NMNPAX ISSN 0372-4557

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

NOTAS DEL MUSEO DE LA PLATA

TOMO XXI Botánica, Nº 106

COMPARACION DE TRES METODOS PARA LA ESTIMACION DE BIOMASA ALGAL EN BIOENSAYOS

SILVIA E. SALA

LA PLATA
REPUBLICA ARGENTINA
1995

NOTAS DEL MUSEO DE LA PLATA

Publicación aperiódica de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Consultas editoriales: Junta Editora

Ventas: Publicaciones

Dirección: Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Paseo del Bosque s/n
1900 La Plata, Buenos Aires
Argentina

©Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. 1995

Paginación electrónica e impresión: Jane Avril comunicación editorial.
65 nº 444, tel. 32155, La Plata

NMNPAX ISSN 0372-4557

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

NOTAS DEL MUSEO DE LA PLATA

TOMO XXI Botánica, Nº 106

COMPARACION DE TRES METODOS PARA LA ESTIMACION DE BIOMASA ALGAL EN BIOENSAYOS*

SILVIA E. SALA**

RESUMEN

Se compararon tres métodos de estimación de biomasa algal en cultivos de ***Scenedesmus acutus*** Meyen. La eficiencia global del conteo directo en microscopio invertido, estimación de clorofila ***a*** por espectrofotometría y densidad celular por turbidimetría, se evaluó mediante el cálculo de exactitud, sensibilidad, límite de detección, volumen de muestra y tiempo de análisis de cada método.

Si bien los resultados obtenidos por los tres métodos estuvieron altamente correlacionados, y el conteo directo presentó un límite de detección más bajo, la turbidimetría resultó más eficiente por presentar la mayor precisión y rapidez, y requerir menores volumenes de muestra.

* *Este trabajo fue subsidiado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC)*

** *Becario de Perfeccionamiento (CIC). División Ficología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo.*
UNLP, Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata

ABSTRACT

Three methods for estimating algal biomas were compared, using ***Scenedesmus acutus*** Meyen as the test organism. The efficiency of direct counts of cells making use of an inverted microcope, extracted chlorophyla ***a*** concentration by spectrophotometry and "in vivo" attenuance of light trasmition in a spectrophotometer, was evaluated taking into account precisíon, sensitivity, limit of detection plus time taken and sample quantity required.

Although results obtained by the three methods were highly correlated and direct counting allowed lower limit of detection, "in vivo" attenuance was more efficient because it had the highest precision, was the most rapid and required the smallest sample quantities.

INTRODUCCION

La estimación de la biomasa algal es de suma importancia en los estudios de fitoplancton tanto en la naturaleza como en el laboratorio. Existen numerosos métodos cuantitativos tales como conteo directo, determinaciones químicas y métodos ópticos, cada uno de los cuales ha sido exhaustivamente estudiado. Sin embargo los trabajos de comparación entre métodos son escasos, sobre todo cuando se trata de estudios de crecimiento de especies algales en cultivo.

Cuando se realizan bioensayos debe analizarse simultáneamente un número elevado de muestras, por lo tanto al elegir el método de control es necesario tener en cuenta no sólo la exactitud, precisión y límite de detección del mismo sino también el tamaño de muestra y tiempo requeridos.

El objeto del presente trabajo fue evaluar la eficiencia global del conteo directo, análisis de clorofila ***a*** por espectrofotometría y turbidimetría como métodos alternativos de control de bioensayos.

