

MODELO PARA EL ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DEL GÉNERO *ARTHRIINIUM* SOBRE UN SUBSTRATO SÓLIDO

CALVO, M.A.; AGUT, M. Y CALVO R.M.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es presentar un modelo del crecimiento de las especies del género *Arthriniium*. El uso de un programa de ordenador nos ha permitido determinar el patrón de crecimiento que siguen las cepas del género. El mapa de crecimiento de *Arthriniium* es consecuencia de los ritmos endógenos y determina la formación de zonas en forma de espiral.

Palabras clave: *Arthriniium*, modelo de crecimiento, cinética, crecimiento de las colonias, tratamiento de imágenes

INTRODUCCIÓN

El diámetro de las colonias y la tasa de crecimiento radial son parámetros que se consideran usualmente en la ejecución de bioensayos y en las investigaciones fisiológicas de los hongos.

El estudio de los principios cualitativos y cuantitativos que rigen la formación de las colonias microbianas es de sumo interés debido a que guarda relación con el patrón predominante que conduce a la formación de las colonias microbianas en la naturaleza, al tiempo que el cultivo de los microorganismos sobre un medio sólido, es uno de los métodos básicos de uso común en un laboratorio de Microbiología.

Debido a las peculiaridades propias de la organización miceliar, la colonia fúngica se desarrolla sobre una placa de medio de cultivo, en función del crecimiento exponencial de la zona periférica y no en función de la masa total. Este proceso resulta ser el producto de dos parámetros: la tasa específica de crecimiento y la anchura de la zona de crecimiento periférica (Trinci, 1971; Caldwell y Trinci, 1993). En 1980, Panikov *et al.* aportaron resultados experimentales y modelos cinéticos de las colonias basados en estos datos. Resulta interesante observar que los cultivos que estudiaron diferían poco en su tasa de crecimiento y pudieron comprobar que la diferencia en el

crecimiento de sus colonias, al desarrollarse sobre un medio de cultivo sólido, venía determinada totalmente por el tamaño de la zona de crecimiento periférica.

Las colonias fúngicas no presentan un desarrollo estático y, por ello, en varios estudios realizados se ha intentado establecer su cinética de forma discontinua, dejándose de considerar otros factores como las variaciones que ocurren esencialmente durante el primer día de su crecimiento como p.e. modificaciones en la textura, color, cambios en las diferentes zonas de crecimiento, etc.

Hasta la fecha actual, las formas que las colonias adoptan en los ambientes naturales no han sido sistemáticamente observadas. Se ha indicado la existencia del llamado crecimiento en anillos o círculos y, en el caso de algunos basidiomicetos, se supone que la forma de la colonia también debe ser circular, con variaciones en la textura dependientes de la cepa.

La elongación de las hifas determina diferencias en la densidad del micelio que macroscópicamente se traducen por áreas con diferente coloración en función de la madurez, número de conidios o esporas asexuales formados y en la presencia o ausencia de hifas estériles.

Tradicionalmente, el diámetro de las colonias alcanzado por los hongos en un determinado medio de cultivo y en unas condiciones de incubación previamente establecidas, ha sido considerado como un criterio inicial en la identificación de las especies fúngicas.

Las tasas de crecimiento de algunas colonias fúngicas pueden ser expresadas en forma de espiral (Bourret *et al.*, 1969). Estos autores, bajo unas condiciones concretas de cultivo, observaron que diferentes cepas fúngicas formaban anillos concéntricos de conidios que demostraban el fenómeno de zonación. La zonación se producía con una periodicidad constante al mantener estables las condiciones ambientales.

Las colonias de varias especies de hongos filamentosos han sido descritas en base al desarrollo que muestran sobre agar de Sabouraud dextrosa o sobre agar extracto de maltas al 2%, tras 7 a 14 días de incubación cuando son mantenidas a 28°C. La forma clásica de medir las colonias es mediante el uso de un regla que permita registrar el diámetro alcanzado, que normalmente se expresa en milímetros. Otro sistema que puede utilizarse para el estudio de las colonias fúngicas y de cómo se desarrollan es el tratamiento de imágenes a tiempo real.

