

Resumen

La determinación de la biomasa es uno de los problemas que se presenta en muchos procesos biológicos. Existen diversos métodos, directos e indirectos, que se han desarrollado usando técnicas físicas y bioquímicas. En este trabajo se describen algunos de ellos, destacando sus ventajas e inconvenientes.

Palabras clave:

Determinación de la biomasa, componentes celulares específicos, métodos bioquímicos, métodos cinéticos, métodos directos, métodos indirectos, métodos de recuento, procesos biológicos

Abstract

Determining biomass in biological processes.

Direct and indirect methods.

Evaluation of biomass concentration is an important problem encountered in many microbial and other bioprocesses. Many direct and indirect methods have been developed using physical and biochemical techniques. In this work various methods are discussed taking into the consideration their practical importance, usefulness and constrains in application.

Keywords:

Biochemical methods, biomass evaluation, bioprocesses, counting methods, direct methods, indirect methods, kinetic methods, cellular specific components

Determinación de la biomasa en procesos biológicos

I. Métodos directos e indirectos

Por: **Carmen Arnáiz, Laura Isac y Julián Lebrato**

Grupo de Tratamiento de Aguas Residuales. Escuela Universitaria Politécnica, Universidad de Sevilla. C/. Virgen de África, 7. 41011 Sevilla.
Tel. / Fax: 954 55 28 48 / 954 28 27 77. E-mail: lebrato@cica.es

1. Introducción

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. Los métodos de enumeración celular son métodos de observación, basados en propiedades físicas o en la actividad biológica. Actualmente hay un gran interés en métodos alternativos de determinación de la biomasa. Estos métodos son indirectos y estiman algún componente celular o alguna actividad metabólica específica. No requieren el examen visual de los organismos ni su incubación. En la **Figura 1** se muestra un resumen esquemático

de los distintos métodos de determinación de la biomasa.

2. Métodos directos de determinación de la biomasa

2.1. Métodos gravimétricos

La cantidad total de biomasa presente en una muestra puede medirse en términos de peso seco por unidad de volumen, ya sea como sólidos en suspensión totales (SST) o sólidos en suspensión volátiles (SSV). Las células se separan del líquido bien por centrifugación bien por filtración.

La principal desventaja de estas técnicas es que su determinación incluye no sólo microorganismos activos sino microorganismos muertos, material inerte, polímeros extracelulares y materia orgánica adsorbida. Además, no puede aplicarse cuando los sustratos a degradar son insolubles.

Los métodos gravimétricos son simples, pero consumen bastante tiempo y son poco reproducibles.

Métodos de determinación de la biomasa	
Métodos directos	
Métodos gravimétricos	
Métodos espectrofotométricos	
Métodos microscópicos de recuento celular en cámaras	
Microscopía de epifluorescencia	Naranja de acridina, DAPI, quelato de europio, Mg-ANS CTC, SFDA FISH
Métodos de siembra	
Métodos indirectos	
Métodos físico-químicos indirectos: COT, DQO	
Componentes celulares	Ácidos nucleicos Proteínas Polisacáridos Lípidos ATP
Métodos bioquímicos	Actividad esterasa Actividad deshidrogenasa
Métodos cinéticos	Adaptaciones del Respirómetro de Warburg Tasa de respiración Tasa de desaparición de sustrato Potencial bioquímico de producción de metano
Métodos en continuo	

Fig. 1. Esquema de los distintos métodos de determinación de la biomasa.

2.2. Métodos espectrofotométricos

Se basan en la existencia de una relación directa entre el número total de microorganismos presentes en una muestra y su valor de turbidez. Tras la determinación de la turbidez de la suspensión celular mediante espectrofotometría, el resultado se expresa en unidades de absorbancia. Sin embargo, antes de utilizar la turbidez como método de recuento, hay que realizar una recta de calibrado que relacione medidas directas (microscópicas, por recuento en placa o peso seco) con las indirectas de la turbidez. Esta recta contiene datos sobre el número de células, permitiendo la estimación

de tal parámetro a partir de una sola medida de la turbidez.

Se trata de métodos rápidos, pero de baja sensibilidad y que presentan problemas de calibración (tipo de cultivo, medio de cultivo) y de interferencias con partículas.