MATERIALES Y METODOS

Las pruebas se realizaron con ***Scenedesmus acutus*** Meyen, cultivado en medio Detmer modificado (Acconrinti, 1960), a temperatura ambiente y luz contínua (1400 lux). Se analizaron cultivos de 16 densidades diferentes, desde 25.000 hasta 1.600.000 células/ml, con tres repeticiones, estimando la biomasa de cada muestra por los siguientes métodos:

a - Conteo directo en microscópio invertido: el volúmen de muestra en todos los casos fue 2 ml. De acuerdo a la concentración celular de los cultivos, se contó un número variable de campos al azar. Los resultados se expresan en número de células/ml.

b - Clorofila ***a*** por espectrofotometría: se filtraron 50 ml de muestra a través de filtos Whatmann G.F.C.. La extracción del pigmento se realizó con metanol en caliente, siguiente la técnica de Goltermann *et al.* (1978), y el tiempo y la temperatura de extracción según Sartory y Grobbelar (1984). Para la elección del solvente se realizaron pruebas con metanol en caliente y frío y acetona, obteniendo mejores resultados con el primero para ***Scenedesmus acutus***. Las lecturas de absorbancia se realilzaron en un expectrofotómetro Metrolab R.C. 250 a 665 y 750 nm, utilizando cubetas de 1 y 5 cm de paso de luz según la concentración de la muestra. Los cálculos finales se realizaron siguiendo a Golterman *et al.* (1978). Los resultados se expresan en mg de clorofila ***a*** total/l.

c - Turbidimetría: el volumen de muestra utilizado fue de 5 ml. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Metrolab R.C. 250 a 700 nm, utilizando cubetas de 1 cm de paso de luz y medio de cultivo como blanco.

La comparación de los tres métodos se realizó mediante:

1 - El cálculo de la correlación existente entre los

resultados obtenidos por conteo directo (cél./ml) y turbidimetría (Absorvancia) y clorofila *a* (mg/ml) respectivamente, obteniendo las rectas de regresión entre ambos pares de parámetros.

2 - El análisis de la varianza, estudiando cada método por separado y delimitando tres niveles, de acuerdo a la concentración celular de la muestra: baja (25.000 - 400.000 cél/ml), media (500.000 - 800.000), alta (600.000 - 1.600.000). Se calcularon las diferencias mínimas significativas según el test de Tuckey y los coeficientes de variación para cada uno de ellos.

La precisión y sensibilidad de los métodos se calculó siguiendo el criterio de Sutcliffe (1979) en Butterwick *et al.* (1982), entendiendo por sensibilidad el incremento de respuesta de cada método al aumentar en 10.000 cél/ml el orden de la concentración celular, este valor corresponde a la pendiente de la recta de regresión y por precisión el coeficiente de variación entre repeticiones (calculado para concentraciones bajas, medias y altas en los análisis de la varianza).

El límite de detección del conteo directo y clorofila *a* varía al modificar el volumen de muestra sedimentada y filtrada respectivamente; en la turbidimetría el tamaño de la cubeta define el volumen de muestra. En el presente trabajo el tamaño de muestra se fijó para cada método teniendo en cuenta el volumen de cultivo más corrientemente utilizado en bioensayos, por lo tanto el límite de detección se evaluó en relación a las diferentes concentraciones celulares estudiadas.

El tiempo de análisis por muestra se estimó en base a los tiempos de preparación y lectura sin tener en cuenta la sedimentación en el conteo directo y la extracción en la estimación de la clorofila.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos.

Los valores para cada concentración celular, por estimación de clorofila *a* y turbidimetría presentaron un

Tabla 1:
Características cuantitativas de los métodos estudiados

Método	Tiempo (min.)	Vol. muestra (ml)	Sensibilidad	Exactitud* (%)	Límite de detección (nº cél/ml)
Conteo directo	30	8	-	15/10/17	-
clor. *a*	15	50	9 mg/l	28/10/16	-
Turbi-dimetría	2	5	0,002 A	21/ 6/ 4	70.000

* Exactitud: las tres columnas corresponden a concentraciones celulares bajas, medias y altas.

coeficiente de correlación (r) de 0.9549 y 0.9567 respectivamente, respecto del conteo directo.

Si bien los tres métodos siguen una misma tendencia general, a partir del análisis de la varianza se observó que con los tres métodos se obtuvieron resultados diferentes y de acuerdo a la concentración celular unos resultaron más eficaces que otros.

