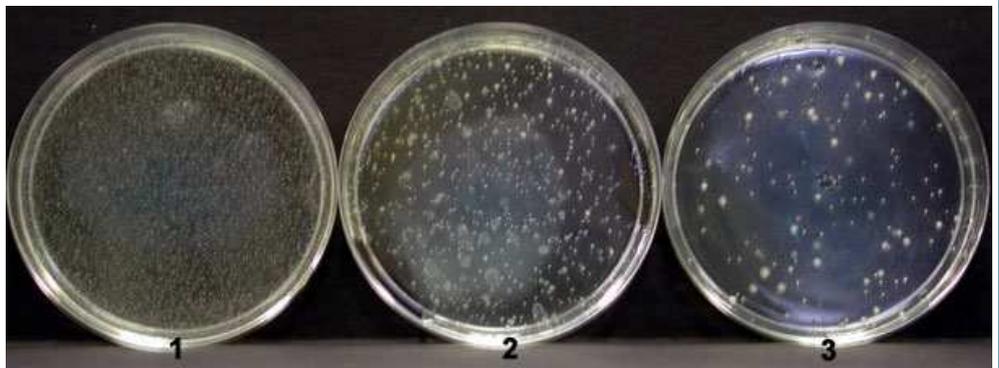


COMO ABORDAR Y RESOLVER ASPECTOS PRÁCTICOS DE MICROBIOLOGÍA

3. CÁLCULOS DE BIOMASA



Inés Arana, Maite Orruño e Isabel Barcina

Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

3. CÁLCULO DE BIOMASA

Cuando usamos el término biomasa nos referimos a la cantidad de masa de material vivo y se expresa como gramos o calorías (julios) por ml o g de muestra. Mide la cantidad de energía que se almacena en un segmento determinado de una comunidad biológica. Para cuantificar la biomasa de una población/comunidad microbiana disponemos de diferentes métodos. Alguno de estos métodos es muy sencillo y no requiere manipulaciones complejas; otros métodos son más complejos, siendo necesarias medidas indirectas. Veremos algunos casos sencillos.

Uno método directo y sencillo de cuantificación de la biomasa de una población es la estimación del peso seco por g ó ml de muestra. Se requieren una balanza (precisión g x 0,001), un cestillo para colocar la muestra que puede elaborarse con papel de aluminio y una mufla para secar la muestra.

Este método es válido, y muy utilizado, con cultivos puros (de levaduras, etc.); pero su utilización con muestras naturales (sedimentos, muestras de agua de mar, etc.) es problemática.

Nuevamente, se deben **proponer soluciones** para los problemas siguientes:

3.1. Para determinar el peso seco de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, 10 ml de una suspensión de levadura se centrifugaron a 5.000 g. Tras retirar el sobrenadante, se añadieron 3 ml de solución salina estéril y se agitó hasta homogeneizar. 1 ml de esta nueva suspensión se colocaron en un cestillo metálico (peso del cestillo vacío; 0,300 g) y se secaron en estufa a 105°C durante 24 h. Tras ese periodo de secado, el peso del cestillo fue de 0,350 g. ¿Cuál es el peso seco, expresado como g/ml, del cultivo?

Otro método de determinación de biomasa, válido para poblaciones naturales pero más complejo y laborioso, es la determinación de la biomasa a través del biovolumen. En este método, en preparaciones para microscopia fotónica, de epifluorescencia, etc. Se determina la longitud, anchura o diámetro de un número determinado de microorganismos de esa muestra. Los microorganismos de la muestra se asimilan a figuras geométricas más o menos complejas y se calcula el biovolumen de cada uno de ellos.

Aplicaremos la siguiente ecuación:

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

Siendo: N, el número de microorganismos enumerados por ml de muestra,
 Bv, el biovolumen expresado como μm^3 por microorganismo,
 F, factor de conversión, μg de Carbono por μm^3 .

En la bibliografía se encuentran diferentes valores de F calculados tanto para cultivos puros como para muestras naturales, fundamentalmente de sistemas acuáticos.