2.3. Métodos microscópicos de recuento celular en cámaras

Existen diversos tipos de cámaras para el recuento de microorganismos tales como la cámara de Neubauer, Thoma, Bürker, Türk, Fuchs-Rosenthal, Malassez, Petroff Hauser, etc. El recuento de microorganismos se realiza en la cuadrícula central de la cámara y se multiplica

por la profundidad, obteniéndose el número de microorganismos por unidad de volumen (número de células.ml⁻¹, generalmente).

El recuento de microorganismos en cámaras no es un método muy exacto debido a las irregularidades en la distribución de la muestra. Además, pueden confundirse las células con otras formas orgánicas e inorgánicas existentes en el medio y no permite distinguir células vivas de células muertas.

2.4. Métodos microscópicos mediante epifluorescencia

La microscopía de epifluorescencia comenzó a emplearse a principios de los 70 y hoy en día se con-

sidera como uno de los mejores métodos para la estimación de la biomasa. La epifluorescencia es debida a un agente fluorocromo, a la adición de algún anticuerpo marcado con fluorescencia (inmunofluorescencia) o a una autofluorescencia natural debida a la existencia de algún componente celular autofluorescente.

Cuando la epifluorescencia se debe a un agente fluorocromo, el procedimiento consiste en la tinción de las bacterias con dicho agente y posterior recuento mediante microscopía óptica con iluminación de epifluorescencia. Los sustratos fluorescentes o fluorocromos que se han empleado para la observación directa de bacterias se clasifican en dos grupos. En el primero de ellos quedarían englobados aquellos fluorocromos que tras ser adsorbidos actúan específicamente sobre ácidos nucleicos u otros componentes celulares. El segundo incluiría a todos aquellos que tras ser sustratos de una determinada actividad metabólica, son convertidos en moléculas fluorescentes.

Al primer grupo pertenecen los principales fluorocromos utilizados para la estimación de la población total de una muestra: el naranja de acridina y el 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Estos fluorocromos permiten distinguir células de partículas e identificar bacterias no sólo por su color, sino también por su forma y tamaño.

El naranja de acridina colorea tanto el ADN como el ARN de las células emitiendo a una longitud de onda aproximada de 470 nm. Los ácidos nucleicos de hebra simple se colorean de un color naranja-rojo fluorescente, mientras que los de doble hebra adoptan un color verde fluorescente. El fluorocromo DAPI es un colorante específico del ADN y su pico de excitación se encuentra próximo a la región ultravioleta (365 nm). A pesar de las ventajas que supone el uso de estos fluorocromos, no permiten distinguir entre las células muertas, metabólicamente

inactivas, y las vivas, ya que el ADN conserva sus propiedades incluso en células muertas.

El quelato de europio, al igual que el naranja de acridina o el DAPI, es un colorante específico de ácidos nucleicos. Otros fluorocromos como las sales de magnesio del ácido 1-anilino-8-naftalensulfónico (Mg-ANS) tiñen principalmente componentes celulares como proteínas, lípidos o membranas celulares. En cambio, el comportamiento de estos agentes fluorocromos es el comentado anteriormente, sobrestiman el número de células viables al no distinguir células vivas de muertas.

En el segundo grupo quedarían englobados fluorocromos como el cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio (CTC, Rodríguez et al., 1992) ó el 5- (y 6-) diacetato de sulfofluoresceína (SFDA, Tsuji et al., 1995). Ambos fluorocromos, a diferencia con los anteriores, distinguen bacterias metabólicamente activas de las que no lo son mediante la observación microscópica del producto fluorescente resultado de la actividad metabólica para la que son específicos. En el caso del CTC la actividad metabólica es la respiratoria y en el del SFDA es la actividad esterasa. La epifluorescencia basada en fluorocromos como el CTC y el SFDA pondrá de manifiesto aquellos microorganismos en los cuales estén presentes dichas actividades metabólicas, pero sin cuantificarlas. Salvando este obstáculo se encuentran las medidas bioquímicas de determinación indirecta de la biomasa, que sí cuantifican actividades metabólicas.

La epifluorescencia es un método simple y rápido. No obstante, su reproducibilidad está cuestionada y necesita un equipamiento relativamente caro.

