

APLICACIÓN DE MÉTODO DE MONTE CARLO PARA EL ESTUDIO DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS Y LEVADURAS

Carlos A. Cattaneo, Ledda I. Larcher, Sebastián Togo, Lucrecia Chaillou

Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Av. Belgrano Sur 1912; G4200ABT Santiago del Estero, Argentina (cacatta@unse.edu.ar), <http://faa.unse.edu.ar>

Palabras clave: simulación, Monte Carlo, microbiología predictiva

Resumen: La importancia del desarrollo de simuladores para el crecimiento de microorganismos radica en evitar costosos y tediosos ensayos de laboratorio tanto en la industria alimentaria, agrícola, farmacéutica, y otras.

Este trabajo presenta los avances realizados en el desarrollo de un simulador de crecimiento microbiano empleando el método de Monte Carlo.

Se aplican características biológicas para diferenciar el crecimiento de bacterias y levaduras.

Para los microorganismos tipo levadura se toma en cuenta la característica de envejecimiento prematuro y su transmisión.

En el modelo se incluyeron valores de energía, de alimento, de reproducción y de mantenimiento. Se han hecho estudios que permitan simular con mayor precisión la fase de latencia.

Con las curvas de crecimiento y de cantidad de sustrato (alimento) obtenidas se calcula el rendimiento celular referido a C-mol de biomasa producida con respecto a C-mol de glucosa utilizada.

1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos pueden crecer en una amplia variedad de sustratos y originar una abundante variedad de productos (Stanbury, 1990). En condiciones ambientales favorables y un medio de cultivo apropiado, pueden multiplicarse produciendo biomasa, o bien secretar productos útiles o tóxicos para el hombre (Trevan *et al.*, 1990). Es decir que su presencia puede indicar una contaminación alimentaria, un riesgo potencial para la salud, una mejor cosecha, la producción de una variedad de metabolitos aprovechables o bien de biomasa, que es una fuente de proteínas.

Los modelos y simulaciones se utilizan ampliamente en todas las disciplinas científicas. El modelado en microbiología de alimentos comenzó en 1920 con los cálculos de tiempo de muerte térmica en alimentos enlatados para *Clostridium botulinum* (microorganismo altamente patógeno) (Whiting, 1995). Desde entonces con los avances realizados en informática, el uso de modelos y simulaciones en microbiología creció al punto de ser reconocida como una disciplina de la microbiología de alimentos, denominada por McMeekin y colaboradores (1993) como microbiología predictiva. Su objetivo es describir matemáticamente el crecimiento o la declinación de microorganismos bajo específicas condiciones ambientales experimentales, los modelos permiten predecir el comportamiento microbiano, en diversas condiciones, sin necesidad de realizar ensayos largos y costosos (Whiting, 1995).

La fase de latencia (o fase de lag) de las colonias tiene gran importancia en la microbiología industrial, y es un área de estudio de la microbiología predictiva, que intenta comprender las causas microscópicas de la fase de lag para predecir la evolución de un cultivo microbiano bajo condiciones dadas. Existen descripciones matemáticas de esta fase. Algunas (Baranyi y Roberts, 1994; Hills y Wright, 1994; McKellar, 1997) se basan en la descripción dinámica del crecimiento mediante ecuaciones diferenciales. Modelos posteriores introdujeron tratamiento estocástico (Buchanan *et al.*, 1997; McKellar, 2001; Baranyi, 2002), con características más realistas. Estudios recientes han tratado también de relacionar los tiempos de lag de células individuales con el tiempo de la colonia (Wu *et al.*, 2000; Métris *et al.*, 2003; Kutalik *et al.*, 2005). Todos estos modelos se han usado para el estudio de diferentes factores que influyen en esta etapa de crecimiento, tales como la influencia del medio (temperatura, pH, concentración de sustrato, etc.) y las condiciones iniciales del inóculo. Sin embargo, para desarrollar los modelos existentes debe incorporarse mayor cantidad de datos acerca de los mecanismos biológicos subyacentes que provocan el lag, lo cual requiere un conocimiento completo sobre el comportamiento de células individuales (Buchanan *et al.*, 1997; McKellar *et al.*, 2002). Modelar y simular a nivel de individuos son buenas herramientas para explorar los mecanismos biológicos de los microorganismos. También es una buena manera de estudiar en profundidad las restricciones físicas de las células individuales, algo no tomado en cuenta en los antes mencionados tratamientos matemáticos y estocásticos (Swinnen *et al.*, 2004).

Existen dos aspectos que hacen al crecimiento microbiano, uno es el estequiométrico y el otro el cinético. La aplicación de la estequiometría implica determinar los rendimientos en productos, biomasa con respecto al sustrato consumido (usualmente la fuente de carbono y energía). Uno de los parámetros más importantes es el rendimiento en biomasa, $Y_{x/s}$ que representa los C-moles de biomasa formada por cada C-mol de fuente de carbono y energía consumida (Crueger y Crueger, 1993).

Desarrollo previo. Se desarrolló un modelo de simulación que estudia el crecimiento de microorganismos sobre un sistema bidimensional. El modelo trabaja con una bacteria genérica y con propiedades particulares, basándose en el método de Monte Carlo para elegir los muestreos representativos de cada evento.