3.2. Una muestra bacteriana se tiñó con naranja de acridina y se preparó para microscopia de epifluorescencia. Mediante un sistema de análisis de imagen se procedió a medir la longitud y anchura de 10 células, obteniéndose los siguientes resultados:

Célula	A: Anchura (μm)	L: Longitud (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

Sabiendo que la densidad del cultivo es $4,8 \cdot 10^7$ bacterias/ml y el factor de conversión a carbono es $164 \text{ fg C}/\mu\text{m}^3$, ¿cuál es biomasa de este cultivo?

Se recomienda emplear la siguiente ecuación para el cálculo del biovolumen en bacterias bacilares:

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

Siendo: A, anchura,
 L, longitud.

3.3. Suponga que trabaja en el laboratorio de una empresa de producción de cultivos iniciadores (inóculos) para varias empresas de productos lácteos. Dispone de dos nuevas cepas (*Lactobacillus adidophilus* y *Lactobacillus fermentum*) en las que se está comprobando la capacidad de producir elevadas densidades celulares y biomasa.

En su laboratorio, hacen crecer los dos *Lactobacillus*, por separado y en condiciones óptimas. Al llegar a la fase estacionaria de crecimiento (24 h) se recogen muestras y,

- Los resultados obtenidos utilizando microscopia de epifluorescencia son los siguientes:

<i>Lactobacillus</i>	Bacterias/campo	Vol. Filtrado (ml)	Dil.	Factor microscopio (campos/filtro)
<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

¿Cuál de los dos microorganismos alcanza una mayor densidad celular en la fase estacionaria de crecimiento?

- Se miden 200 células. Resultados obtenidos:

<i>Lactobacillus</i>	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Factor de conversión (mg C/µm ³)
<i>L. acidophilus</i>	1,7	0,6	170 10 ⁻¹⁰
<i>L. fermentum</i>	2	0,4	

Si la fórmula del biovolumen es $(L - A/3) \pi A^2/4$ ¿Cuál de los dos microorganismos alcanza una mayor biomasa en la fase estacionaria de crecimiento?

3.4. Se lleva a cabo un estudio de densidad de unidades formadoras de colonia (UFC) en agar nutritivo y biomasa bacteriana en un sistema acuático a 3 profundidades diferentes (5, 25 y 50 m). Para ello se utilizan las técnicas de recuento en placa y recuento directo mediante microscopía.

Para el recuento de UFC. se sembraron 3 réplicas de 100 µl de diferentes diluciones de la muestra en Agar Marino. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Dilución	Profundidad (m)		
	5	25	50
10 ⁻²	Incontables	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

Para la determinación de la biomasa se llevaron a cabo recuentos directos mediante microscopía de epifluorescencia previa tinción de las bacterias con naranja de acridina. Asimismo, se midió el biovolumen bacteriano mediante análisis de imagen de las preparaciones de estas muestras. Los resultados se presentan en la siguiente tabla en la cual se indican las diluciones de la muestra empleadas y el volumen filtrado por 0,2 µm en cada caso. El número de campos observados fueron 10 por muestra:

Profundidad (m)	Dil.	Volumen Filtrado (µl)	Recuentos (Bacterias/campo)	Biovolumen (µm ³ /célula)
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

El factor de conversión del microscopio utilizado fue: 30.954 campos/filtro, y el factor de conversión del volumen en biomasa fue: $2,2 \cdot 10^{-7} \mu\text{gC}/\mu\text{m}^3$.

- ¿A qué profundidad se observa mayor densidad de UFC? ¿Cuál es la densidad de UFC a esta profundidad?
- ¿A qué profundidad se observa la mayor biomasa bacteriana? ¿Cuales son los valores máximos de biomasa bacteriana?