La fluorescencia mediante anticuerpos marcados con agentes fluorescentes está basada en las propiedades inmunológicas de las células. Es una técnica muy sensible y espe-

La epifluorescencia

es un método

simple

y rápido

cífica, y puede realizarse in situ. También puede llevarse a cabo mediante hibridación de sondas fluorescentes de ADN o ARN (*Fluorescent in situ hybridization*, FISH), cada vez más utilizadas en Ecología Microbiana.

2.5 Métodos de siembra

El recuento de microorganismos viables se fundamenta en la capacidad de dichas células viables de desarrollar una colonia visible en un medio de cultivo apropiado. En los recuentos en placa por vertido, un volumen de 0,1-1 ml de la suspensión microbiológica se mezcla con el medio de cultivo fundido y parcialmente enfriado en una placa de Petri. En los recuentos en placa por siembra en superficie, se extiende un volumen de aproximadamente 0,1 ml de la suspensión sobre la superficie del medio de cultivo. Los resultados de los recuentos en placa se expresan como unidades formadoras de colonia (UFC) por unidad de volumen de la suspensión microbiológica. Para que el recuento sea estadísticamente significativo, el número de colonias deberá estar comprendido entre 30 y 300 colonias. En el caso de muestras muy diluidas se puede emplear la filtración de membrana, en la que tras la filtración de la muestra es el filtro el que es colocado finalmente sobre el agar (Atlas, 1992).

Otro tipo de recuentos los constituyen aquellos que emplean un me-

dio de cultivo líquido como es el caso de la estimación del número más probable (NMP).

El recuento de microorganismos viables se fundamenta en el desarrollo de una colonia visible a partir de cada organismo viable. El principal problema de este método es que no todas las bacterias presentes en una muestra pueden crecer en el medio y las condiciones de cultivo seleccionado. Suelen ser, por tanto, métodos infraestimativos y estadísticamente cuestionables (Lazarova y Manem, 1995).

3. Métodos indirectos de determinación de la biomasa

Estos métodos se basan fundamentalmente en la determinación de algún componente celular específico, en la cuantificación de alguna actividad enzimática (métodos bioquímicos) o en la medida de consumo de sustrato o de la formación de algún producto (métodos cinéticos). También se incluyen en este apartado algunos métodos físico-químicos.

Los métodos bioquímicos y cinéticos determinan, más que la viabilidad de las bacterias la actividad ya que dependen más del estado metabólico de los microorganismos que del número de individuos.

3.1. Componentes celulares específicos

Cualquier componente celular seleccionado para la estimación de la biomasa viva de una muestra debe responder a tres criterios fundamentales:

- Estar presente únicamente en células vivas.
- Ser rápidamente degradado cuando las células mueran.
- Ser relativamente constante en concentración respecto a cambios en el estado fisiológico celular y entre distintas especies.

Hasta el momento, no existe ningún componente celular que cumpla estos tres requerimientos. Sin embargo, los más adecuados para esti-

mar biomasa viva son los ácidos nucleicos, las proteínas, los polisacáridos, los lípidos y el ATP.

3.1.1. Ácidos nucleicos

El ADN y el ARN son dos componentes de las bacterias cuya síntesis es proporcional a la tasa de crecimiento. Mientras que las concentraciones de ARN varían considerablemente con el estado fisiológico celular, la cantidad de ADN es relativamente más constante.

La cantidad de ADN se determina mediante espectrofotometría, tras su extracción y purificación. Existen diversas técnicas, si bien presentan la desventaja de que los procedimientos de purificación son complejos, con diversas interferencias y bastante costosos.

3.1.2. Proteínas

Existen varias técnicas para el análisis de proteínas totales de una muestra biológica. Algunos están muy extendidos y se caracterizan por su sensibilidad, rapidez y simplicidad. Es el caso de las técnicas de Lowry et al. (1951) y Bradford (1976).

La principal desventaja de la determinación de proteínas es que su cantidad en las células está sujeta a fuertes variaciones debido, fundamentalmente, a cambios en las condiciones fisicoquímicas y al estado fisiológico celular.