Para realizar cada microensayo de Monte Carlo, se elige una posición al azar de la matriz; si la posición ya se encuentra ocupada por un microorganismo, se controla si hay alimento disponible para esa posición, en cuyo caso el microorganismo se alimenta. Como resultado, se disminuye la cantidad de alimento en un valor determinado, y luego se analiza la posibilidad de reproducción del microorganismo. Para ello, se genera una nueva posición al azar en las posiciones circundantes al microorganismo seleccionado, si este lugar está vacío se reproduce, generando un nuevo microorganismo que tiene el mismo período de viabilidad establecido en las condiciones iniciales. El microorganismo inicialmente seleccionado decrece su vida de acuerdo al factor de disminución de vida establecido en caso que el microorganismo se alimente. Si no hay alimento disponible en el primer lugar elegido, la vida del microorganismo decrece de acuerdo al factor de disminución de vida establecido para el caso que el microorganismo no se alimente (que puede ser igual o distinto al anterior). Si la posición elegida inicialmente no se encuentra ocupada por ningún microorganismo, se vuelve a generar otra posición al azar y se repite el ciclo.

La [Figura 1](#) muestra un diagrama de bloques del proceso antes referido.

Las curvas de crecimiento obtenidas mediante la simulación presentaron similitud con las curvas experimentales y con las obtenidas por otros modelos de simulación. El algoritmo planteado demostró ser sensible a las condiciones iniciales de la simulación, tamaño de la matriz; tiempo de simulación; población inicial de microorganismos, que está distribuida en lugares determinados de la matriz; cantidad de alimento disponible en cada elemento de la matriz; capacidad de los microorganismos para absorber alimentos; capacidad de reproducción de los microorganismos; período de viabilidad para un microorganismo y factor de disminución de vida para el microorganismo ([Larcher y Cattaneo, 2006](#)).

Nuevas consideraciones. El modelo desarrollado en la etapa anterior se amplió para poder estudiar levaduras, además de bacterias, implementando nuevas ecuaciones que permiten respetar la fisiología particular de estos dos tipos de microorganismos.

Cuando se introduce un microorganismo en un medio nutritivo, que permita su desarrollo, pasará por las fases de latencia, de crecimiento, de crecimiento exponencial, de crecimiento desacelerado, y de declinación o muerte ([Stanbury, 1990](#)).

En este modelo se supone que las colonias crecen en un medio fijo; para ello, se toma una matriz de 100x100.

En primer lugar, se trabajó con una bacteria genérica con ciertas propiedades particulares:

- Se simuló el crecimiento de una colonia bajo condiciones ambientales homogéneas. Se ha elegido un modelo de comportamiento bacteriano simple, es decir que sólo se selecciona un microorganismo en cada microensayo y luego se integran los resultados.
- Se consideró un tiempo de adaptación de la bacteria al medio. Debe mencionarse que la fase de lag tiene lugar durante los primeros estadios de crecimiento. Se realizaron simulaciones suponiendo fase lag con valores enteros entre 0 y 5 tiempos de Monte Carlo (MCS).
- Si bien cada bacteria tiene su propia masa, que aumenta o disminuye según condiciones diferentes como pueden ser energía de mantenimiento o disponibilidad de nutrientes, la masa del inóculo depende del cultivo que se desea simular ([Prats et al., 2006](#)). Se consideró un inóculo con una bacteria.
- La cantidad de sustrato inicial es fija (CA). En cada microensayo, las células chequean la disponibilidad de nutrientes, los absorben y se actualizan tanto la cantidad de nutriente disponible como la energía de mantenimiento para esa célula. Durante las fases de lag y exponencial no existen limitaciones de

nutriente. Se realizaron simulaciones tomando CA=80, 100, 120, 150 y 200 moléculas de glucosa como fuentes de carbono y energía.

