



CUÉNTAME: ANÁLISIS DE IMAGEN APLICADO AL CRECIMIENTO DE COLONIAS DE LEVADURA

Rivas, Eva Ma¹, Gil, Elena¹, Melado, Ángela²

Tutores: Peinado, Jose¹, Barreiro, Pilar²

¹Dpto de Microbiología III. Fac. Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. CEI-Moncloa

²Dpto de Ingeniería Rural. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. CEI-Moncloa

Correo electrónico: e.rivas@bio.ucm.es

RESUMEN

Algunas levaduras son capaces de producir deterioro en alimentos desarrollándose en su superficie como colonias. La medida del crecimiento de éstas evaluando el aumento de células viables es una técnica laboriosa y tediosa, mientras que la medida del aumento de su radio proporciona un resultado inmediato. En este trabajo, como alternativa a la medición manual del radio de la colonia, se plantea el empleo de técnicas de análisis de imagen que permiten automatizar el proceso de medición. A partir de las imágenes escaladas digitales, adquiridas en escala de gris de las colonias en crecimiento se ha desarrollado un algoritmo de análisis de imagen con el software MATLAB®. Esta herramienta se ha utilizado para procesar diariamente las imágenes de colonias de cuatro especies de levaduras deteriorantes: *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula glutinis*. El error de predicción del tamaño de la colonia al aplicar el algoritmo es comparable con el cometido en la medición manual, no superando en ambos casos el 3-4% y obteniéndose un ajuste medio (R^2) entre ambas mediciones de 0.99, ajuste consistente e independiente de la especie de levadura estudiada. La observación de que el crecimiento bifásico del radio está correlacionado con las fases de aumento de células viables hace de este algoritmo una excelente herramienta.

Palabras clave: colonias de levadura, radio, análisis de imagen

INTRODUCCIÓN

La mayoría de lo que conocemos actualmente de las levaduras se ha obtenido a partir de cultivos microbianos creciendo en forma planctónica en medio líquido (Stovicek et al., 2010). En medios o alimentos líquidos, las condiciones son más homogéneas que en medios o alimentos sólidos, donde la propia estructura en sí interfiere en el comportamiento de los microorganismos contaminantes (Hills et al., 2001) ya que se ve afectada la difusión de los nutrientes, agua, la distribución de ácidos orgánicos o conservantes, el flujo gaseoso (Mendoza et al., 2010) y surgen dificultades físicas en la movilidad de los microorganismos (Koutsoumanis et al., 2004). Estos factores determinan el crecimiento de las levaduras en forma de colonias (agrupación de células idénticas originadas a partir de una única célula madre), como ocurre en la superficie de ciertos alimentos sólidos o gelificados como patés o quesos, salchichas, chorizo, carne, pan o ciertos tejidos vegetales (para una revisión ver Wilson et al., 2002). Por tanto, una de las principales manifestaciones del deterioro de alimentos sólidos es el crecimiento en masa de los microorganismos sobre la superficie de algunos de ellos.

Tradicionalmente el crecimiento microbiano se ha cuantificado en líquidos usando metodologías indirectas (recuento de células viables, peso, seco, microscopía...) o indirectas (densidad óptica) (Boundy-Mills, 2006). En el caso de colonias de microorganismos creciendo sobre superficies sólidas, la medida de su crecimiento evaluando el aumento de células viables, es una técnica laboriosa y tediosa, mientras que la medida del aumento del radio (Pirt, 1967), la única metodología directa aplicable solo al crecimiento en superficie, proporciona un resultado inmediato. La otra técnica



disponible es la destrucción de la estructura del alimento en un homogenizador y su conversión en un medio líquido mediante dilución de las muestras homogéneas.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo es realizar el seguimiento fotográfico a lo largo del tiempo del crecimiento de colonias de diferentes especies de levaduras sobre en un medio sólido de cultivo general de levaduras y la creación de un algoritmo de análisis de imagen con el software MATLAB® para cuantificar de forma objetiva y automatizada, el crecimiento de colonias por el aumento de su radio.