3.1.3. Polisacáridos

La mayoría de las células procariontas contienen ácido murámico (un peptidoglicano) como componente de la pared celular. Existen varias técnicas para la determinación del ácido murámico en muestras que contengan microorganismos. Todas ellas se basan en la conversión del ácido murámico a lactato, seguida del análisis enzimático o químico de la concentración de lactato. El ácido murámico se extrae de las células mediante una hidrólisis alcalina y se purifica posteriormente mediante cromatografía de intercambio iónico. Otros

análisis más sensibles necesitan del uso de cromatografía líquida (HPLC) o gaseosa (GC). Todas estas técnicas son laboriosas, muy largas y necesitan de un equipamiento caro (Figura 2).

3.1.4. Lípidos

Los lípidos son un componente fundamental de las membranas celulares. Su determinación para la estimación de la biomasa de una población bacteriana ofrece muchas ventajas sobre otros métodos. La principal ventaja es su alto contenido específico y que se encuentran en cantidades relativamente constantes. Otra ventaja muy importante es que los lípidos no forman parte de las reservas celulares y se degradan rápidamente durante la lisis bacteriana. Aproximadamente, entre un 90-98% de los lípidos de las membranas celulares está en forma de fosfolípidos (Lazarova y Manem, 1995).

Las técnicas de análisis se basan, fundamentalmente, en la extracción celular de los fosfolípidos con un disolvente orgánico, su posterior hidrólisis ácida para liberar el fosfato y, por último, la determinación colorimétrica de éste. Son técnicas relativamente sencillas, reproducibles y sensibles (de 0,1 a 1 nmol de fosfato; Findlay et al., 1989).

3.1.5. Trifosfato de adenosina o ATP

El ATP presenta las ventajas de ser un componente bioquímico central presente en todos los microorganismos y específico de los microorganismos vivos, circunstancias ambas que permiten relacionarlo con la biomasa viva.

Una de las técnicas más utilizadas para medir ATP se basa en la reacción luciferina-luciferasa, proceso responsable de la luz emitida por las luciérnagas y que ha sido ampliamente estudiado. En este mecanismo de luminiscencia se sabe que intervienen luciferina (fenol heterocíclico, LH₂), luciferasa (enzima, E), ATP, cationes de magnesio y

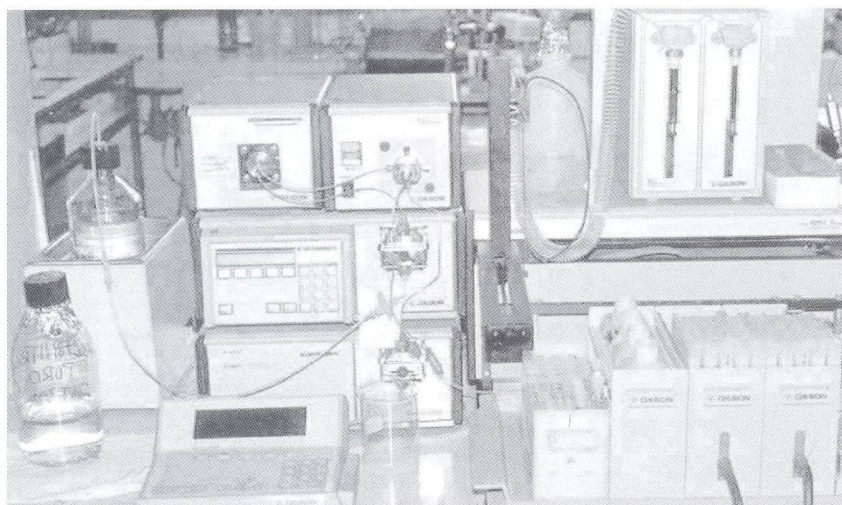


Fig. 2. Cromatógrafo líquido de alta resolución GILSON.

oxígeno en un proceso de oxidorreducción que ocurre en doble etapa:



Ya que por cada molécula de luciferina oxidada se emite un cuanto de luz, la determinación del ATP en una muestra biológica puede hacerse mediante extracción por ebullición en tampón Tris (hipocloruro de tris-hidroximetil-aminoetano) del ATP, incubación con luciferina-luciferasa y posterior medida de la luz producida en un fotómetro con registro.