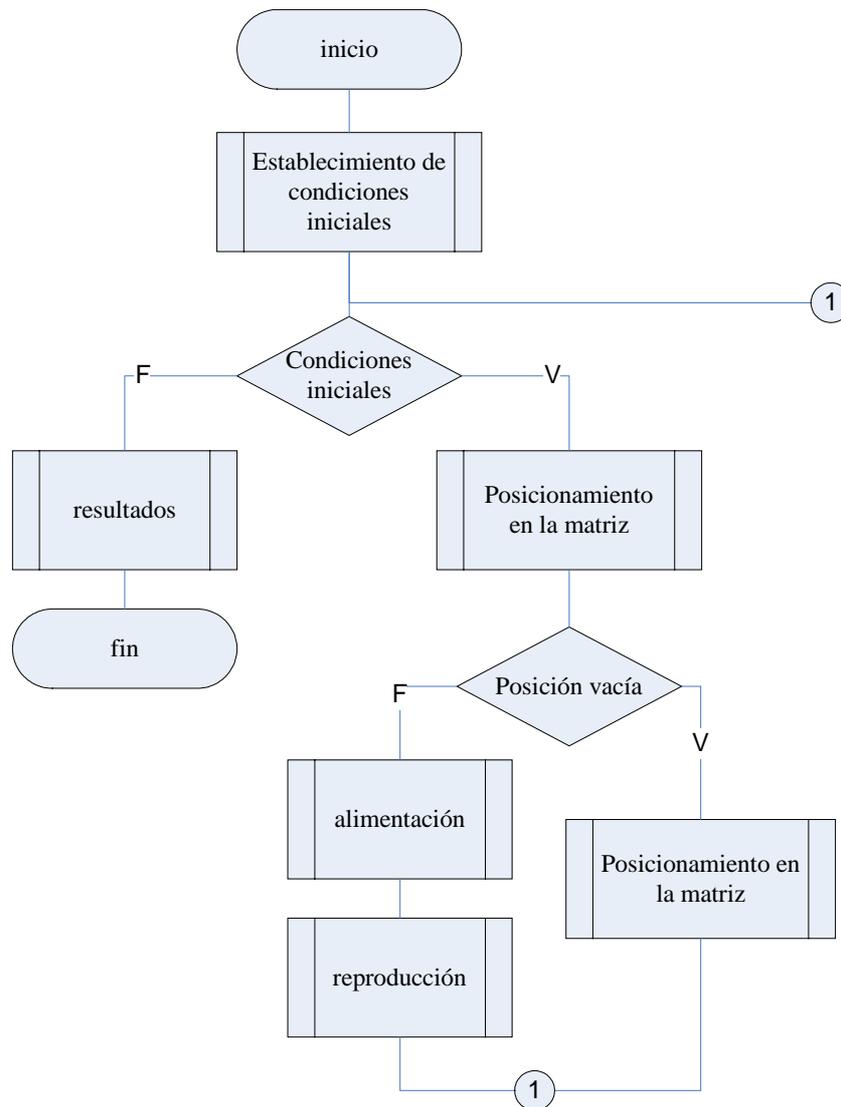


Figura 1. Diagrama de bloques del algoritmo

- La energía necesaria para el mantenimiento celular es proporcional a la masa individual (Prats *et al.*, 2006). Se trabajó usando como energía de mantenimiento $5,23 \times 10^{-19}$ J por bacteria (Crueger y Crueger, 1993) y se supuso que la energía necesaria para el crecimiento es cinco veces la energía de mantenimiento.
- El proceso de reproducción se inicia cuando un individuo alcanza cierta masa celular (Ginovart *et al.*, 2002a). En la simulación, el proceso de reproducción comienza cuando la bacteria seleccionada superó el período de adaptación, dispone como mínimo de la energía necesaria para su crecimiento y dispone de espacio para reproducirse. El ciclo de vida de la nueva bacteria tiene el mismo valor de fase de lag que la célula original.

- La carencia de nutrientes provoca la falta de fuentes de energía. En consecuencia, la bacteria debe obtener la energía de mantenimiento de la digestión de biomasa (Nyström, 2004) lo cual, a su vez, produce una disminución de la masa del individuo. En este trabajo la viabilidad de la célula es determinada sólo por la disponibilidad energética; si la bacteria carece del mínimo requerido (energía de mantenimiento), se inactiva o muere.
- Se supuso que cada bacteria se desarrolla en una posición determinada, aunque carece de movimiento.

La Figura 2 muestra el diagrama de bloques de los procesos de alimentación y reproducción para microorganismos tipo bacteria.

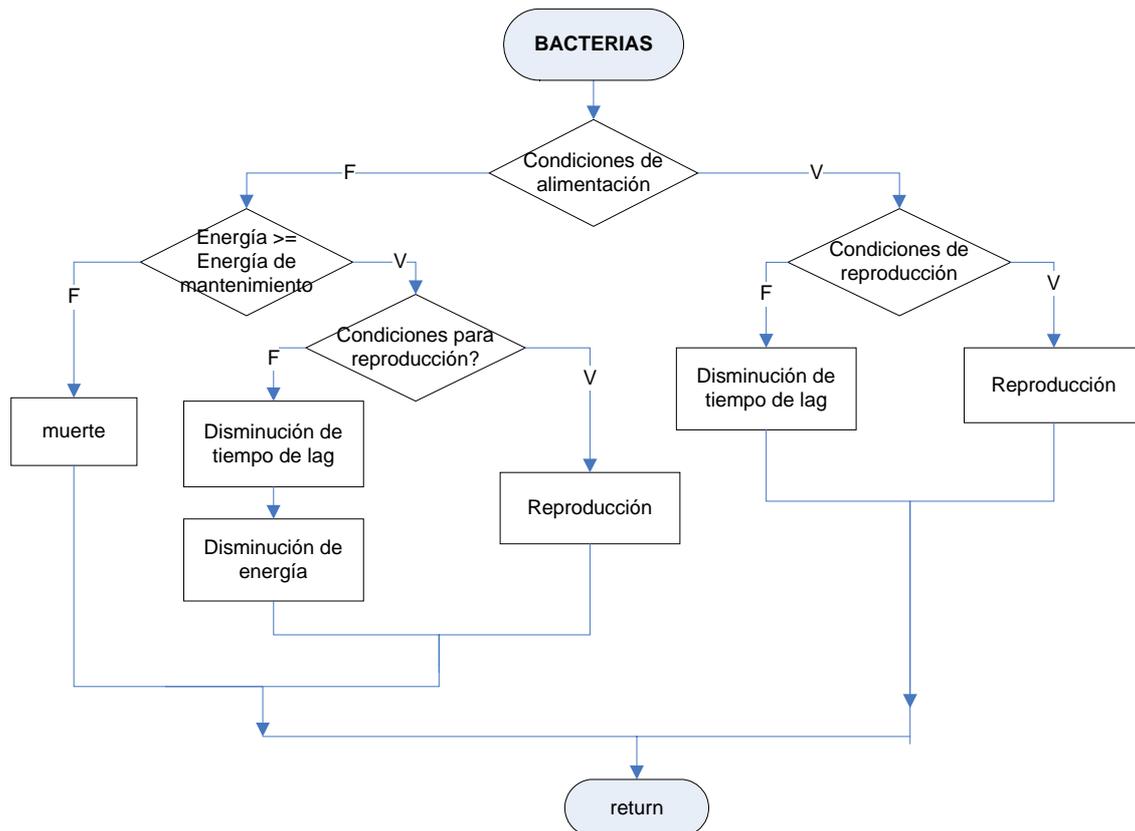


Figura 2. Diagrama de bloques para microorganismos tipo bacteria

En segundo lugar, se estudió el comportamiento de levaduras, que constituyen uno de los microorganismos más empleados en la industria alimentaria. Como son aerobios facultativos, en presencia de oxígeno utilizan los hidratos de carbono como fuente de energía para reproducirse y aumentar su material celular, además de producir pequeñas cantidades de etanol y otros metabolitos secundarios (Stanbury, 1990). En el caso particular de *Saccharomyces cerevisiae*, la división celular es asimétrica, es decir se separa una pequeña célula hija de la célula madre.