El principal objetivo del presente trabajo es el seguimiento del crecimiento de colonias fúngicas a través del análisis de imagen a tiempo real con el fin de establecer patrones de crecimiento de los hongos en estudio.

La ejecución de este sistema de tratamiento de imágenes fue elegido para poder estudiar el crecimiento de las colonias de una forma objetiva, haciendo posible determinar si la zonación es constante entre las cepas de una misma especie y diferente de las cepas que actualmente se encuentran incluidas bajo otra especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas en estudio pertenecen al género *Arthriniium* y se hallan depositadas en la colección de cultivos de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona. Las cepas fueron aisladas a partir de diferentes substratos: suelos, aire y alimentos.

Con el fin de obtener cultivos homogéneos, se prepararon suspensiones de conidios de cada una de las cepas. Previamente, las cepas fueron inoculadas sobre agar extracto de malta al 2%. Las placas fueron incubadas durante 14 días a 28°C. Tras la incubación, y tras confirmar la identidad de las colonias, se recogieron los conidios con ayuda de bolas de vidrio estéril de 3 mm de diámetro suspendidas en solución salina estéril (NaCl 0,85%). Las suspensiones de conidios obtenidas fueron filtradas a través de gasa estéril hasta lograr eliminar cualquier resto de micelio. Las suspensiones de conidios fueron ajustadas a 10^8 u.f.c./mL.

Mediante el uso de asas calibradas, se depósito un inóculo de la suspensión de conidios en el centro de una placa de petri que contenía agar extracto de malta al 2%. Las placas se incubaron a 28 °C. A partir de las 72 horas de incubación y hasta que las colonias alcanzaron los 7 días de edad, éstas fueron analizadas diariamente con el fin de observar y cuantificar el crecimiento de las colonias y poder establecer si existían zonas diferenciadas en las mismas en función del tiempo de incubación.

El elemento principal que conforma el sistema de imagen utilizado es un VINIX, UNIX versión de VICOM/PDF. VINIX está conectado al ETHERNET del Centro de Cálculo de la Universitat Autònoma de Barcelona y a través de éste al MICROVAX II COMPUTER. Entre los periféricos del VINIX se encuentra una cámara de alta resolución HAMAMATSU C2400-01. Conectado a la cámara, se utilizó un microscopio Zeiss.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos pueden observarse en las figuras 1 a la 8. El análisis de los resultados permite establecer un patrón típico del crecimiento de las cepas de *Arthriniium* estudiadas, no pudiéndose establecer diferencias entre las dos especies investigadas.

La fig. 1 presenta el crecimiento de un inóculo tras tres días de incubación. La fig. 2 muestra el desarrollo de la zona más externa de la misma cepa. La fig. 3 corresponde a los resultados obtenidos en el estudio de la evolución del inóculo de la zona media de la colonia al final del estudio.

En las fig. 4 a la 8 se presentan los patrones obtenidos tras analizar otras cepas del género.

El software utilizado ha hecho posible obtener un informe completo de los cambios sucedidos para cada placa, que incluye los detalles completos del proceso de desarrollo.

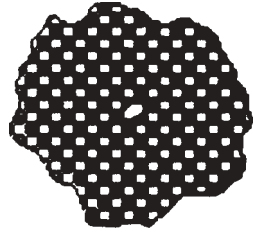


FIGURA 1. *Arthriniium aureum*. *Incremento del diámetro del inóculo a partir del tercer día de incubación.*