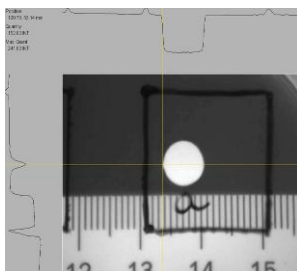
MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 CRECIMIENTO MICROBIOLÓGICO

Las cepas de levaduras utilizadas en este trabajo son *Zygosaccharomyces rouxii* Bch, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, *Rhodotorula glutinis* CECT 10145 y *Debaryomyces hansenii* PR66, cepas con diferente metabolismo energético aisladas a partir de alimentos deteriorados. Las cepas se inocularon en 100 ml de medio YMB (misma composición que el YMA a excepción del agar). Tras incubar en agitación durante 18 h a 28°C, se midió su D.O a 620 nm y se determinó el número de UFC/ml por interpolación en la recta patrón. Con el objetivo de obtener una única colonia, se procedió a hacer las diluciones adecuadas a partir de este cultivo en suero salino (9 g/l de NaCl) y posteriormente se colocaron gotas de 50 µl de la dilución apropiada, en la que se presumía que se obtendría una única UFC, en regiones rotuladas de 4 cm² de placas de Petri de 8.5 cm de diámetro que contenía 15 ml del medio elegido para el estudio del crecimiento de las colonias, YMA (el cual contiene 10 g/l de glucosa, 5 g/l proteosa peptona, 3 g/l extracto de levadura, 3 g/l extracto de malta y solidificado con 20 g/l de agar). Posteriormente se sellaron con parafilm y se incubaron a 28°C durante 21 días.

3.2 PROCEDIMIENTOS DE CONTEO

Imagen 1. Ejemplo de medida del diámetro de la colonia analizado con el software Quantity one



Se realizaron de forma periódica (diariamente durante la primera semana y después cada dos o tres días hasta los 21 días) fotografías digitales en escala de grises con el captador y analizador de imágenes Vilber Lourmat a distintas colonias de las cuatro especies junto con una regla para poder realizar la conversión de escala de píxeles a milímetros. Las fotografías se analizaron manualmente mediante el Software Quantity one para la medida del diámetro de las imágenes de las colonias en dos direcciones perpendiculares (Imagen 1) y después el radio se obtuvo por la conversión de píxeles a milímetros.

Como se ha indicado en el párrafo anterior, en este trabajo se plantea el empleo de técnicas de análisis de imagen que permiten automatizar el proceso de medición y que se detallan a continuación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las imágenes escaladas digitales, adquiridas en escala de gris de las colonias en crecimiento se ha desarrollado un algoritmo de análisis de imagen con el software MATLAB® para la extracción de los parámetros de interés de las mismas. Este algoritmo se basa en cuatro rutinas propias basadas en el toolbox homónimo de análisis: la primera de ellas, **mido_colonia**, lleva a cabo una segmentación en blanco y negro de las



Imagen 2: Imagen en escala de grises (autoescalada en color según el nivel de gris indicado en la barra de color) de una colonia. La regla se utiliza como referencia para la cuantificación del crecimiento de la colonia.

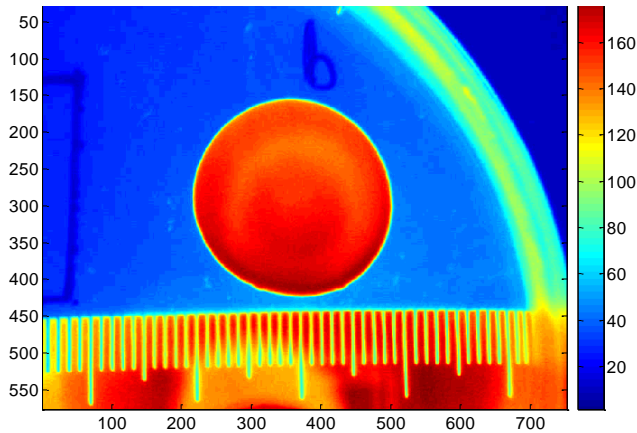


Imagen 3: Segmentación de la imagen anterior (según nivel de gris 90) e identificación por color de los distintos objetos que en ella aparecen. La colonia es el objeto identificado con el número 2 (según indica la escala de color).

