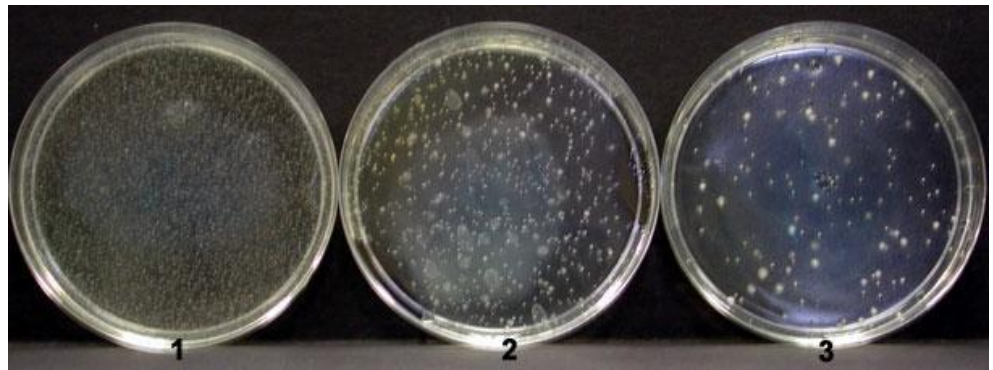


# **NOLA EBATZI MIKROBIOLOGIAREN GAINEKO ALDERDI PRAKTIKOAK**

## **3. BIOMASAREN KALKULUA**



Inés Arana, Maite Orruño eta Isabel Barcina

Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

### 3. BIOMASAREN KALKULUA

Biomasa materia biziaren kantitatea da. Komunitate biologikoaren segmentu batean pilatzen den energia kopurua neurtzen du. Populazioaren biomasa/mikrobiokomunitatea kuantifikatzeko metodo desberdinak erabil daitezke. Batzuk oso errazak dira erabiltzeko, beste batzuk, ordea, korapilatsuagoak dira eta neurri ez-zuzenak erabiltzen dituzte. Adibide batzuk ikusiko ditugu.

Biomasa kuantifikatzeko metodo zuzen eta erraz bat pisu lehorra zenbatestea da (laginaren gramo edo mililitroko). Hau egiteko hurrengo materiala behar da: doitasun-balantza, lagina jartzeko ontzia (aluminiozko paperarekin egin daitekeena) eta mufla lagina lehortzeko.

Metodo hau maiz erabiltzen da kultura puruekin (legamiazkoak,...), baina lagin naturalekin (sedimentuak, itsasoko ur-laginak, ...) erabiltzeko orduan arazoak sor daitezke.

Berriro, ebatzi hurrengo problemak:

3.1. *Saccharomyces cerevisiae* duen kultura baten pisu lehorra zehazteko, esekiduraren 10 ml zentrifugatu ziren 5.000 g-tan. Gainjalkina kendu eta gero, 3 ml gatz-soluzio gehitu ziren eta astindu egin zen esekidura homogenea lortu arte. Esekidura honen ml bat ontzi metaliko batean kokatu zen (ontziaren pisua hutsik dagoenean: 0,300 g) eta labe batean lehortu zen 105 °C-tara 24 ordutan. Lehortu ondoren, ontziaren pisua = 0,350 g. Zein zen kulturaren pisu lehorra, g/ml-tan adierazia?

Populazio naturalen biomasa kalkulatzeko beste metodo bat erabiltzen da, korapilatsuagoa dena. Metodoa biobolumena zehaztean datza, horretarako mikroskopioa (epifluoreszentziazkoa edo optikoa) erabiltzen da. Mikroorganismoen luzaera, zabalera edo diametroa zehazten dira. Gero, mikroorganismoak maiz irudi geometrikoen antzekoak direnez, formula egokiena erabiltzen da datu hauekin biobolumena kalkulatzeko.