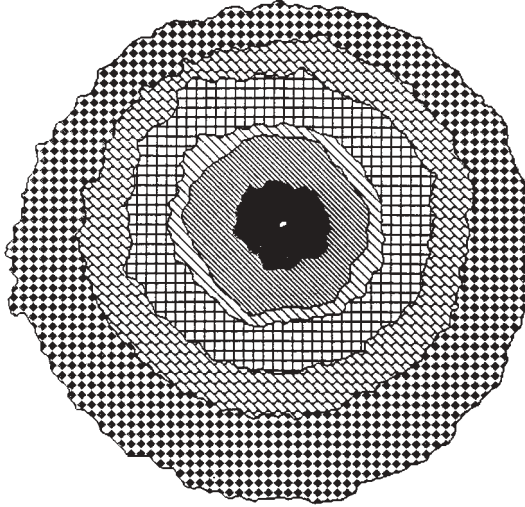


FIGURA 2. *Arthriniium aureum*. *Desarrollo de la zona más externa de la colonia.*

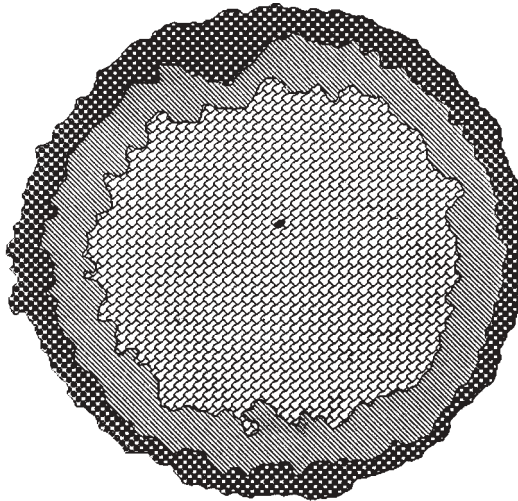


FIGURA 3. *Arthriniium aureum*. *Desarrollo máximo del inóculo. Se representa la evolución de la zona media al final del estudio.*

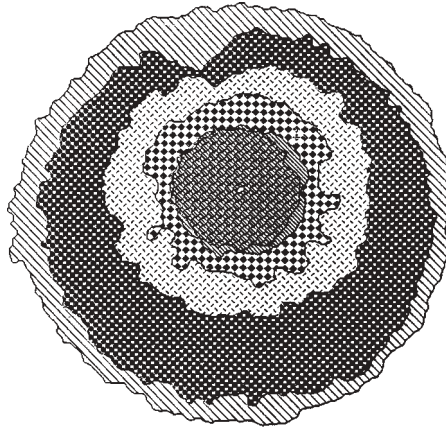


FIGURA 4. *Desarrollo de Arthrimum aureum después de siete días de su inoculación.*

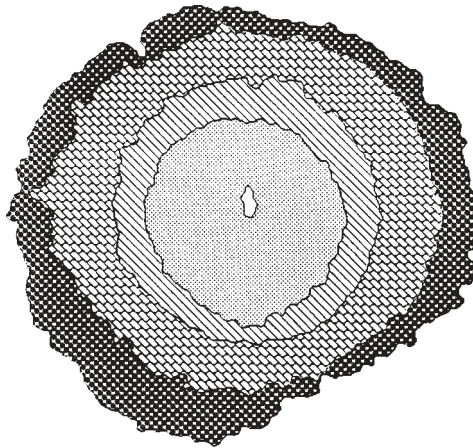


FIGURA 5. *Desarrollo de Arthrimum phaeospermum después de siete días de su inoculación.*

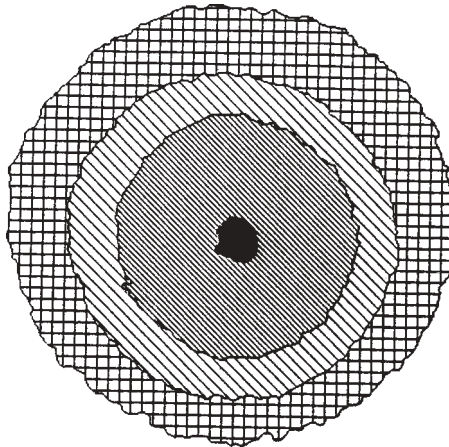


FIGURA 6. *Desarrollo de Arthrimum marii después de siete días de su inoculación.*

