como un frente de exploración disperso para convertirse en una red consolidada, con capacidad de revertirse, tal como fue documentado en *Alternaria* spp., cuando procesos de senescencia hifal alteran la integridad de las conexiones logradas previamente. El contraste entre *R. solani*, y en menor medida *A. niger*, frente a *F. oxysporum* y *Alternaria* spp. ilustra que la velocidad a la que cada especie recorre esa transición constituye, en sí misma, un rasgo distintivo con valor taxonómico y ecológico.

Conclusiones

En este trabajo se evaluó si la difracción láser, morfometría digital y análisis fractal permiten caracterizar y diferenciar microorganismos tales como levaduras, bacterias y hongos, sin necesidad de recurrir a técnicas destructivas, ni a la inspección manual bajo microscopio. Por una parte, con el sistema de proyección con discos de Airy se estimó el radio celular de *S. cerevisiae* y se detectaron cambios asociados a procesos metabólicos inducidos por la dextrosa. Además, el procesamiento digital en ImageJ permitió extraer, objeto por objeto, los descriptores de forma de tres cepas bacterianas y de la levadura. Adicionalmente, con el método de conteo de cajas sobre imágenes de micelio esqueletizado se cuantificaron tanto la dimensión fractal Df como la lacunaridad Λ de cuatro especies fúngicas durante su ciclo de colonización. En conjunto, estas tres aproximaciones superar las limitaciones de las técnicas convencionales: como la subjetividad, la variabilidad y el carácter destructivo de las técnicas moleculares. Por otra parte, la difracción de Fraunhofer funcionó como un indicador indirecto y no-destructivo del estado fisiológico celular. Las levaduras en condición basal produjeron patrones de Airy simétricos; al inducir la gemación con dextrosa, el patrón perdió su simetría concéntrica, lo que confirma que la elongación asimétrica de las células en división se refleja en la geometría del patrón difractado. En el plano de la morfometría digital, el análisis conjunto de circularidad, relación de aspecto, redondez y solidez permitió distinguir la señal biológica real de artefactos de segmentación. La solidez fue el descriptor más estable en las cuatro poblaciones (CV entre 2.09 % y 5.88%), lo que lo convierte en un buen indicador de calidad del binarizado, mientras que los valores elevados de AR ≥ 2.0 identificaron de forma consistente diplococos no resueltos y yemas en formación activa de *S. cerevisiae*. Esta combinación de descriptores de forma permitió distinguir división celular activa de deformación morfológica real. En el caso de los hongos, la D_f y Λ capturaron una dimensión del crecimiento miceliar que los descriptores euclidianos no describen, y además distinguieron distintas estrategias de colonización entre especies. *R. solani* mostró la cinética más acelerada, con una caída de Λ de 53.8% en las primeras 24 horas y sin fase previa de incremento, consistente con un colonizador necrotrófico que satura su dimensión de masa desde el inicio. *A. niger* alcanzó valores de D_f cercanos a su máximo (1.756) en el día 4, con la dispersión relativa más baja del conjunto, en concordancia con su tendencia a formar agregados densos tipo pellet. *F. oxysporum* siguió una progresión más gradual, mientras que *Alternaria* spp. fue la única especie en mostrar una reversión tardía. Estos resultados muestran que la D_f y Λ no son redundantes, sino complementarios, ya que la dimensión fractal cuantifica el grado de ramificación y la lacunaridad cuantifica la homogeneidad con que ese espacio es ocupado, superando a los descriptores clásicos (área, perímetro, densidad de biomasa), que dependen de la escala de medición y que ocultan variaciones locales de relevancia biológica. La metodología morfométrica aquí propuesta tiene la ventaja de ser no destructiva, permitir el análisis temporal de cultivos, procesar poblaciones numerosas de células en segundos y reducir la variabilidad inter-operador al automatizar la extracción de descriptores; por lo que puede ser empleada para el monitoreo continuo de biorreactores o para el diagnóstico rápido de cultivos agrícolas afectados por microorganismos fitopatógenos.

Referencias

Arango, G., Ramírez, C., Vargas, L. G., Muñoz, L. M., & Pérez, J. C. (2013). Uso de patrones de difracción de luz láser y análisis de imágenes para diferenciación de tres tipos de colonias bacterianas. DINA, 80(177), 69-74.

Bustin, S. A., et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 55(4), 611–622.

Cabral, E. J., et al. (2026). Fission yeast cells use distinct cell size control mechanisms to regulate cell geometry in response to osmotic, oxidative, or low glucose conditions. Molecular Biology of the Cell, 37(4), br11.

French, S., et al. (2017). Bacteria getting into shape: Genetic determinants of E. coli morphology. mBio, 8(2), e01977-16.

Fricker, M. D., Heaton, L. L. M., Jones, N. S., & Boddy, L. (2017). The mycelium as a network. Microbiology Spectrum, 5(3).

Ginovart, M., Carbó, R., Blanco, M., & Portell, X. (2018). Digital image analysis of yeast single cells growing in two different oxygen concentrations to analyze the population growth and to assist individual-based modeling. Frontiers in Microbiology, 8, 2628.

Guadalupe-Daqui, M., Chen, M., Thompson-Witrick, K. A., & MacIntosh, A. J. (2021). Yeast morphology assessment through automated image analysis during fermentation. Fermentation, 7(2), 44.

Liu, G., Dong, F., Fu, C., & Smith, Z. J. (2019). Automated morphometry toolbox for analysis of microscopic model organisms using simple bright-field imaging. Biology Open, 8(3), bio041426.

Nai, G. A., Martelli, C. A. T., Medina, D. A. L., Oliveira, M. S. C., Caldeira, I. D., Henriques, B. C., Portelinha, M. J. S., Eller, L. K. W., & Marques, M. E. A. (2021). Fractal dimension analysis: A new tool for analyzing colony-forming units. MethodsX, 8, Artículo 101228.

Papagianni, M. (2006). Quantification of the fractal nature of mycelial aggregation in Aspergillus niger submerged cultures. Microbial Cell Factories, 5(1), Artículo 5.

Takashimizu, Y., & Iiyoshi, M. (2016). New parameter of roundness R: circularity corrected by aspect ratio. Progress in Earth and Planetary Science, 3, 1–20.

Xu, M., Wu, T. T., & Qu, J. Y. (2008). Unified Mie and fractal scattering by cells and experimental study on application in optical characterization of cellular and subcellular structures. Journal of Biomedical Optics, 13(2), Artículo 024015.