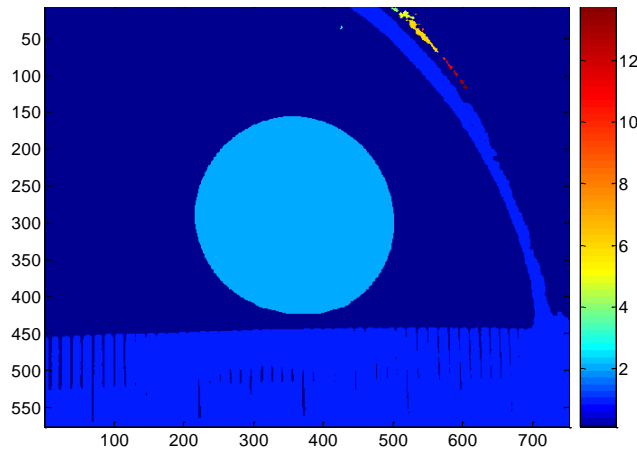
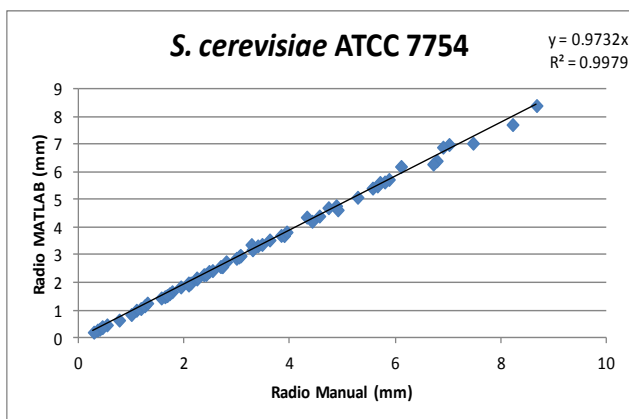


Figura 1. Recta de regresión estimada que compara los radios obtenidos con ambos métodos en una de las especies estudiadas.



hansenii respectivamente). El error de predicción en todos los casos no supera el 3-4%.

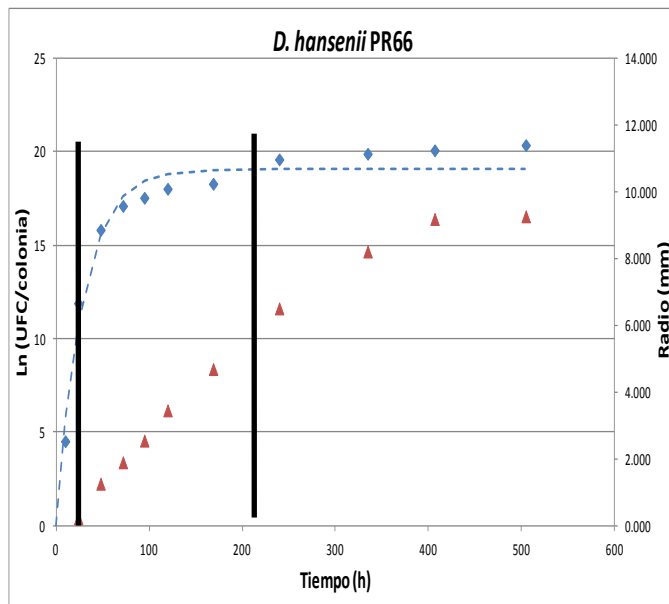
imágenes originales (ver Imagen 2) según un umbral de segmentación que corresponde a un nivel de gris autoajustado para cada imagen (90 para la imagen 2) calculado por aplicación del método Otsu, que minimiza la varianza dentro de las clases formadas por los píxeles clasificados como blancos y como negros respectivamente sobre el histograma, maximizando a la vez la diferencia entre ambas clases. La rutina del programa permite además identificar la colonia, mediante un algoritmo de conectividad en vecindario de 4 elementos (ver Imagen 3). La implementación de la función "regionprops" sobre la imagen segmentada y etiquetada, permite calcular una serie de parámetros del objeto de interés en este caso la colonia, como el área, el eje mayor y menor y el diámetro equivalente en píxeles.

