



## IN-FORMA-ME: ANÁLISIS CUANTITATIVO DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN COLONIAS DE LEVADURA

Gil de Prado, Elena<sup>1</sup>; Rivas, Eva María<sup>1</sup>; de Silóniz, María Isabel<sup>1</sup>

Tutores: Barreiro, Pilar<sup>2</sup>; Diezma-Iglesias, Belén<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. CEI-Moncloa.

<sup>2</sup>Dpto. de Ingeniería Rural. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. CEI-Moncloa.  
elena.gil@ucm.es

### RESUMEN

Las levaduras pueden crecer en medio sólido como colonias superficiales. Su forma y borde se pueden emplear en la identificación del género y/o la especie a que pertenecen. Nosotros hemos definido dos parámetros para describir cuantitativamente la morfología de colonias; el índice de excentricidad ( $E_i$ ) calculado como el ratio entre los diámetros ortogonales vertical y horizontal y, el índice de Fourier ( $F_i$ ) definido como el número mínimo de coeficientes de Fourier que son necesarios para modelizar el borde de la colonia con una bondad de ajuste del 99%. Este análisis se ha automatizado utilizando Matlab. Este estudio se ha realizado con cuatro cepas pertenecientes a cuatro especies diferentes y comparando nuestros resultados con los previamente publicados se concluye que la inhibición entre colonias es una característica que se encuentra más extendida entre levaduras que la irregularidad del borde. Actualmente estamos aplicando dicha rutina para el análisis del efecto de otros factores intrínsecos y extrínsecos sobre la morfología de la colonia.

**Palabras clave:** Colonias de levadura, índice de Fourier, índice de excentricidad.

### INTRODUCCION

La forma y borde de las colonias han sido características morfológicas usadas tradicionalmente en el proceso de identificación de cepas microbianas, incluidas las levaduras (Barnett et al., 1990). Esta metodología descriptiva ha sido mejorada mediante la incorporación de nuevas técnicas de análisis de imagen que permiten obtener resultados cuantitativos de forma más rápida y automatizada (Puchkov, 2010).

Tanto la afiliación taxonómica (Kocková-Kratochvilová, 1990) como muchos factores externos se encuentran involucrados en las diferencias de la morfología de las colonias, así como las condiciones ambientales de crecimiento (fuente de carbono, concentración de agar y temperatura de crecimiento, entre otros) (Boschke y Bley, 1998; Granek y Magwene, 2010). Los cambios morfológicos también pueden deberse a la interacción entre colonias. Una colonia puede inhibir el crecimiento de una colonia vecina por señalización intercolonial (Palková et al., 1997).

El objetivo de este estudio ha sido la búsqueda y validación de métodos que permitan una medida cuantitativa de los caracteres morfológicos relevantes de colonias de levaduras. Se proponen dos índices que miden con exactitud y precisión dos procesos relacionados con la morfología de las colonias: el cambio en la morfología inducido en pares de colonias por señalización intercolonial (índice de excentricidad) y el incremento de la irregularidad del borde de las colonias conforme aumenta la edad de las mismas (índice de Fourier). Esta metodología ha sido aplicada en cuatro especies de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces fabryi*, *Rhodotorula glutinis* y *Zygosaccharomyces rouxii*.



## MATERIAL Y MÉTODOS

Cuatro especies, seleccionadas por sus diferencias filogenéticas y de metabolismo energético, fueron usadas en este estudio: *S. cerevisiae* ATCC 7754, *D. fabryi* PR66, *R. glutinis* CECT 10145 y *Z. rouxii* Bch. Las cepas se inocularon como gotas de 10  $\mu$ l, que contenían  $10^3$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC), en puntos previamente señalados de placas de Petri con 15 ml de un medio de cultivo general de levaduras, YMA (Yeast Morphology Agar, glucosa 1%, proteosa de peptona n°3 0.5%, extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3% y agar 2%). Las placas fueron inoculadas para obtener i) una única colonia (situada en el centro), ii) dos colonias (separadas a una distancia de 2, 3 y 5 cm), y iii) seis colonias en la misma placa (separadas por las mismas distancias). Las placas fueron cubiertas con parafilm para evitar la desecación e incubadas durante 116 días a 28°C.

