



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

**Puesta a punto de un método para la
determinación de la viabilidad de microalgas
en sistemas de tratamiento de agua residual**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Sandra Roldán Barreda

Valencia, 2015

Directores

Dra. María Pachés Giner

Dr. Luís Borrás Falomir

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a la Dra. María Pachés Giner, por su esfuerzo, la orientación, el seguimiento y la supervisión continua del mismo, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de este tiempo. Por compartir conmigo sus conocimientos y su amplia experiencia en la materia, por su gran contribución profesional y personal, y por todas las horas que ha pasado conmigo revisando una y mil veces el documento. Para mí ha sido un placer trabajar bajo su orientación y aprender día a día de sus experiencias. Ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con ella por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado este trabajo.

También al Dr. Luis Borrás Falomir por su esfuerzo, dedicación y conocimientos, así como por su sabia orientación, los cuales fueron decisivos para la realización de este trabajo. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de este trabajo.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas de Mónica Murgui Mezquita, con la que me encuentro en deuda por la colaboración en el suministro de datos necesarios para realizar parte de esta investigación y por estar pendiente de mí, enseñándome y apoyándome en tantas horas de laboratorio.

Amplío mi agradecimiento a todos los profesores del Máster, ya que todos me han aportado conocimientos y capacidades que de alguna manera se expresan en este trabajo.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mis padres y familia, que no han cesado en ningún momento de apoyarme y motivarme para que siguiera adelante. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido difícil llevar a cabo este trabajo. En especial quiero expresar mi más grande agradecimiento a mi madre, que sin su ayuda hubiera sido imposible culminar mi trabajo.

También quiero dar las gracias a mi hermana Noelia, y a mi prima Laura, por estar siempre pendientes de mí y de cómo me encuentro. Un verdadero amigo es alguien que te conoce tal como eres, comprende donde has estado, te acompaña en tus logros y tus fracasos, celebra tus alegrías, comparte tu dolor y jamás te juzga por tus errores. Gracias por vuestra paciencia.

Gracias también a los primos y amigos a los que he robado horas de compañía. Nombrar a todos sería muy extenso y podría cometer algún olvido injusto, por ello, gracias a todos por estar ahí.

Por último, agradecer a Tonín, fuente de apoyo constante e incondicional. Y a todas aquellas personas que desde el cielo cuidan de mí, en especial a Ortín, Antón, Noelia y Martina.

Gracias a todos.

RESUMEN

El presente trabajo pretende desarrollar una metodología que permita la detección, visualización y cuantificación de la viabilidad celular en microalgas procedentes de cultivos empleados para el tratamiento de aguas residuales, mediante el empleo del colorante Sytox Green (Invitrogen, S7020), tinte de ácidos nucleicos.

La motivación de este estudio es responder a la necesidad de implementar un procedimiento rápido y eficaz para la determinación de la viabilidad celular a través de microscopía de epifluorescencia, en el campo referente al tratamiento de aguas residuales mediante microalgas.

Para la puesta a punto de la técnica se han utilizado muestras provenientes de dos sistemas, uno a escala de planta piloto, formado por 4 fotobioreactores semicontínuos de una planta piloto instalada en la EDAR del Carraixet, de post tratamiento de agua tras un tratamiento anaerobio, y otro de un reactor semicontínuo a escala de laboratorio.

Los parámetros a optimizar son el tiempo de incubación de las muestras con Sytox, la concentración de sólidos en las muestras y la concentración de Sytox para que el cálculo de la viabilidad celular se realice correctamente.

Después de realizar las pruebas los resultados obtenidos son un tiempo de incubación de 5 minutos, una concentración de sólidos suspendidos totales en las muestras de 250-400 mg/L, una relación volumen de muestra-volumen de Sytox 50:0,1 (50 μ L muestra y 0,1 μ L Sytox) y una concentración de Sytox entre 5-8 μ L Sytox/mg SST o 2000 μ L Sytox/L en ese rango de concentración de sólidos (250-400 mg/L).

También se ha determinado el error que se produce al realizar el método. Éste puede llegar a ser del 12 %. A su vez se calcula el error sistemático y aleatorio producido por las pipetas y la incertidumbre típica causada por la repetitividad. Los errores sistemáticos (exactitud) se pueden reducir mediante el calibrado periódico de pipetas y los errores aleatorios (precisión) se pueden reducir mediante el uso adecuado de los materiales (pipetas). La incertidumbre típica causada por la repetitividad puede reducirse aumentando el número de repeticiones realizadas de una misma muestra.

El método de análisis de viabilidad mediante Sytox ha sido comparado con el método de epifluorescencia sobre membranas de policarbonato, confirmado que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos tras realizar la viabilidad mediante Sytox y aquellos procedentes del método de epifluorescencia. Puesto que con el método de viabilidad mediante Sytox se proporciona más información, se recomienda el uso de ésta.