- Se han hecho estudios que permiten simular con mayor precisión la fase de latencia. Se considera que existe un tiempo adicional en las células hijas equivalente al tiempo que transcurrirá hasta que se encuentren maduras pues estas nuevas células deben crecer antes de poder reproducirse (Calzone, 2004). Se simularon tiempos de lag 0, 10, 15 y 20 MCS para las células madre, considerando que una vez que ésta se adapta al medio su lag es 0 y el lag de las células hijas es el transferido por la célula inicial.

- Se simuló el crecimiento de una colonia bajo condiciones ambientales homogéneas. Se selecciona un microorganismo en cada microensayo, y luego se integran los resultados.
- La cantidad de sustrato inicial es fija. En cada MCS las células chequean la disponibilidad de nutrientes, los absorben y se actualizan tanto la cantidad de nutriente disponible como la energía de mantenimiento para esa célula. Como en el caso de las bacterias, durante las fases de lag y exponencial correspondientes a la colonia, no existen limitaciones de nutriente. Se realizaron simulaciones tomando 900 moléculas de glucosa.
- Se trabajó usando como energía de mantenimiento $1,25 \times 10^{-18}$ J por célula (von Stockard et al., 2006) y se supuso que la energía necesaria para el crecimiento es $6,25 \times 10^{-18}$ J (cinco veces la energía de mantenimiento).
- Las células individuales de *S. cerevisiae* producen un número limitado de hijas antes de envejecer (Mortimer y Johnston, 1959). Durante el envejecimiento, estas células experimentan varios cambios tanto morfológicos como fisiológicos, tales como aumento en el tamaño celular, en el número de cicatrices por la gemación (Bartholomew y Mittwer, 1953), en el tiempo de generación (Egilmez y Jazwinski, 1989) y disminución de la actividad metabólica (Jazwinski, 1990). El tiempo de vida de una célula de levadura se expresa como el número de generaciones o células hijas producidas, hasta que una célula nueva recién formada pierda la capacidad de producir nuevos brotes. El tiempo de vida promedio de la *S. Cerevisiae* es de alrededor de 25 divisiones, con un máximo aproximado a 40. Este tiempo de vida permanece más o menos constante bajo condiciones ambientales cambiantes, como por ejemplo, la temperatura, mientras que el tiempo de vida cronológico (el tiempo entre la formación y el envejecimiento) puede cambiar considerablemente (Gillespie et al., 2004). En las simulaciones se ha tomado como número total de reproducciones (parámetro CHT) los valores 8, puesto que cada célula tiene 8 vecinos o lugares disponibles para reproducirse; se tomaron también los valores 16 y 24 (múltiplos de 8).
- Cuando una célula de levadura se divide, la edad de la madre se aumenta en uno aunque la edad de la hija, generalmente, se reinicia en cero (Gillespie et al., 2004). Sin embargo, se ha observado que las hijas producidas por madres muy viejas pueden mostrar un tiempo de vida reducido como si fueran prematuramente viejas al momento de nacer. Esto ha llevado a la idea que existe un factor de senescencia que podría ser heredado por las células hijas (Egilmez y Jazwinski, 1989). En las generaciones siguientes, las hijas que nacen de estas células prematuramente envejecidas readquieren un tiempo de vida normal, indicando que el factor de senescencia podría desaparecer a lo largo de futuras divisiones. De esto se concluye que, hijas prematuramente envejecidas originadas por células madres viejas pueden producir hijas normales (Gillespie et al., 2004). Se realizaron simulaciones con valores 4, 3, 2 y 1 como cantidad de reproducciones que pueden tener las células envejecidas (parámetro CHTENV). Se consideró que una célula ha envejecido al llegar a su cuarta reproducción; las hijas de células envejecidas pueden o no heredar el factor de senescencia, de acuerdo a una función random.
- La carencia de nutrientes provoca la falta de fuentes de energía. En este trabajo la viabilidad de la célula es determinada por la energía tanto necesaria para el mantenimiento como para el crecimiento; si la levadura carece del mínimo requerido, se inactiva.
- Se supuso que cada célula se desarrolla en una posición determinada, aunque carece de movimiento.

La [Figura 3](#) muestra el diagrama de bloques de los procesos de alimentación y reproducción para microorganismos tipo levadura.