Las fotografías digitales en escala de grises se realizaron con el capturador y analizador de imágenes Vilber Lourmat a partir del segundo día de incubación. Las fotografías se analizaron mediante el uso de unas rutinas Matlab v. 7.0 (MathWorks). Primero, se realizó una segmentación automática empleando el método Otsu, para diferenciar los objetos de la imagen del fondo. Finalmente, diversos parámetros de las colonias (área, diámetros mayor y menor) fueron calculados en píxeles y transformados a milímetros a través de un factor de conversión. El índice de excentricidad ( $E_i$ ) fue calculado como el cociente entre los valores de los diámetros ortogonales mayor y menor de cada colonia. El índice de Fourier se obtuvo automáticamente a partir de una función *ad hoc* (Matlab). El método de la elíptica de Fourier (Kuhl y Giardina, 1982) calcula los descriptores armónicos de la elíptica de Fourier, aquí simplificados como coeficientes de Fourier, que pueden delinear cualquier tipo de forma con un contorno cerrado de dos dimensiones. En este estudio, la complejidad de los bordes de las colonias fue evaluada a través del número de coeficientes de Fourier necesarios para reproducir las coordenadas  $x$  e  $y$  con coeficientes de correlación de 0.998 o superiores. Hemos denominado a este número el índice de Fourier ( $F_i$ ). La Figura 1 muestra el desarrollo del proceso de correlación con el ajuste de aproximación de las elípticas de Fourier al borde de una colonia de *S. cerevisiae*, generado para valores de  $F_i$  de 1, 8, 14 y 30 y sus correspondientes coeficientes de correlación.

**Figura 1. Aproximación de Fourier al borde de una colonia de *S. cerevisiae*: (A) Imagen original; (B)  $F_i = 1$  y coeficiente de correlación para  $x$  e  $y$  ( $CC_{xy}$ ) = 0.992; (C)  $F_i = 8$  y  $CC_{xy} = 0.996$ ; (D)  $F_i = 14$  y  $CC_{xy} = 0.998$ ; y (E)  $F_i = 30$  y  $CC_{xy} = 0.999$**



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

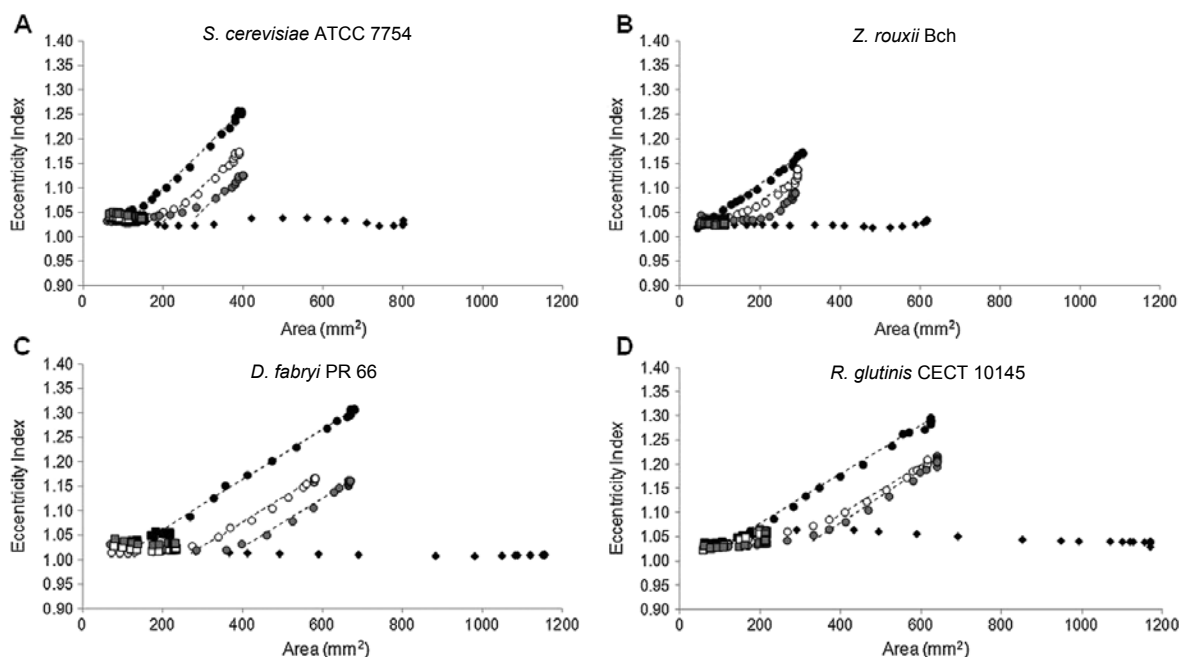
-Análisis cuantitativo de la circularidad de las colonias: índice de excentricidad