La segunda rutina, **mido_all**, permite concatenar la rutina **mido_colonia** para todas las imágenes de un directorio. La conversión de escala (mm/pixel) se realiza utilizando la tercera rutina, **micro_escala**, mientras que la cuarta, **get_escala** permite establecer manualmente la escala de la fotografía sobre la regla con la que se adquiere la imagen original.

Esta herramienta se ha utilizado para procesar diariamente las imágenes de colonias de cuatro especies de levaduras deteriorantes. La comparación de 130 (33 de *Z. rouxi*, 62 de *S. cerevisiae*, 16 de *R. glutinis* y 19 de *D. hansenii*) datos de radio entre las distintas especies y tiempos obtenidos con este algoritmo, con los obtenidos con el método automatizado, pone de manifiesto que el error de predicción del tamaño de la colonia es comparable al resultado de la medición manual (Figura 1); aspecto verificable mediante réplica quintuple de la medida manual efectuada (error estándar medio de 0.0085, 0.0238, 0.0189, 0.0148 para *Z. rouxi*, *S. cerevisiae*, *R. glutinis* y *D.*



Figura 2. Gráfico en el que aparecen representados el crecimiento de células viables en la colonia (azul) junto con el aumento de su radio (rojo) a lo largo del tiempo. Las barras separan las distintas fases observadas en ambos casos.



1967; Pipe y Grimson, 2008; Rodin y Panikov, 1995) está correlacionado de forma no lineal con las fases de aumento de células viables en la colonia.

CONCLUSIONES

El algoritmo de análisis de imagen desarrollado se consolida como una herramienta óptima para la cuantificación del crecimiento de colonias de levaduras bajo distintas condiciones. Dicha cuantificación automatizada supone un ahorro de tiempo además de permitir cuadruplicar el número de muestras diarias que es posible evaluar.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al Campus de excelencia internacional por la beca de investigación PICATA y al proyecto GR35/10A (Santander-Central Hispano-UCM). A María Isabel de Silóniz y a José Martínez Peinado del grupo de Hongos y Levaduras de Interés (UCM) y al grupo LPF_Tagrafia (UPM), en especial a Pilar Barrerero Elorza por la creación del programa y a Eva Cristina Correa Hernando por su dedicación. Ambos grupos de investigación forman parte del CEI Moncloa.

BIBLIOGRAFÍA

- Boundy-Mills K. (2006). The yeast Handbook. Querol A., Fleet G. H. (eds). Springer-Verlag, Berlin. 67-100.
- Cooper A.L., Dean A.C.R., Hinshelwood C. 1968. Proc. R. Soc. Lond. B. 171, 175–199.
- Gray B.F. y Kirwan N.A. 1974. Biophys. Chem. 1, 204-213.
- Hills B.P., Arnould L., Bossu C., Ridge Y.P. 2001. Int. J. Food Microbiol. 66 (3): 163–173
- Kamath R.S. y Bungay H.R. 1988. J. Gen. Microbiol. 134, 3061–3069.
- Koutsoumanis K.P., Kendall P. A., Sofos J.N. 2004. Food Microbiol. 21 (4): 415–422
- Mendoza M., Verboven P., Tri Ho Q., Kerckhofs G., Wevers M., Nicolai B. 2010. *J. Food Eng.* 99 (2) 206–215
- Pipe L.Z. y Grimson M.J. 2008. Mol Biosyst. 4, 192-198.
- Pirt, S.J. 1967. J. Gen. Microbiol. 47, 181–197.
- Rodin V.B. y Panikov N.S. 1995. Mikrobiologiya, 64, 485–491.
- Stovicek V., Vachova L., Kuthan M., Palkova Z. 2010. Fungal Genet. Biol. 47(12):1012-22
- Wilson P.D., Brocklehurst T.F., Arino S., Thuault D., Jakobsen M., Lange M., Farkas J., Wimpenny J.W., Van Impe J.F. 2002. Int. J. Food Microbiol. 73, 275-89.