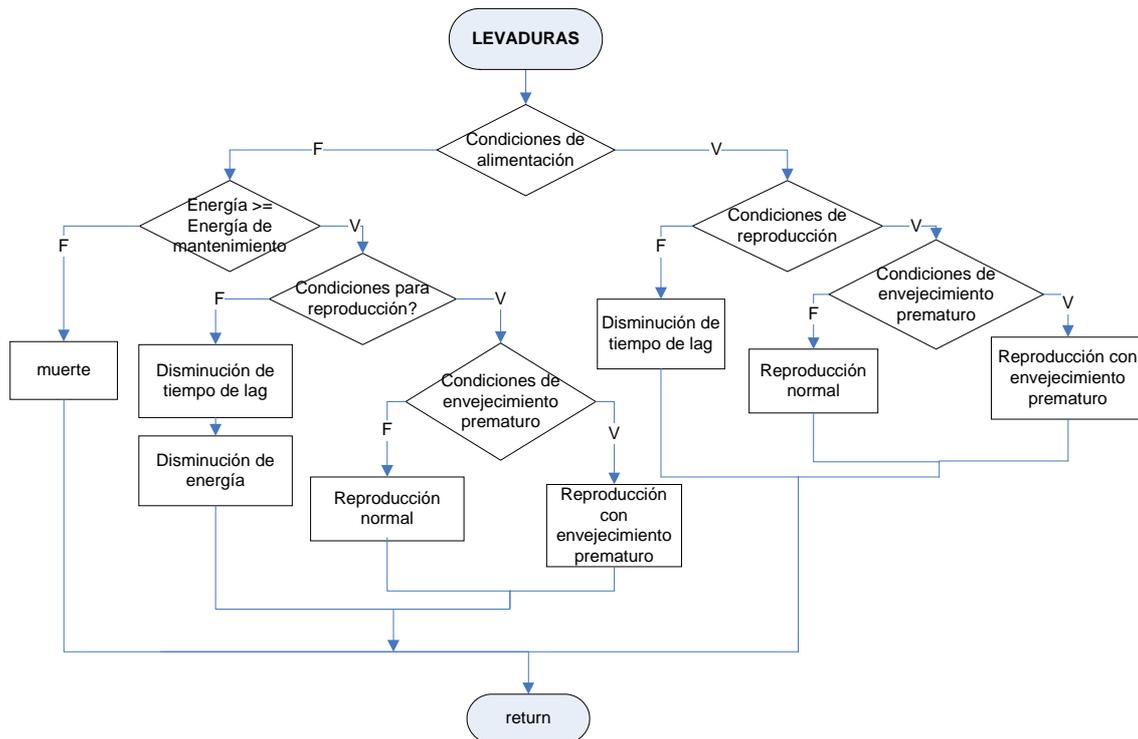


Figura 3. Diagrama de bloques para microorganismos tipo levadura

Tanto para bacterias como para levaduras se calculó la biomasa producida en la fase exponencial como la relación entre la cantidad de microorganismos formada y la cantidad de sustrato consumida, referidas al C-mol.

2 RESULTADOS

2.1 Bacterias

Como ejemplo, se muestran los casos de cantidad de alimento inicial igual a 80 y a 200 moléculas de sustrato. Las figuras 4 y 5 exponen que cuanto mayor es la cantidad de alimento, más prolongada es la fase estacionaria, y que cuanto más prolongada es la fase lag, puede notarse una menor pendiente en la fase exponencial de las curvas, lo que indica una menor velocidad de crecimiento. Para tiempos de lag entre 0 y 2, no se observan diferencias; a partir de 3, se distingue el retardo en el crecimiento por efecto de un mayor período de adaptación, la pendiente de la fase exponencial es menor.

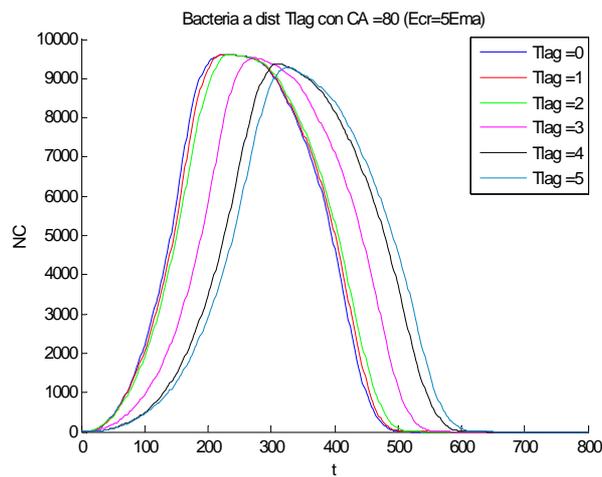


Figura 4. Curvas de crecimiento bacteriano a distintos tiempos lag con una concentración de sustrato de 80 moléculas de glucosa.

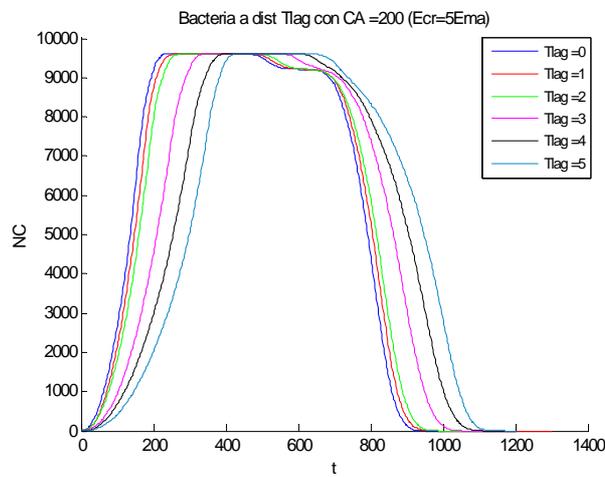


Figura 5. Curvas de crecimiento bacteriano a distintos tiempos lag con una concentración de sustrato de 200 moléculas de glucosa.

Se analizaron también las curvas de crecimiento para distintas cantidades de alimento manteniendo el tiempo de lag fijo. En la [Figura 6](#), se pone de manifiesto que el aumento en la concentración de sustrato prolonga la fase estacionaria. A concentraciones moderadas y elevadas de sustrato las velocidades de crecimiento son idénticas; sin embargo, la proliferación total queda limitada. ([Brock et al., 1987](#)). Esto está de acuerdo con los resultados expresados en la [Figura 7](#).