El índice de excentricidad se mantuvo cercano a 1 con una colonia por placa y la pérdida de circularidad ( $E_i > 1$ ) se observaba en placas con al menos dos colonias en cualquiera de las especies (Figura 2). Así concluimos que el incremento en  $E_i$  es consecuencia de las interacciones entre las colonias y no de su edad. La pérdida de circularidad en los pares de colonias es producida por un mensajero químico, el amonio (Palková et al., 1997), que produce una inhibición del crecimiento en los bordes enfrentados de las colonias. La inhibición afecta únicamente los lados enfrentados, evitando su unión, y



permitiendo el crecimiento en el resto del borde de la colonia (Gil de Prado et al., 2014), no existiendo una inhibición en términos de tamaño total de la colonia.

**Figura 2. Relación entre el índice de excentricidad de la colonia y su área. Una colonia, rombos; dos colonias, círculos; seis colonias, cuadrados. Distancias entre colonias vecinas: 2 cm, negro; 3 cm, blanco; 5 cm, gris. Regresión lineal, líneas discontinuas. Cada punto está calculado como la media de al menos tres colonias procedentes de placas distintas.**



En la Figura 2 se observa que la distancia entre las colonias es un factor importante en la pérdida de circularidad ya que el aumento de la misma retrasa el efecto observado o incluso no llega a aparecer si la distancia entre colonias es igual o superior a 5 centímetros. Un tamaño mínimo de las colonias (área umbral), tiene que ser alcanzado antes de que comience la inhibición. Una vez que la inhibición ha comenzado, el índice de excentricidad aumenta proporcionalmente con el área de las colonias y a una tasa constante, observándose líneas rectas paralelas en los gráficos, más claramente en las especies oxidativas (*D. fabryi* y *R. glutinis*) (Figura 2).

Todas las especies mostraron colonias jóvenes circulares, con valores de  $E_i$  iniciales entre 1.02-1.05 después de dos días de crecimiento. Sin embargo, el área umbral (datos no mostrados) era inferior en *Z. rouxii* que en las otras tres especies. El valor máximo de  $E_i$  depende del número de colonias por placa, porque este número determina el área máxima que puede ser alcanzada. Por ello, la excentricidad no se observó cuando el número de colonias por placa fue tal que ninguna de ellas alcanzó el área umbral (Figura 2) (Gil de Prado et al., 2014). Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la inhibición intercolonial es una propiedad general de las especies de levaduras (Palková et al., 1997; Palková y Forstová, 2000).

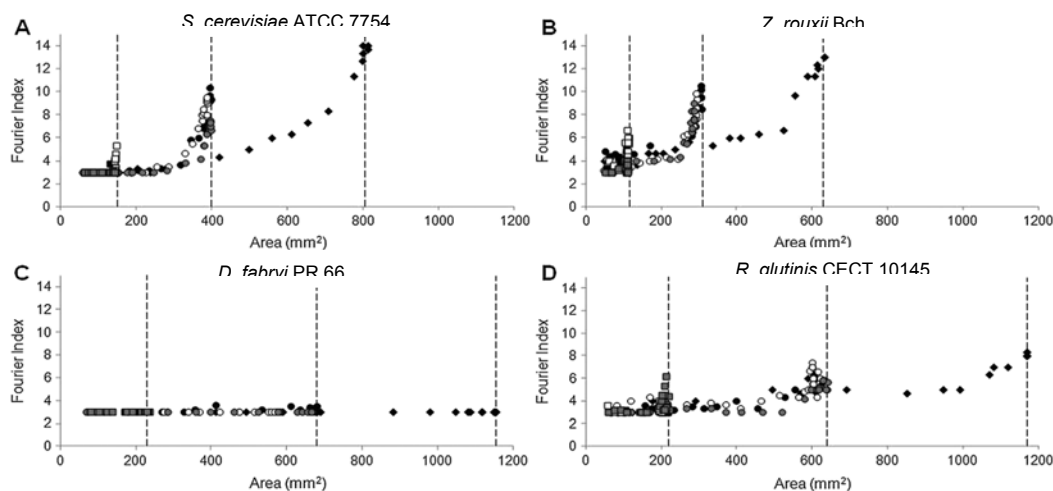
-Análisis cuantitativo de la complejidad del borde de las colonias: índice de Fourier