La mayor desventaja de esta técnica es la necesidad de procesar la muestra con rapidez, ya que el estado fisiológico de las células cambia rápidamente tras la toma de muestra.

La relación entre el ATP, el ADP y el AMP y el contenido total de desoxirribonucleótidos refleja la carga energética de las células [(ATP + 0,5 ADP)/(AMP + ADP + ATP)]. Esta relación puede duplicarse en sólo unos segundos. Algunos autores sugieren que la carga energética es un valor mucho más preciso que el contenido absoluto de ATP ya que la composición celular de desoxirribonucleótidos varía con el estado fisiológico de los microorganismos: durante el crecimiento bacteriano el pool energético disminuye, al disminuir la concentración de ATP y

umentar las de ADP y AMP (Uhlinder y White, 1983).

3.2. Métodos bioquímicos

Las medidas de alguna actividad enzimática pueden considerarse como una alternativa a los métodos tradicionales. Los ensayos enzimáticos son simples de realizar y sus resultados se obtienen rápidamente. Además, el equipamiento necesario no es ni costoso ni complejo. La mayoría de las medidas de actividad enzimática se realiza mediante la conversión de sustratos específicos a productos coloreados que son cuantificados fotométricamente.

La principal desventaja de los métodos bioquímicos es la variación de las actividades enzimáticas celulares con los cambios fisiológicos y que, una vez que los microorganismos mueren, las enzimas liberadas pueden seguir activas. Entre las distintas medidas de actividad enzimática cabe destacar la actividad esterasa y la actividad deshidrogenasa.

3.2.1 Actividad esterasa

El diacetato de fluoresceína (FDA) es un compuesto que puede ser hidrolizado por enzimas tales como proteasas, lipasas y esterases, siendo el producto de dicha

*Por cada molécula
de luciferina oxidada
se emite un cuanto
de luz.*

conversión enzimática la fluoresceína. La fluoresceína puede ser visualizada como un producto intracelular mediante el empleo de la microscopía de epifluorescencia o cuantificada mediante espectrofotometría tras ser extraída con disolventes orgánicos.

El principio en el que se basa la técnica del FDA es en el carácter hidrofóbico del diacetato de fluoresceína, lo que le permite penetrar a través de la bicapa lipídica que forma la membrana celular. Una vez en el interior celular, es convertido mediante la actividad esterasa en fluoresceína, molécula de carácter hidrofílico que puede ser almacenada intracelularmente dada la baja permeabilidad de la membrana a ésta. Ya que las células muertas se caracterizan por presentar abundantes orificios en sus membranas, el FDA sólo teñirá células vivas.

El FDA se ha empleado principalmente en la determinación de la actividad de hongos y bacterias en muestras de suelos. Sin embargo, se ha encontrado que no todas las especies presentes en el suelo son sensibles a esta técnica, ya sea porque el FDA no penetra adecuadamente en las células o porque no es bien retenido. Tratando de minimizar estos problemas, en el campo de la epifluorescencia se han utilizado derivados del FDA como el diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) y el diacetato de 5- (y 6-) sulfofluoresceína (SFDA), este último mencio-

nado anteriormente y que por el momento se ha revelado como el más apropiado.

3.2.2. Actividad deshidrogenasa (DHA)

En una muestra biológica, la determinación de la actividad del sistema de transporte electrónico puede realizarse por medida de la actividad deshidrogenasa. Todos los microorganismos aerobios poseen un sistema de transporte de electrones activo, en el que el más importante aceptor terminal de electrones es el oxígeno. En la corriente principal de este transporte electrónico participan, entre otras, las deshidrogenasas piridín-dependientes que necesitan NAD o NADP como coenzima y las deshidrogenasas flavín-dependientes que contienen flavín-adenín-dinucleótido (FAD) ó flavín mononucleótido (FMN) como grupo prostético. Las deshidrogenasas son enzimas de oxido-reducción que participan en el transporte de electrones desde un sustrato orgánico a un aceptor final de electrones mediante la transferencia de hidrógeno. La determinación de la actividad deshidrogenasa puede hacerse midiendo la capacidad de los microorganismos para reducir un indicador o colorante redox. Entre estos colorantes se encuentran sales de tetrazolio tales como el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) o el cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT). Ambas se caracterizan por ser solubles en agua en su forma oxidada y por formar depósitos celulares insolubles de TTC-formazán e INT-formazán (Figura 3), respectivamente, cuando son reducidas por la actividad respiratoria. Estos depósitos rojizos de formazán, al ser observados microscópicamente, permiten distinguir en muestras acuosas las bacterias que respiran de aquellas que no (determinación directa de la biomasa). O bien, el formazán es extraído con disolventes orgánicos y determinado espectrofotométricamente, permitiendo

