

TP N°4 - Turbidimetría y conteo celular

Integrantes Grupo N° 2 :

Facundo Casela, Romina Torre, Camila Teira, Andres Soto y Romina Freyre

Comisión 2

Objetivo:

Determinar la biomasa de una suspensión celular de levaduras para panificación por cuatro métodos distintos: determinación de peso húmedo, determinación por peso seco, turbidimetría y conteo de células.

Introducción:

Biomasa es un término general que se refiere a los microorganismos presentes en un sistema.

La determinación de la biomasa es una de las variables más importantes de un bioproceso ya que su determinación nos lleva a la comprensión de la eficiencia del mismo. Se trata de una variable clave para establecer las tasas de producción, de consumo de nutrientes y el cálculo de los balances de masa de cualquier proceso biológico. Los métodos clásicos de determinación de biomasa son métodos directos que se basan en el número de células o en el peso celular.

Metodos para medir biomasa:

- Determinación por peso húmedo: Se obtiene a partir de una muestra en suspensión que es pesada luego de la separación de las células por filtración o centrifugación. Es una técnica útil para grandes volúmenes de muestra. La principal desventaja es que el diluyente queda atrapado en el espacio intercelular y contribuye al peso total de la masa. La cantidad de líquido retenida puede ser importante. Para corregir el peso húmedo se utilizan soluciones de polímeros no iónicos (como el Dextran) que pueden ingresar en el espacio intercelular pero no pueden atravesar las paredes bacterianas.
- Determinación por peso seco: La cantidad de biomasa presente en una muestra puede medirse en términos de peso seco por unidad de volumen, ya sea como sólidos en suspensión totales o sólidos en suspensión volátiles. Las células se separan del líquido por centrifugación o por filtración y se someten al secado. Se expresa en mg ms/mL (mg de masa seca o bien g o g). La principal desventaja de los métodos de peso es que su determinación incluye no solo microorganismos sino también material inerte, polímeros extracelulares y materia orgánica absorbida. Además, no puede aplicarse cuando los sustratos a degradar son insolubles. Los métodos gravimétricos, como se ha mencionado, son tediosos.
- Turbidimetría: La turbidez es una manifestación de la propiedad óptica que origina que la luz se disperse y absorba en vez de transmitirse en línea recta a través de la muestra. El método de medida suele ser el nefelométrico, es decir medición a 90° de la luz dispersada, aunque en este caso por mayor disponibilidad y más generalizado se emplea un método turbidimétrico, utilizando un espectrofotómetro visible-UV. Se parte de la hipótesis de que cuanto mayor es la dispersión de la luz, mayor es el contenido en sólidos suspendidos y en consecuencia mayor turbidez de la muestra. En el laboratorio se realizan estas mediciones frente a estándares de referencia primarios de turbidez. Las unidades basadas en soluciones primarias como la formazina son comúnmente usadas en la actualidad y son la base de las Unidades de Turbidez Formazina (FTU por sus siglas en inglés) de la Agencia de Protección Ambiental estadounidense EPA. FTU es una medición que no especifica el ángulo y puede realizarse en cualquier ángulo de detección. Las Unidades de Turbidez Nefelométricas (NTU por sus siglas en inglés) específicamente detallan una técnica de medición a 90° y también están basadas en formazina.
- Conteo de células: Con el uso de una cámara de recuento es posible contar el número de células en un volumen determinado, determinando así la concentración celular en una suspensión. Las cámaras de recuento sirven para cuantificar el número de partículas por unidad de volumen en un líquido, a través de su conteo visual bajo un microscopio. El tipo de cámara más utilizado para el recuento directo de células, es la cámara de Neubauer (o hemocitómetro) esta es una pieza de cristal grueso con el tamaño de un portaobjetos, en donde se coloca un pequeño volumen de la suspensión a analizar.

Materiales y métodos:

1.1 Determinación del peso húmedo:

- Se rotularon dos tubos de ensayo (T1 y T2) y se pesaron en balanza analítica registrando su peso.
- Se tomaron muestras de 5 ml de una suspensión y se colocaron en cada uno de los tubos.
- Luego los tubos son llevados a la centrífuga por 10 minutos a 300 rpm.
- Se descartó el sobrenadante y se los dejó escurrir boca abajo sobre un papel absorbente.
- Se pesaron nuevamente los tubos en balanza analítica y se registró sus pesos.

1.2 Determinación del peso seco:

- Se eligió uno de los tubos anteriores y se lo llevó a estufa durante toda la noche a 50°C
- Se pesó nuevamente.

1.3 Turbidimetría.

Para la medición de la turbidez se empleó un turbidímetro portátil (a pesar de que éste método no es el mejor, ya que se debería obtener el volumen final utilizando matraces). Para ello previamente se prepararon las siguientes diluciones:

$$\frac{1}{1} = 10 \text{ mL suspensión madre.}$$

$$\frac{1}{2} = 5 \text{ mL suspensión madre} + 5 \text{ mL agua destilada}$$

$$\frac{1}{5} = 2 \text{ mL suspensión madre} + 8 \text{ mL agua destilada}$$

$$\frac{1}{10} = 1 \text{ mL suspensión madre} + 9 \text{ mL agua destilada}$$

$$\frac{1}{20} = 0.5 \text{ mL suspensión madre} + 9.5 \text{ mL agua destilada}$$

$$\frac{1}{50} = 0.2 \text{ mL suspensión madre} + 9.8 \text{ mL agua destilada}$$

- Luego se calibró el equipo con suspensiones comerciales de formazina .
- Se realizó la lectura de las muestras.