El índice de Fourier depende de la especie. En la Figura. 3 se representa la evolución de los valores  $F_i$  con el tamaño de la colonia para las cuatro especies. En colonias jóvenes, (2 ó 3 días)  $F_i$  mostraba el valor mínimo de 3 (elipse) en todas las especies, indicando que el borde era muy regular. En el caso de colonias maduras, se observaron diferencias considerables excepto en *D. fabryi*, especie en la que este valor se mantenía, pero en las especies fermentativas llegó a 14 (Figura 3). Se percibió un patrón común en todas las colonias que mostraban el efecto: el valor del  $F_i$  se mantenía constante y cercano a 3



hasta que el área de la colonia se aproximaba a su valor máximo. Después, se observaba un aumento repentino en la complejidad del borde, más abrupto conforme el número de colonias por placa aumentaba. En todos los experimentos, independientemente del número de colonias por placa y la distancia, el borde lobulado era una característica asociada a fases finales del crecimiento de la colonia, consecuencia del agotamiento de los nutrientes, como indicaron los estudios de Boschke y Bley (1998). Las especies fermentativas mostraron una complejidad del borde mucho mayor que las oxidativas.

**Figura 3. Relación entre el índice de Fourier de la colonia y su área. Una colonia, rombos; dos colonias, círculos; seis colonias, cuadrados. Distancias entre colonias vecinas: 2 cm, negro; 3 cm, blanco; 5 cm, gris. Valor máximo de área, líneas discontinuas verticales. Cada punto está calculado como la media de al menos tres colonias procedentes de placas distintas.**



## CONCLUSIONES

Hay pocos estudios del crecimiento de levaduras en medio sólido. El análisis de imagen constituye una herramienta muy útil para la obtención de gran cantidad de información de forma rápida y automática. El índice de excentricidad y el índice de Fourier han demostrado que pueden ser buenos parámetros para cuantificar la circularidad de las colonias y medir la complejidad de las mismas, respectivamente, a lo largo del tiempo permitiendo realizar comparaciones entre diferentes especies. Se propone la utilización de estos índices para el estudio cuantitativo del efecto de modificaciones genéticas y factores ambientales sobre la morfología de las colonias.

## AGRADECIMIENTOS

Financiado por el proyecto GR3/14 (UCM-Banco Santander) y las becas de investigación FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, y PICATA del Campus de Excelencia Internacional. A José M. Peinado del grupo de Hongos y Levaduras de Interés en Agroalimentación (UCM) por su colaboración.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. 1990. Cambridge Univ. Press, Cambridge  
Boschke E. and Bley T.H. 1998. Acta Biotechnol., 1: 17–27.  
Gil de Prado E., Rivas E.M., de Silóniz, M.I., Diezma B., Barreiro P., Peinado J.M. 2014. Yeast, 31: 431–440.  
Granek J.A. and Magwene P.M. 2010. PLoS Genet., 6: doi: 10.1371/journal.pgen.1000823.  
Kocková-Kratochvilová A. 1990. 2<sup>nd</sup> edn. Wiley-VCH, Weinheim.  
Kuhl F.P. and Giardina C.R. 1982. Comput. Graphics Image Proc., 18: 236–258.  
Palková Z., Janderová B., Gabriel J., Zikánová B., Pospíšek M., Forstová J. 1997. Nature, 390: 532–536.  
Palková Z. and Forstová J. 2000. J. Cell. Sci., 113: 1923–1928.  
Puchkov E.O. 2010. Microbiology, 79: 141–146.