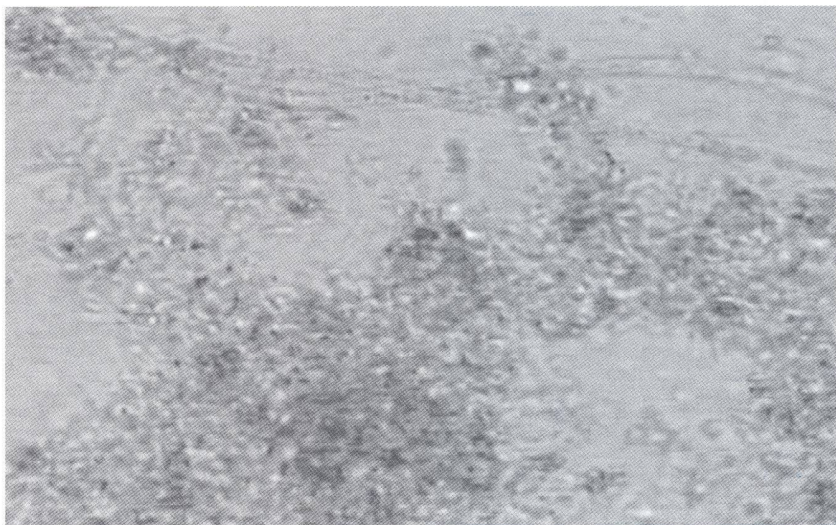


Figura 1.3 Visión al microscopio óptico (1000x) de una muestra de fango activo tratada según el protocolo de la INT-deshidrogenasa.

la cuantificación de la actividad respiratoria de la muestra.

El TTC presenta el inconveniente de su elevada sensibilidad al oxígeno (Chung y Neethling, 1989). El INT no tiene esta limitación y su uso está cada vez más extendido. Sin embargo, su precisión y correlación con la cantidad de biomasa viva no está suficientemente demostrada (Singh et al., 1994).

3.3. Métodos cinéticos

La base de estos métodos es la medida del consumo de sustrato o de la formación de producto en ensayos en discontinuo. El ejemplo más típico en microorganismos aerobios es la determinación de la DBO, que indica la biodegradabilidad de un sustrato en disolución a través del consumo de oxígeno del medio.

3.3.1. Adaptaciones del Respirómetro de Warburg

La tasa de consumo de oxígeno puede ser determinada según el principio en el que se basa el respirómetro de Warburg, por el que a temperatura y volumen constantes, la variación en la cantidad de un gas puede medirse por la variación de su presión. En una planta piloto equipada para actuar como un respirómetro, los microorganismos presen-

tes en la muestra metabolizan la materia orgánica con la consecuente disminución del nivel de oxígeno, que es consumido, y el aumento de la concentración de CO_2 , que es producido. El dióxido de carbono es adsorbido en una solución de potasa, por lo que la disminución de la presión en este sistema cerrado es debida al volumen de oxígeno consumido por los microorganismos, lo cual puede ser medido mediante un sensor de presión y registrado. La representación en el tiempo del oxígeno disuelto (mg.l^{-1}) informa del consumo de oxígeno, siendo la pendiente de la recta de ajuste óptimo la tasa de consumo de oxígeno (OUR) en $\text{mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Una adaptación del respirómetro de Warburg para medir el biogás producido en procesos anaerobios puede encontrarse en James et al. (1990).