Biobolumena kalkulatu ondoren, hurrengo ekuazioa erabiliko dugu:

$$\text{Biomasa } (\mu\text{g K/ml}) = N * Bb * F$$

N, mikroorganismo/ml

Bb, biobolumena ( $\mu\text{m}^3$ /mikroorganismo)

F, konbertsio-faktorea ( $\mu\text{g}$  karbono/ $\mu\text{m}^3$ )

Bibliografian konbertsio-faktore (F) ezberdinak aurki ditzakegu, kultura puruekin edo lagin naturalekin erabiltzeko.

3.2. Bakterioak zituen lagin bat akridina-laranjarekin tindatu zen eta prestatu zen epifluoreszentzia mikroskopioan ikusteko. Irudien analisi-sistema baten bidez, 10 zelula neurtu ziren, haien luzaera eta zabalera zehazteko. Hauek dira lortutako emaitzak:

Zelula	Z: Zabalera (μm)	L: Luzaera (μm)
1	0,51	1,0234
2	0,50	1,0342
3	0,51	1,1091
4	0,50	1,0921
5	0,49	1,0456
6	0,49	1,1001
7	0,50	1,1000
8	0,50	1,0761
9	0,51	1,0345
10	0,49	1,0555

Mikrobio-dentsitatea =  $4,8 \cdot 10^7$  bakterio/ml; konbertsio-faktorea =  $164 \text{ fg K}/\mu\text{m}^3$

Zein da kulturaren biomasa?

Baziloen biobolumena kalkulatzeko erabili hurrengo ekuazioa:

$$Bb = \frac{\pi}{4} Z^2 \left( L - \frac{1}{3} Z \right)$$

3.3. Suposa dezagun enpresa baten laborategian lan egiten duzula, kultura abiarazle (inokuluak) prestatzen dituen. Bi andui berri (*Lactobacillus acidophilus* eta *Lactobacillus fermentum*) jaso dituzu eta egiaztatu nahi duzu haien gaitasuna mikrobio-dentsitate eta biomasa handia sortzeko. Laborategian, 2 bakterio baldintza optimoetan hazten dira, bakoitza bere aldetik. Fase egonkorrean (24 ordu) laginak hartzen dira epifluoreszentzia mikroskopioan zenbatzeko eta neurtzeko. Hauek dira lortutako emaitzak:

<i>Lactobacillus</i>	Bakterio/eremu	Iragazitako bolumena (ml)	Dil.	Mikroskopio-faktorea (eremu/iragazki)
<i>L. acidophilus</i>	25/32/30/28/33/34/35/29/28/24 15/32/33/18/20/22/18/23/19/26	0,5	$10^{-2}$	14.520
<i>L. fermentum</i>	5/12/13/8/13/8/15/9/8/14 15/12/13/8/10/7/8/9/9/6	1	$10^{-3}$	7.220

Zein mikroorganismo dauka dentsitate handiena fase egonkorrean?

- 200 zelula neurtu ondoren, hauek dira batezbesteko emaitzak:

<i>Lactobacillus</i>	Luzaera ( $\mu\text{m}$ )	Zabalera ( $\mu\text{m}$ )	Konbertsio-faktorea ( $\text{mg K}/\mu\text{m}^3$ )
<i>L. acidophilus</i>	1,7	0,6	170 $10^{-10}$
<i>L. fermentum</i>	2	0,4	

Erabili hurrengo ekuazioa biobolumena kalkulatzeko:  $(L - Z/3) \pi Z^2/4$

Zein mikroorganismok dauka biomasa handiena fase egonkorrean?