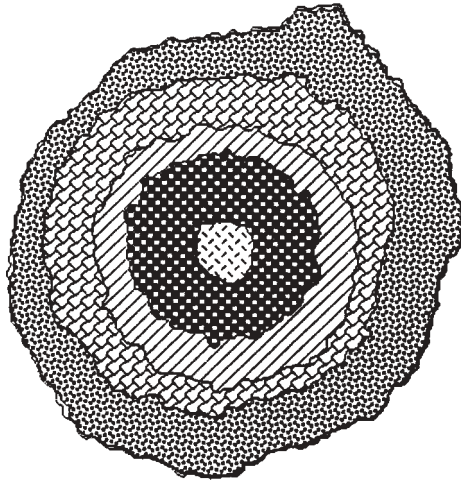


FIGURA 7. *Desarrollo de Arthrimum serenensis después de siete días de su inoculación.*

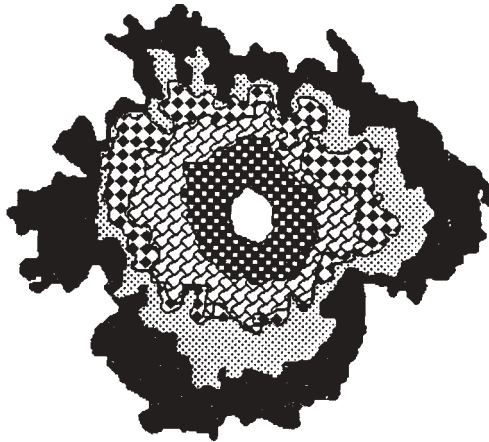


FIGURA 8. *Desarrollo de Arthrimum urticae después de siete días de su inoculación.*

Al analizar los resultados obtenidos con el sistema de tratamiento de imágenes a tiempo real, podemos concluir que se forman tres zonas de crecimiento claramente definidas durante el desarrollo de las cepas en estudio. La zona media de las colonias se sitúa en un valor de diámetro que corresponde al margen externo de la colonia formado en las primeras 24 horas de incubación y, del mismo modo y de forma sucesiva se alcanza el máximo tamaño de la colonia.

Todas las cepas investigadas en nuestro trabajo después de 14 días de incubación sobre agar extracto de malta al 2% alcanzaron el máximo diámetro que permitieron las cápsulas de Petri utilizadas, es decir, 90 mm.

Los resultados obtenidos son coherentes con los obtenidos en un estudio similar para *Nectria cinnabarina* en la que se constató que el 40% del cultivo presentaba un

patrón de zonación que podría ser prácticamente debido a la superposición e anillos concéntricos. Tal y como ya describieron Bourret *et al.* en 1969, la zonación obtenida en forma de espiral corresponde a una espiral de Arquímedes. Tras este estudio, se demuestra que este tipo de patrón de zonación coincide con el que presentan cepas pertenecientes a otros géneros como por ejemplo en cepas del género *Penicillium*.

BIBLIOGRAFÍA

- Bourret, J.A.; R.G. Lincoln y B.H. Carpenter. 1969. Fungal endogenous rhythms expressed by spiral figures. *Science* 166: 763-764.
- Caldwell, I.Y. y A.P.J. Trinci. 1973. The growth unit of the mould *Geotrichum candidum*. *Archiv. Mikrobiol.* 88: 1-10.
- Panikov, N.S.; V.D. Afremova y I.V. Aseeva. 1980. Kinetics of growth of colonies of the fungi. *Microbiologiya* 50: 55-61.
- Trinci, A.P.J. 1971. Influence of the width of the peripheral growth on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *J. Gen. Microbiol.* 67: 325-344.
- Trinci, A.P.J. 1974. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *J. Gen. Microbiol.* 81: 225-236.