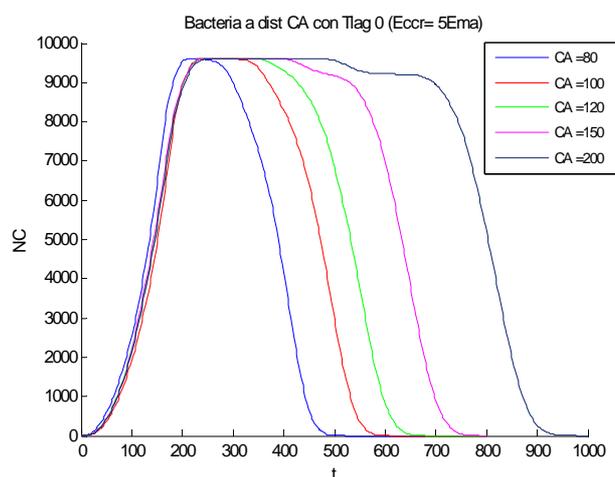


Figura 6. Influencia de la concentración de nutrientes en las curvas de crecimiento bacteriano (Tlag = 0)

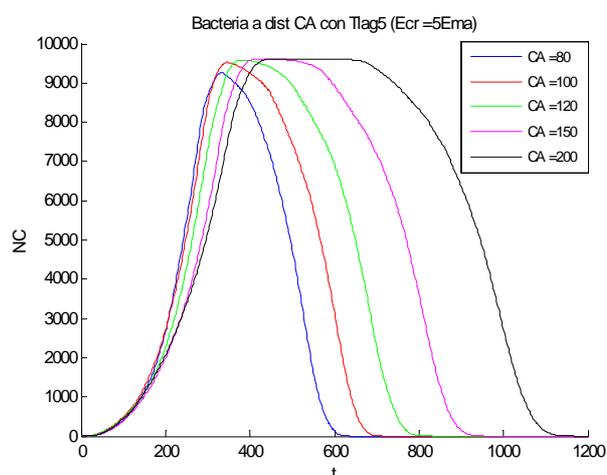


Figura 7. Influencia de la concentración de nutrientes en las curvas de crecimiento bacteriano (Tlag = 5)

En la Tabla 1 se presentan para la fase exponencial la pendiente de la curva, las diferencias entre el número inicial y final del número de células y la cantidad de moléculas de sustrato, y el rendimiento en biomasa. Puede notarse que un incremento en la fase lag ocasiona disminución de la pendiente de la fase exponencial y en el rendimiento en biomasa.

| Bacteria con cantidad de alimento (CA) 150 y distintos tiempos lag | | | | |
|--|----------------------------------|---|---|--------------------------------------|
| Tlag | Pendiente de la fase exponencial | Diferencia entre el número inicial y final de células (NCEL) /C-mol | Diferencia entre la cantidad inicial y final de moléculas de glucosa (CA)/C-mol | Rendimiento en Biomasa ($Y_{x/s}$) |
| 0 | 0.1818 | 1.8058 | 8.4333 | 0.2141 |
| 1 | 0.1513 | 1.8058 | 10.1333 | 0.1782 |
| 2 | 0.1657 | 1.1777 | 6.0333 | 0.1952 |
| 3 | 0.1616 | 0.6281 | 3.3000 | 0.1903 |
| 4 | 0.1444 | 0.5103 | 3 | 0.1701 |
| 5 | 0.1159 | 0.6281 | 4.6 | 0.1365 |

Tabla 1. Parámetros relevantes durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano.

2.2 Levaduras

Para una cantidad inicial de alimento igual a 900 moléculas de sustrato, se analizó el crecimiento de levaduras sin envejecimiento prematuro con 8, 16 y 24 reproducciones posibles tomando un tiempo de lag 0 (Figura 8). No se observan diferencias apreciables entre las curvas analizadas.

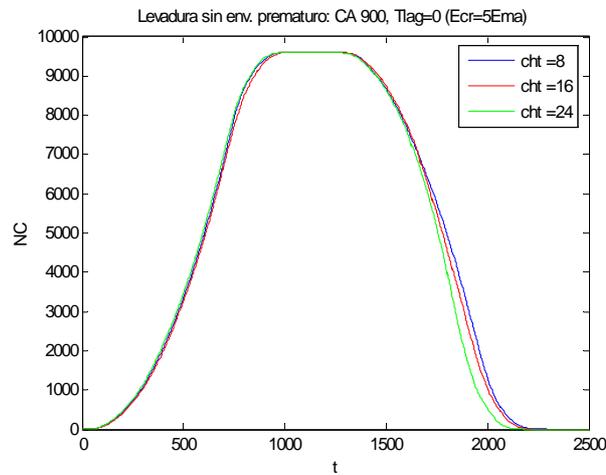


Figura 8. Curva de crecimiento de levaduras sin envejecimiento prematuro para CA=900 y tiempo de lag=0

La Figura 9 muestra este crecimiento considerando el envejecimiento prematuro con 0, 4, 6, 10 y 12 como cantidad de reproducciones que podrán tener las hijas prematuramente envejecidas, observándose una ligera disminución de la velocidad de crecimiento exponencial para los valores 4 y 6.

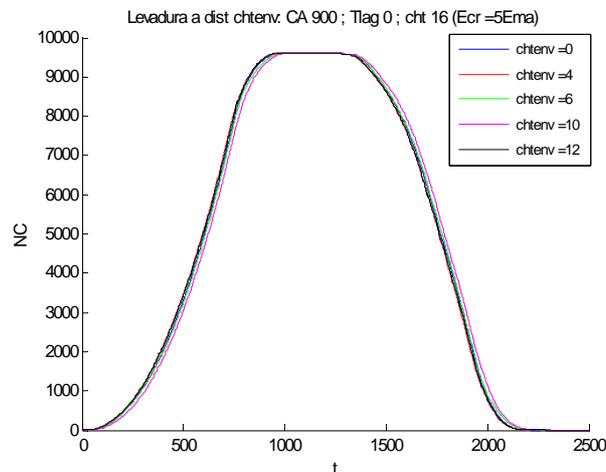


Figura 9. Ciclo vital de levaduras considerando el envejecimiento prematuro, con concentración de sustrato de 900 moléculas de glucosa

La influencia del tiempo lag durante el período vital, se presenta para tiempos de 0, 10, 15 y 20 tanto para el caso de crecimiento celular con y sin envejecimiento prematuro. Ver Figura 10 y Figura 11. Puede notarse en esta última la influencia de tiempos de adaptación de 10, 15, 20 y 25 para las células hijas.