3.5. Como inóculo para la elaboración de yogur, se prepara un cultivo mixto compuesto por un 60% de *Lactococcus thermophilus* y un 40% de *Lactobacillus bulgaricus* (porcentajes respecto a biomasa). La biomasa del cultivo es de 3 mg C/ml. Sabiendo que:

- el diámetro (D) medio de *Lactococcus* es 1,2 μm ; y la longitud (L) y anchura (A) medias de *Lactobacillus* son 1,8 y 0,5 μm , respectivamente;
- la ecuación del biovolumen en el caso de los cocos es $Bv = \pi D^3/6$; y en el caso de los bacilos, $Bv = (L - A/3) \pi A^2/4$;
- el factor de conversión de biovolumen en carbono (F) es $170 \cdot 10^{-10} \text{ mg C/ml}$;

¿Cuál será la densidad de las poblaciones de *Lactococcus* y de *Lactobacillus* en el cultivo mixto que hemos preparado?

PROPUESTAS DE RESOLUCIÓN

3.1. ¿Peso seco (g/ml) de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*?

10 ml suspensión/ 3 ml diluyente = 3,33 = Factor de concentración

0,350 - 0,300 = 0,050 g

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

3.2. ¿Biomasa de un cultivo?

Célula	A: Anchura (µm)	L: Longitud (µm)	Biovolumen (µm ³)
1	0,51	1,0234	0,1743
2	0,50	1,0342	0,1903
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
Biovolumen medio (µm³/bacteria)			0,1717

$$\text{Biomasa (µg C/ml)} = N * Bv * F$$

$$\text{Biomasa (µg C/ml)} = 4,8 \cdot 10^7 \text{ bacterias/ml} * 0,1717 \text{ µm}^3/\text{bacteria} * 164 \text{ fg C/µm}^3 =$$

$$\boxed{1,3516 \text{ µm}^3/\text{ml}}$$

3.3. ¿Mayor densidad? **Similares**

<i>Lactobacillus</i>	Bacterias/campo	Vol. Filtrado (ml)	Dil.	Factor microscopio (campos/filtro)	Densidad (bacterias/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 ⁻²	14.520	7,61 10⁷
<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	7,29 10⁷

¿Mayor biomasa? **L. acidophilus**

<i>Lactobacillus</i>	Longitud (µm)	Anchura (µm)	Factor de conversión (mg C/µm ³)	Biomasa (mg C/ml)
<i>L. acidophilus</i>	1,7	0,6	170 10 ⁻¹⁰	0,549
<i>L. fermentum</i>	2	0,4		0,291

3.4. ¿Densidad en las diferentes profundidades? Volumen sembrado/placa = 100 µl. ¿Mayor densidad?

Dilución	Profundidad (m)		
	5	25	50
10 ⁻²	Incontables	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
UFC/ml	4 10⁶	6 10⁵	5,5 10⁵

¿Biomasa en las diferentes profundidades? Factor del microscopio: 30.954 campos/filtro. Factor de conversión dl volumen en biomasa: 2,2 10⁻⁷ µgC/µm³.

Profundidad (m)	Dil.	Volumen Filtrado (µl)	Recuentos (Bacterias/campo)	Bacterias/ml	Biovolumen (µm ³ /célula)	Biomasa (µg C/ml)
5	10 ⁻¹	100	30/35/40/25/30/ 25/33/25/27/30	9,29 10⁷	0,15	3,06
25	10 ⁻¹	200	31/25/40/37/20/ 15/32/26/25/31	4,36 10⁷	0,45	4,32
50	10 ⁰	100	31/33/37/43/23/ 34/21/19/26/30	9,20 10⁶	0,47	0,95

3.5. ¿Densidad de *Lactococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en el cultivo mixto preparado?

Biomasa del cultivo = 3 mg C/ml. Factor de conversión = 170 10⁻¹⁰ mg C/ml.

Microorganismo	%	Biomasa (µg C/ml)	Medidas (µm)	Formula	Biovolumen (µm ³ /célula)	Densidad (bacterias/ml)
<i>Lactococcus thermophilus</i>	60	1,8	D = 1,2	$\pi D^3/6$	0,9048	1,17 10⁸
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	40	1,2	L = 1,8 A = 0,5	$(L - A/3) \pi A^2/4$	0,3207	2,20 10⁸