1.4 Conteo celular

- Se tomó una alícuota de 10 ul de la suspensión 1/50.
- Se llenó una de las cámaras de Neubauer.
- Se procedió a colocar la cámara en el microscopio.
- Y se realizó el conteo en el sector de cuadrados 4x4.

Resultados y análisis:

2.1 Peso húmedo y peso seco:

Tubo	Peso tubo vacío	Peso tubo con muestra
1	8.9579	9.0285
2	9.1402	9.228

$$\text{Peso húmedo} = \frac{(\text{Peso inicial del tubo} + \text{muestra húmeda}) - (\text{Peso inicial del tubo vacío})}{\text{volumen de la muestra}}$$

$$\text{Peso húmedo (T1)} = \frac{(9.0285 \text{ g}) - (8.9579 \text{ g})}{5 \text{ ml}}$$

$$\text{Peso húmedo (T1)} = 0.01412 \text{ g/ml}$$

$$\text{Peso húmedo (T2)} = \frac{(9.228 \text{ g}) - (9.1405 \text{ g})}{5 \text{ ml}}$$

$$\text{Peso húmedo (T2)} = 0.0175 \text{ g/ml}$$

$$\text{Promedio} = \frac{(0.01412 \text{ g/ml}) + (0.0175 \text{ g/ml})}{2} = 0.0158 \text{ g/ml}$$

$$\text{Peso seco} = \frac{(\text{Peso inicial del tubo} + \text{muestra seca}) - (\text{Peso inicial del tubo vacío})}{\text{volumen de la muestra}}$$

$$\text{Peso seco} = \frac{(8.9599 \text{ g}) - (8.9399 \text{ g})}{5 \text{ ml}} = 0.0204 \text{ g/ml}$$

$$\text{Peso húmedo (comisión)} = \frac{0.016675 \text{ g/ml}}{8} = 0.01334375$$

$$\text{Peso seco (comisión)} = \frac{0.05754 \text{ g/ml}}{8} = 0.0071925$$

	Grupo 2	Comisión 2
Peso húmedo (g/ml)	(0.0158 ± 0,0024)	(0,01334375 ± 0,00317115)
Peso seco (g/ml)	(0.0204 ± 0,0002)	(0,0071925 ± 0,0081438)

Los valores observados en este cuadro indican que el valor del peso seco es mayor que el valor del peso húmedo, lo cual no coincide con lo esperado. Uno espera que el peso húmedo debería ser un valor mayor al del peso seco ya que éste último no contiene moléculas de agua que intervengan en el pesaje del analito.

2.2 Medidas turbidimétricas de la muestra madre de levaduras

Diluciones de M medidas	NTU de la dilución	NTU de la muestra "M"
1/1	472	472

1/2	112	224
1/5	40	200
1/10	21.7	217
1/20	11.6	290
1/50	5.54	277

Se aprecia en el cuadro de las medidas turbidimétricas de la muestra madre de levaduras que hay un cambio brusco en los NTU de la muestra madre en relación a la dilución 1/1 con la dilución 1/2. Podemos suponer que esto se debe a una deficiente homogeneización de la muestra o una dilución errónea.

2.3 Conteo celular con la cámara de Neubauer

Para proceder al cálculo correspondiente se tuvo en cuenta el valor total obtenido en el conteo de los 4 cuadros 4x4

1	2	3	4	Total
41	54	46	39	180

[Cant de levaduras/mL= nro de células contadas x 10000 x 50]

Cant de levaduras/mL= (180 / 4) x 10000 x 50

Conteo celular en la muestra M	
Cantidad de Levaduras/mL	22.5x10 ⁶ Levaduras/mL

Debido a la falta de práctica fue difícil encontrar los cuadrantes en la cámara de Neubauer. Luego de realizar un correcto enfoque se logró contar los cuatro cuadrantes sin menor dificultad.

Conclusiones:

Como analizamos anteriormente, comparamos los resultados de peso húmedo de nuestro grupo con el valor de peso seco que nos otorgaron y la comparación no es lo que esperábamos. El peso seco que nos dieron era un valor mucho más alto que el peso húmedo que obtuvimos, cuando esperábamos que ocurra todo lo contrario. Por lo que podemos afirmar que el objetivo de determinación de peso húmedo y peso seco no se cumplió, ya que una de estas dos determinaciones es errónea. Lo que pudo haber ocurrido es que el otro grupo haya utilizado una suspensión con mayor densidad de levaduras, lo que resultó en que el peso seco termine siendo más pesado que el peso húmedo. Tampoco se puede descartar un error de medición por parte de cualquier grupo.

El método de conteo mediante el uso de la cámara de Neubauer, a pesar de ser exacto, nosotros trabajamos sin realizar una tinción. Lo que conlleva a que no se pudo diferenciar la viabilidad de las células, en otras palabras, diferenciar las células vivas de las muertas. En último lugar mediante el uso de un turbidímetro portátil, se pudo calcular las NTU, los resultados son relativamente correctos, siempre dependiendo de la correcta calibración del equipo. Sin embargo, lo más llamativo fue el valor obtenido entre la muestra 1/1 y la dilución 1/2 , ya que hay una enorme diferencia entre estos dos valores. Como se supuso en el análisis, puede ser por una deficiente dilución o por una mala homogeneización de la suspensión.