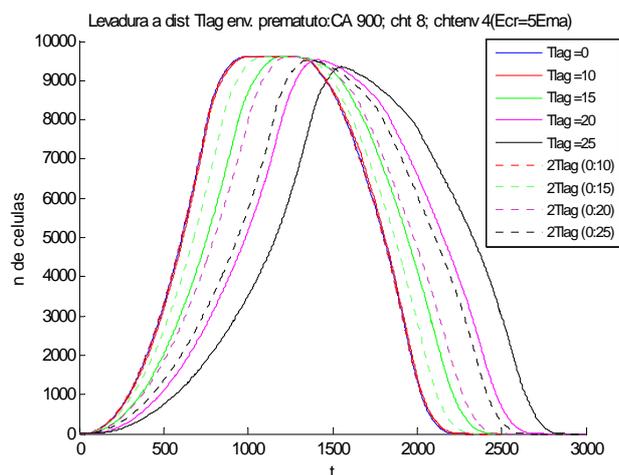


Figura 10. Curva de crecimiento de levaduras sin envejecimiento prematuro, para distintos tiempos lag considerando el tiempo lag de las células hijas.

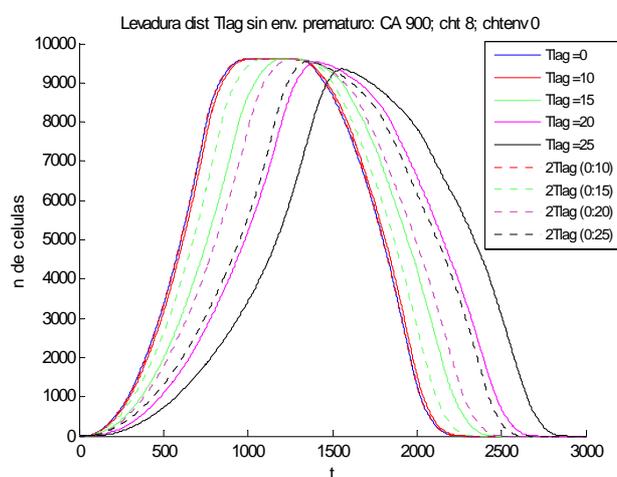


Figura 11. Curva de crecimiento de levaduras con envejecimiento prematuro, para distintos tiempos lag considerando el tiempo lag de las células hijas.

En las tablas 2 y 3 se exponen los parámetros relevantes de la fase exponencial que permiten el cálculo de rendimiento en biomasa: la pendiente de la curva, las diferencias entre el número inicial y final del número de células y la cantidad de moléculas de sustrato, y el rendimiento en biomasa, del crecimiento de levaduras con y sin factor de senescencia.

| Levadura con envejecimiento prematuro a distintos tiempos de latencia | | | | |
|--|---|--|--|--|
| Tiempo de lag | Pendiente de la fase exponencial | Diferencia entre el número inicial y final de células (NCEL) /C-mol | Diferencia entre la cantidad inicial y final de moléculas de glucosa (CA)/C-mol | Rendimiento en Biomasa ($\bar{Y}_{x/s}$) |
| 0 | 0.0559 | 1,0599 | 18.9667 | 0.0475 |
| 10 | 0.0634 | 1.7777 | 18.5600 | 0.0539 |
| 15 | 0.0521 | 1.3347 | 25.600 | 0.0443 |
| 20 | 0.0379 | 0.6673 | 18.8333 | 0.0301 |
| 25 | 0.0264 | 1.6095 | 61.0883 | 0.0224 |

Tabla 2. Parámetros relevantes durante la fase exponencial del crecimiento de levaduras con envejecimiento prematuro

| Levadura sin envejecimiento a distintos tiempos de latencia | | | | |
|--|---|--|--|--|
| Tiempo de lag | Pendiente de la fase exponencial | Diferencia entre el número inicial y final de células (NCEL) /C-mol | Diferencia entre la cantidad inicial y final de moléculas de glucosa (CA)/C-mol | Rendimiento en Biomasa ($Y_{x/s}$) |
| 0 | 0.0605 | 0.6673 | 9.3667 | 0.0712 |
| 10 | 0.058 | 0.6281 | 9.2 | 0.0683 |
| 15 | 0.047 | 0.8244 | 14.9 | 0.0553 |
| 20 | 0.0485 | 0.3926 | 6.8667 | 0.0572 |
| 25 | 0.0466 | 0.7066 | 12.8667 | 0.0549 |

Tabla 3. Parámetros relevantes durante la fase exponencial del crecimiento de levaduras sin envejecimiento prematuro

En la tabla 2 se muestra que un mayor período de latencia causa una caída en el rendimiento de biomasa. En la tabla 3, además de la influencia de este período, se puede observar que el envejecimiento prematuro disminuye notablemente la biomasa generada.

3 CONCLUSIONES

Los microorganismos cumplen un proceso vital durante el cual crecen, se reproducen y segregan productos bioquímicos complejos, que pueden ser recuperados y utilizados industrialmente. La masa microbiana producida simultáneamente con los productos bioquímicos, si bien es un producto residual, puede ser utilizado como suplemento en alimentos balanceados o en la industria agroalimentaria. Los avances en microbiología predictiva han resultado en valiosas herramientas para comprender y evaluar el desarrollo microbiano.