3.3.2. Tasa de respiración (Oxygen Uptake Rate, OUR)

El consumo de oxígeno de los microorganismos presentes en una muestra biológica debido a la respiración endógena de mantenimiento celular y a la oxidación del sustrato orgánico presente en dicha muestra (en ausencia de nitrificación), recibe el nombre de respiración. Así pues, se denomina tasa de respira-



Fig.4. Sistema OXITOP IS6 WTW para la determinación de DBO.

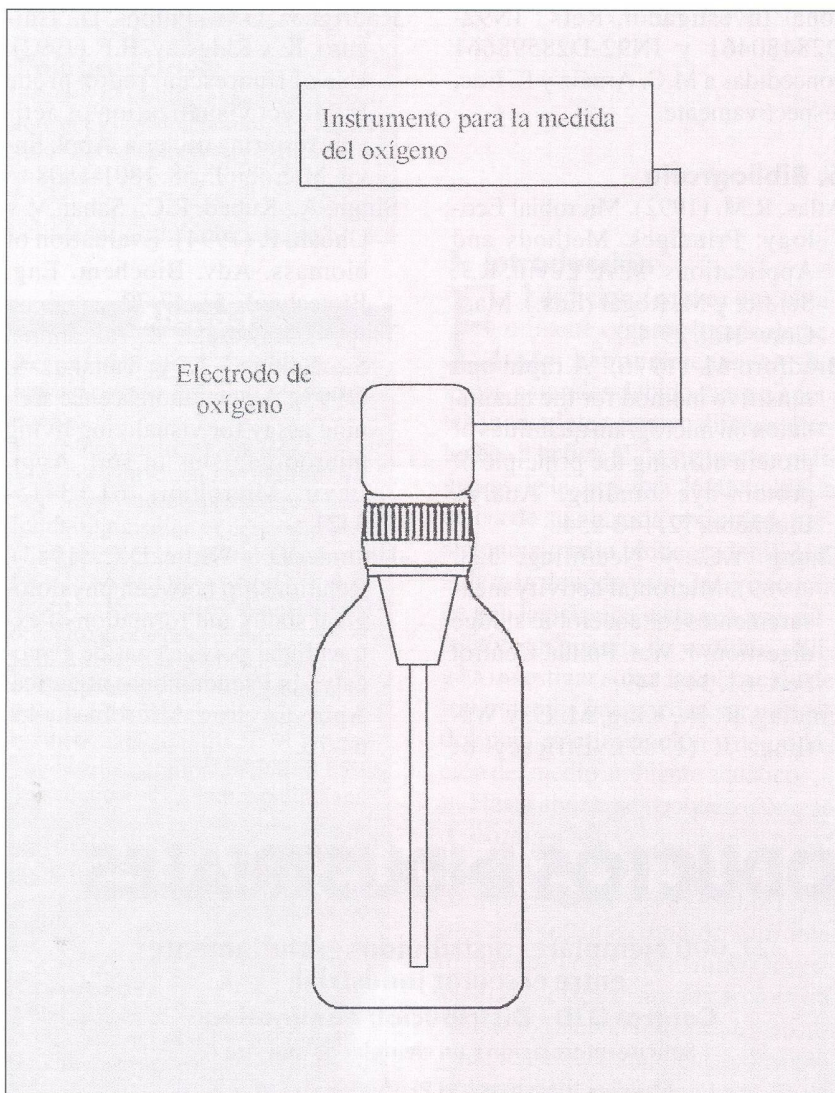


Fig.5. Dispositivo de medida del consumo de oxígeno.

La respiración endógena es directamente proporcional a la concentración de microorganismos

ción (en $\text{mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) a la velocidad con la que los microorganismos utilizan el oxígeno en función a estos dos conceptos.

La respiración endógena, en la práctica, se considera que es constante a temperatura y concentración de microorganismos fijos. Por tanto, será directamente proporcional a la concentración de microorganismos presentes en la suspensión biológica, estimados como SSV.

La respiración debida a la metabolización del sustrato orgánico presente en la muestra o respiración exógena, será proporcional a la concentración de sustrato orgánico rápidamente biodegradable e incluiría, si lo hubiera, el consumo de oxígeno ocasionado por nitrificación.

La tasa de respiración total referida a la concentración de microorganismos, expresada como SSV, es la tasa de respiración específica (SOUR). Su principal característica es que define la actividad biológica en un momento dado de una biomasa específica.