Con bajas concentraciones (25.000 - 400.000 cél/ml) el conteo directo dio mejores resultados, presentó la mayor exactitud y pudieron diferenciarse 6 de las 8 concentraciones analizadas, en tanto que con los dos restantes sólo se

diferenciaron 4. Con concentraciones intermedias (500.000 - 800.000 cél/ml) y altas (900.000 - 1.600.000 cél/ml) la turbidimetría dio mejores resultados presentando los coeficientes de variación más bajos y pudiendo diferenciar las 8 concentraciones estudiadas mientras que por conteo directo y clorofila sólo se diferenciaron 4.

La turbidimetría presentó el límite de detección más alto, siendo necesario contar con una concentración mínima de 70.000 cél/ml; los métodos restantes detectaron la presencia de la especie en todas las concentraciones estudiadas.

DISCUSION

El método de conteo directo, utilizado en este trabajo como patrón de comparación de los otros dos métodos, ha sido exhaustivamente estudiado por Lund *et al.* (1958), pudiéndose obtener estimaciones de precisión estadística bien conocida, asimismo presenta muy bajo límite de detección y requiere pequeños volumenes de muestra, sin embargo por el tiempo necesario para el análisis de cada muestra no se adecúa a los requerimientos de los bioensayos.

La estimación de clorofila ***a*** es más rápida que el método anterior, pero aún cuando es el más utilizado en el estudio de poblaciones naturales, es objeto de numerosas discusiones acerca del uso de diferentes solventes, tiempo y condición de extracción, acidificación, etc. (Nusch, 1980; Sartory y Grobbelar, 1984; Long y Cooke, 1971). Asimismo el volumen de muestra requerido es grande, por lo tanto sólo sería útil para medir la biomasa total producida en el período de tiempo que dura el bioensayo.

La turbidimetría es un método muy rápido, y requiere pequeños volúmenes de muestra, además al trabajar con el material en vivo es factible retornar la muestra al cultivo.

Considerando que los resultados obtenidos por turbidimetría estuvieron bien correlacionados con los del conteo directo al igual que los de clorofila ***a***; que en general presentaron la mayor precisión y permitieron diferenciar

el mayor número de las concentraciones estudiadas; que requiere los menores volúmenes de muestra y tiempo de análisis, se puede concluir que es el método más adecuado para el control de crecimiento en los bioensayos, siempre que la concentración celular se encuentre por encima del límite de detección del método (el que deberá determinarse para cada especie en particular).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Sebastián A. Guarrera por la lectura del manuscrito y al Lic. Víctor Conzonno por facilitarme el uso del instrumental del laboratorio de química del ILPLA a su cargo.

BIBLIOGRAFIA

ACCORINTI, J. 1960. Cultivo unialgal y masivo de *Scenedesmus obliqus* Turp. Ktz. Técnicas de obtención. *Rev. Mus. Arg. Cienc. Nat. Bs. As.*, Bot. 1(9): 21-29.

BUTTERWICK, CH; HEANEY S.I. & TALLING J. F., 1982. A comparison of eight methods por estimating the biomass and growth of plaktonic algae. *Br. Phycol. J.* 17: 69-79.

GOLTERMANN, H.L.; CLYMO R.S. & OHNSTAD M.A.M., 1978. I.B.P. Handbook Nro. 8. Methods por physical and chemical analysis of freshwaters. *Blackwell Scientific Publication Oxford.* London 2da. Ed.: 213 pp.

LONG, E.B. AND COOKE G.D., 1971. A quantitative comparison of pigment extraction by membrane and glass fiber filters. *Limnol. Oceanogr.* 16(6): 990-992.

LUND, J.W.C.; KIPLING C. & LE CREN E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiología* 11:143-170.

NUSCH, E.A., 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and pheopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergn. Limnol.* 14:14-36.

SARTORY, D.P. & GROBBELAR, J.V., 1984. Extraction of chlorophyll ***a*** from freshwater phytoplakton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiología* 114:177-187.

Manuscrito recibido el 17 de agosto de 1988
Manuscrito aceptado el 19 de abril de 1989