El modelo de simulación propuesto en este trabajo permite tomar en cuenta la influencia de la energía que los microorganismos necesitan para mantenerse y reproducirse; el tiempo de lag y la posibilidad de que las levaduras experimenten senescencia.

Las curvas de crecimiento microbiano obtenidas muestran las cuatro fases principales de evolución, detectándose menores pendientes en las curvas de crecimiento de levaduras que en las de bacterias, debido a que éstas últimas necesitan menor cantidad de energía para desarrollarse.

El período de adaptación ejerce una marcada influencia en el crecimiento en ambos tipos de microorganismos; tiempos lag de 3 a 5 MCS aumentan el tiempo de duplicación celular, es decir, que disminuye la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial, ocasionando un descenso en el rendimiento en biomasa ($Y_{x/s}$).

La cantidad de sustrato es un factor relevante del crecimiento, observándose que cantidades elevadas prolongan la fase estacionaria.

Para microorganismos tipo levaduras pudo comprobarse que el envejecimiento prematuro de las células hijas disminuye la velocidad de crecimiento debido a que es menor el número de replicaciones posibles que pueden tener las mismas. Además las levaduras requieren más tiempo que las bacterias para alcanzar la fase exponencial porque las células recientemente formadas necesitan un tiempo lag adicional.

El rendimiento en biomasa disminuye con el incremento de la fase de adaptación y con el envejecimiento prematuro de las células hijas.

REFERENCIAS

- J. Baranyi, T. Roberts. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. 23:277–294, 1994.
- J. Baranyi. Stochastic modelling of bacterial lag phase. *International Journal of Food Microbiology*. 73:203–206, 2002.
- J. Bartholomew, T. Mittwer. Demonstration of yeast bud scars with the electron microscope. *Journal of Bacteriology*. 65:272–275, 1953.
- T. D. Brock, D. N. Smith; M. T. Madigan. Cap. 7: El crecimiento y su control en *Microbiología*. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 4ª edición. 239-241. 1987.
- R. Buchanan, R. Whiting, W. Damert. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology*. 14:313–326, 1997.
- L. Calzone. Mathematical model of the budding yeast cell cycle. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, 2004
- W. Crueger y A. Crueger. Cap. 5: Métodos de fermentación en *Biología. Manual de microbiología industrial*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. 83-84. 1993.
- N. K. Egilmez, S. M. Jazwinski. Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 171:37–42, 1989.
- C. Gillespie, C. Proctor, R. Boys, D. Shanley, D. Wilkinson, T. Kirkwood. A mathematical model of ageing in yeast. *Journal of Theoretical Biology*, 229:189–196, 2004.
- M. Ginovart, D. López y J. Valls. INDISIM, an individual based discrete simulation model to study bacterial cultures. *Journal of Theoretical Biology*. 214: 305–319, 2002.
- B. Hills, K. Wright. A new model for bacterial growth in heterogeneous systems. *Journal of Theoretical Biology*. 168: 31–34, 1994.
- S. Jazwinski. Aging and senescence of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 4, 337–343, 1990.
- Z. Kutalik, M. Razaz, J. Baranyi. Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth. *Journal of Theoretical Biology*. 232: 285–299, 2005.
- L. Larcher y C. Cattaneo. Simulación de crecimiento de microorganismos utilizando el método de Monte Carlo. *Mecánica Computacional*. XXV: 2505-2518, 2006.
- R. McKellar. A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology*. 36: 179–186, 1997.
- R. McKellar. Development of a dynamic continuous-discrete-continuous model describing the lag phase of individual bacterial cells. *Journal of Applied Microbiology*. 90: 407–413, 2001.
- R. McKellar, X. Lu, K. Knight. Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 73: 127–135, 2002.
- T. McMeekin, J. Olley, T. Ross, D. Ratkowsky. Predictive Microbiology: Theory and application. John Wiley & Sons, Chichester, UK. 1993.
- A. Métris, S. George, M. Peck, J. Baranyi. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal of Microbiological Methods* 55: 821–827, 2003.
- R. Mortimer, J. Johnston. Life spans of individual yeast cells. *Nature*, 183: 1751–1752, 1959.
- T. Nyström. Stationary-phase physiology. *Annual Review of Microbiology*. 58: 161–181, 2004.

- C. Prats, D. Lopez, Antoni Giró, Jordi Ferrer, Joaquim Valls. Individual-based modelling of bacterial cultures to study the microscopic causes of the lag phase *Journal of Theoretical Biology* 241: 939–953, 2006.
- P. F. Stanbury. Cap. 1 Productos de microorganismos en *Biología molecular y biotecnología*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. 1-7. 1990.
- I. Swinnen, K. Bernaerts, E. Dens, A. Geeraerd, J. Van Impe. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 137–159, 2004.
- U. Von Stockard; T. Mascow; J. Liu; I. Marison; R. Patiño. Thermodynamics of microbial growth and metabolism: an analysis of the current situation. *Journal of Biotechnology*. 121: 517-533. 2006.
- M. D. Trevan, S. Boffey, P. F. Stanbury; K. H. Goulding, P. Stanbury. Cap. 6 Productos procedentes de los microorganismos en *Biotecnología – Principios biológicos*. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. 69-74. 1990.
- R. C. Whiting. Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 35: 467-494, 1995.
- Y. Wu, M. Griffiths, R. McKellar. A comparison of the Bioscreen method and microscopy for the determination of lag times of individual cells of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 30: 468–472, 2000.