La medida de la actividad biológica SOUR está relacionada con la relación "alimento/microorganismos" (F/M en terminología anglosajona), ya que comprende la tasa de respiración exógena (proporcional a la DBO) y los SSV de un cultivo biológico. En la **Figura 5** se muestra un esquema simplificado del dispositivo empleado para la medida de consumo de oxígeno.

3.3.3. Tasa de desaparición de sustrato

Es el método más convencional para determinar la actividad de una población de microorganismos. La disminución de la concentración de sustrato en el tiempo puede hacerse a través de métodos indirectos, como la DQO o el COT, o mediante técnicas específicas, fundamentalmente cromatográficas (GC o HPLC). La búsqueda de nuevos métodos ha llevado al empleo de técnicas basadas en el empleo de electrodos selectivos, en los que el cálculo de la actividad de la muestra biológica se realiza en base al tiempo requerido para que ocurra el 50% de la desaparición del sustrato suministrado y para el que el electrodo es específico.

3.3.4. Potencial bioquímico de producción de metano (BMP)

Esta técnica consiste en medir con una jeringa o un frasco de Mariotte relleno de agua la producción total de biogás (CH_4 y CO_2) producida por un reactor anaerobio discontinuo.

3.5. Métodos fisicoquímicos indirectos

La medida del COT o de la DQO son métodos muy usados para la estimación indirecta de la biomasa suspendida o fijada. Son muy sensibles y precisos, pero presentan las mismas importantes limitaciones que los SST y SSV.

4. Métodos en continuo

Durante los años 90 se han desarrollado métodos cuantitativos para

la determinación on-line de la biomasa de un proceso biológico. Las técnicas más importantes se basan en propiedades eléctricas, microcalorimétricas o espectrofotométricas de los cultivos biológicos. Sin embargo, a pesar del desarrollo tecnológico, no existe un sensor ideal para la monitorización en continuo de la biomasa (Singh et al., 1994).

5. Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Ministerio de Educación y Cultura, por la financiación de parte de este trabajo mediante dos becas del Programa de Formación de Personal Investigador, Refs.: IN92-D28480461 y IN92-D28598661 concedidas a M.C. Arnáiz y L. Isac, respectivamente.

6. Bibliografía

- Atlas, R.M. (1992). *Microbial Ecology: Principles, Methods and Applications*. M.A. Levin, R.J. Seidler y M. Rogal (Eds.). MacGraw-Hill, 29-43.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation on microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72, 148-254.
- Chung Y.C. y Neethling, J.B. (1989). Microbial activity measurements for anaerobic sludge digestion. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 61, 343-349.
- Findlay, R. H., King, M. G. y Watling, J. (1989). Efficacy of phospholipid analysis in determining microbial biomass in sediments. *Appl. Envir. Microbiol.*, 55, 2888-2893.
- James, A., Chernicharo, C.A.L. y Campos, C.M.M (1990). The development of a new methodology for the assesment of specific methanogenic activity. *Wat. Res.*, 24, 813-825.
- Lazarova, V. y Manem, J. (1995). Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Wat. Res.*, 29, 2227-2245.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr, A.L. y Randall R.J. (1951). Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Rodríguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K. y Ridgway, H.F. (1992). Use of fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Envir. Microbiol.*, 58, 1801-1808.
- Singh, A., Kuhad, R.C., Sahai, V. y Ghosh, P. (1994). Evaluation of biomass. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 51, 47-70.
- Tsuji, T., Kawasaki, Y., Takeshima, S., Sekiya, T. y Tanaka, S. (1995). A new fluorescence staining assay for visualizing living microorganisms in soil. *Appl. Envir. Microbiol.*, 61, 3415-3421.
- Uhlinder D. y White, D.C. (1983). Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycolyx in *Pseudomonas atlantica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 64-70.

EQUIPOS PRODUCTOS INDUSTRIALES

EPI

27.000 ejemplares distribuidos gratuitamente
entre el sector industrial

Control OJD - Distribución nominativa

Solicite información y un ejemplar de muestra

Elsevier Información Profesional, S.A.

Entença, 28 Entlo. - 08015 Barcelona - Tel.: 292 46 38