3.4. Azterketa bat egin zen itsasoan, horretarako laginak hartu ziren 3 sakonera ezberdinetan (5, 25 eta 50 m) eta bakterioen dentsitatea (UKE/ml) eta biomasa kalkulatu zen. Unitate kolonia-eratzailak zenbatzeko, diluzio hamartarrak egin ondoren, itsas-agarra duten 3 plaka erein ziren 100  $\mu\text{l}$ -ekin. Hurrengo taulan agertzen dira lortutako emaitzak:

Diluzioa	Sakonera (m)		
	5	25	50
$10^{-2}$	Kontaezinak	500/617/593	363/303/395
$10^{-3}$	357/452/403	53/67/60	35/30/40
$10^{-4}$	35/45/40	5/7/6	4/2/5

Biomasa kuantifikatzeko, laginak akridina-laranjaz tindatu ziren eta epifluoreszentziako mikroskopiaorekin, 10 eremutan zeuden bakterioak zenbatu ziren. Aldi berean, bakterioen biobolumena neurtu zen irudien analisi-sistema baten bidez. Hurrengo taulan agertzen dira lortutako emaitzak:

Sakonera (m)	Dil.	Iragazitako bolumena ( $\mu\text{l}$ )	Zenbaketak (Bakterio/eremu)	Biobolumena ( $\mu\text{m}^3/\text{zelula}$ )
5	$10^{-1}$	100	30/35/40/25/30/25/33/25/27/30	0,15
25	$10^{-1}$	200	31/25/40/37/20/15/32/26/25/31	0,45
50	$10^0$	100	31/33/37/43/23/34/21/19/26/30	0,47

Mikroskopiaoren faktorea: 30.954 eremu/iragazki

Konbertsio-faktorea (biomasa kalkulatzeko):  $2,2 \cdot 10^{-7} \mu\text{g K}/\mu\text{m}^3$

- Zein da dentsitate (UKE/ml) handiena duen sakonera?
- Zein da biomasa handiena duen sakonera?

3.5. Jogurta egiteko, kultura mistoa prestatzen da inokulu bezala. Kulturaren biomasa 3 mg K/ml-koa da, biomasaren %60 *Lactococcus thermophilus* da eta %40 *Lactobacillus bulgaricus*.

- *Lactococcus*-en batezbesteko diametroa 1,2  $\mu\text{m}$ -koa da. *Lactobacillus*-en luzaera eta zabalera 1,8 eta 0,5  $\mu\text{m}$ -koa dira, hurrenez hurren.
- Biobolumena kalkulatzeko ekuazioak hauek dira:  $Bb = \pi D^3/6$  (kokoen kasuan) eta  $Bb = (L - Z/3) \pi Z^2/4$  (baziloen kasuan)
- Konbertsio-faktorea (F):  $170 \cdot 10^{-10}$  mg K/ml

Datu hauek guztiak kontuan hartuta, zein izango da *Lactococcus* eta *Lactobacillus*-en dentsitatea prestatu dugun kultura mistoan?

## PROBLEMAK EBAZTEKO PROPOSAMENAK

3.1. *Saccharomyces cerevisiae* duen kulturaren pisu lehorra (g/ml)?

10 ml esekidura/3 ml diluitzaile = 3,33 = Kontzentrazio-faktorea  
 0,350 - 0,300 = 0,050 g

$$\frac{0,050 \text{ g}}{3,33 \text{ ml}} = \boxed{0,015 \text{ g/ml}}$$

3.2. Kulturaren biomasa?

Zelula	Z: zablara (μm)	L: luzaera (μm)	Biobolumena (μm <sup>3</sup> )
1	0,51	1,0234	0,1743
2	0,50	1,0342	0,1703
3	0,51	1,1091	0,1918
4	0,50	1,0921	0,1817
5	0,49	1,0456	0,1664
6	0,49	1,1001	0,1767
7	0,50	1,1000	0,1833
8	0,50	1,0761	0,1786
9	0,51	1,0345	0,1766
10	0,49	1,0555	0,1682
<b>Batezbesteko biobolumena (μm<sup>3</sup>/bakterio)</b>			<b>0,1767</b>

$$\text{Biomasa } (\mu\text{g K/ml}) = N * Bb * F$$

$$\text{Biomasa } (\mu\text{g K/ml}) = 4,8 \cdot 10^7 \text{ bakterio/ml} * 0,1717 \mu\text{m}^3/\text{bakterio} * 164 \text{ fg K}/\mu\text{m}^3 =$$

$$\boxed{1,3916 \cdot 10^9 \text{ fg K/ml}}$$

3.3. Dentsitate handiena? **Antzekoak**

<i>Lactobacillus</i>	Bakterio/eremu	Iragazitako bolumena (ml)	Dil.	Mikroskopio-faktorea (eremu/iragazki)	Dentsitatea (bakterio/ml)
<i>L. acidophilus</i>	25/32/30/28/33 34/35/29/28/24 15/32/33/18/20 22/18/23/19/26	0,5	10 <sup>-2</sup>	14.520	<b>7,61 10<sup>7</sup></b>
<i>L. fermentum</i>	5/12/13/8/13 8/15/9/8/14 15/12/13/8/10 7/8/9/9/6	1	10 <sup>-3</sup>	7.220	<b>7,29 10<sup>7</sup></b>

Biomasa handiena? ***L. acidophilus***

<i>Lactobacillus</i>	Luzaera (μm)	Zabalera (μm)	Konbertsio-faktorea (mg K/μm <sup>3</sup> )	Biomasa (mg K/ml)
<i>L. acidophilus</i>	1,7	0,6	170 10 <sup>-10</sup>	<b>0,549</b>
<i>L. fermentum</i>	2	0,4		<b>0,291</b>

3.4. Dentsitatea sakoneraren arabera? Inokulatutako bolumen/plaka = 100 µl. Dentsitate handiena?

Diluzioa	Sakonera (m)		
	5	25	50
10 <sup>-2</sup>	Kontaezina	500/617/593	363/303/395
10 <sup>-3</sup>	357/452/403	53/67/60	35/30/40
10 <sup>-4</sup>	35/45/40	5/7/6	4/2/5
<b>UKE/ml</b>	<b>4 10<sup>6</sup></b>	<b>6 10<sup>5</sup></b>	<b>3,5 10<sup>5</sup></b>

Biomasa sakoneraren arabera? Mikroskopiaoren faktorea: 30.954 eremu/iragazki.

Konbertsio-faktorea: 2,2 10<sup>-7</sup> µg K/µm<sup>3</sup>.

Sakonera (m)	Dil.	Iragazitako bolumena (µl)	Zenbaketak (Bakterio/eremu)	Bakterio/ml	Biobolumena (µm <sup>3</sup> /zelula)	Biomasa (µg K/ml)
5	10 <sup>-1</sup>	100	30/35/40/25/30/ 25/33/25/27/30	<b>9,29 10<sup>7</sup></b>	0,15	<b>3,06</b>
25	10 <sup>-1</sup>	200	31/25/40/37/20/ 15/32/26/25/31	<b>4,36 10<sup>7</sup></b>	0,45	<b>4,32</b>
50	10 <sup>0</sup>	100	31/33/37/43/23/ 34/21/19/26/30	<b>9,20 10<sup>6</sup></b>	0,47	<b>0,95</b>

3.5. *Lactococcus thermophilus* eta *Lactobacillus bulgaricus*-en dentsitatea kultura mistoan?

Kulturaren biomasa = 3 mg K/ml. Konbertsio-faktorea = 170 10<sup>-10</sup> mg K/ml.

Mikroorganismoa	%	Biomasa (µg K/ml)	Neurriak (µm)	Formula	Biobolumen (µm <sup>3</sup> /zelula)	Dentsitatea (bakterio/ml)
<i>Lactococcus thermophilus</i>	60	<b>1,8</b>	D = 1,2	$\pi D^3/6$	0,9048	<b>1,17 10<sup>8</sup></b>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	40	<b>1,2</b>	L = 1,8 Z = 0,5	$(L - Z/3) \pi Z^2/4$	0,3207	<b>2,20 10<sup>8</sup></b>