Finalmente, se ha aplicado la técnica desarrollada en el presente trabajo para analizar la viabilidad en el FBR 4 y compararla con la eliminación de nutrientes en el periodo de estudio comprendido entre el 10/04/2014 y el 14/07/2014.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Importancia de las microalgas para el tratamiento de aguas	1
1.2. Características básicas de las microalgas	1
1.2.1. Grupos de microalgas estudiados	2
1.3. Viabilidad celular	4
1.4. Métodos de medida de la viabilidad celular	4
1.5. Método de análisis de Viabilidad mediante Sytox	7
2. Objetivos	9
3. Material y Métodos	10
3.1. Reactivo utilizado: Sytox Green, tinte de ácidos nucleicos	10
3.2. Muestras Estudiadas	11
3.2.1. Planta Piloto	11
3.2.2. Planta de Laboratorio	13
3.2.3. Ensayos de biodegradabilidad anaerobia en botella	13
3.3. Diseño de experimentos	14
3.4. Métodos analíticos	19
3.4.1. Determinación de Sólidos Suspendidos Totales y Sólidos Suspendidos Volátiles	19
3.4.2. Determinación de la Absorbancia	20
3.4.3. Observación en el Microscopio	20
3.4.4. Tratamiento térmico de las muestras	24
3.5. Tratamiento estadístico de los datos	25
3.5.1. Correlación estadística	25
3.5.2. Análisis de la varianza (ANOVA)	26
3.6. Error del método	27
3.7. Comparación del método de cálculo de viabilidad mediante Sytox y el método de recuento por epifluorescencia en membranas de policarbonato.	29
3.8. Aplicación de la metodología desarrollada	30
4. Resultados y discusión	31
4.1. Experimentos realizados	31
4.1.1. Tiempo de incubación óptimo	31
4.1.2. Concentración de sólidos en la muestra	32
4.1.3. Concentración de Sytox óptima (Relación Volumen de muestra por Volumen de colorante)	36

4.1.4.	Concentración Sytox - Concentración SST.....	51
4.1.5.	Pérdida de fluorescencia.....	55
4.1.6.	Parámetros óptimos establecidos.....	55
4.1.7.	Confirmación del funcionamiento del método.....	55
4.2.	Correlación estadística.....	58
4.3.	Error del método.....	59
4.4.	Relación entre método de cálculo de viabilidad mediante Sytox y recuentos por epifluorescencia en membranas de policarbonato.....	61
4.5.	Aplicación de la metodología desarrollada.....	62
5.	Conclusiones.....	69
6.	Bibliografía.....	71

Índice de Figuras

Figura 1. Diatomea observada a 400X.	3
Figura 2. a) <i>Monoraphidium</i> observados a 1000X y b) <i>Scenedesmus</i> libres y formando colonias, observados a 400X	4
Figura 3. Imagen de células teñidas mediante Sytox, donde se aprecian con coloración verde aquellas en las que ha penetrado el tinte y con coloración roja aquellas en las que no ha penetrado.....	8
Figura 4. Imágenes de a) <i>Scenedesmus</i> formado por 2 células no viables en los extremos de la colonia y 6 células vivas (rojas), observado a 400X, b) conjunto de células vivas, dañadas e inviables, 400X	10
Figura 5. Planta piloto ubicada en la EDAR de la Cuenca del Carraixet	12
Figura 6. Esquema de la planta piloto ubicada en la EDAR de la Cuenca del Carraixet.....	12
Figura 7. Reactor de Laboratorio	13
Figura 8. Espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis.....	20
Figura 9. Microscopio óptico Leica DM 2500.....	21
Figura 10. Cámara Neubauer Labor Optik	22
Figura 11. Cuadrícula de recuento de la cámara Neubauer	22
Figura 12. Taxones que aparecen en las muestras estudiadas, observados a 400X. a) Diatomea inviable (verde) junto a <i>Monoraphidium</i> viable (rojo). b) <i>Monoraphidium</i> viables e inviables. Los <i>Monoraphidium</i> se caracterizan por tener morfología alargada; c) Colonia de <i>Scenedesmus</i> . Estos suelen aparecer en colonias de 4 a 8 células.....	23
Figura 13. Equipo digestor completo compuesto por Bloque metálico conectado a programador de procesos tiempo/temperatura, gradilla portatubos con tubos de digestión y colector de humos.....	25
Figura 14. Muestras observadas a 400X de células tras tratamiento térmico teñidas con Sytox tras un tiempo de incubación de a) 5 minutos y b) 10 minutos	32
Figura 15. Muestra a concentración 90 mg/L de SST, observada a 400X.....	33
Figura 16. Muestra a concentración 120 mg/L de SST, observada a 400X.....	33
Figura 17. Muestra a concentración 180 mg/L, observada a 400X	34
Figura 18. Muestra a concentración 360 mg/L, observada a 400X	34
Figura 19. Muestra a concentración 720 mg/L, observada a 400X	35
Figura 20. Muestra a concentración 1080 mg/L, observada a 400X	35
Figura 21. Muestra observada a 400X procedente del sistema a escala de planta piloto (FBR 3) a concentración: a) 365 mg/L b) 730 mg/L y c) 1095 mg/L respectivamente	36

Figura 22. Blanco (sin Sytox) de muestra sin tratamiento térmico del reactor a escala de planta piloto (TM) observado a a) 400X y b) 1000X. Se puede apreciar la coloración roja propia de la autofluorescencia de la clorofila.	37
Figura 23. Blanco (sin Sytox) de muestra térmica del reactor a escala de planta piloto (TM) observada a a) 400X y b) 1000X donde se aprecia coloración marrón no tan intensa.....	37
Figura 24. Muestra sin tratamiento térmico del reactor a escala de planta piloto (TM) a concentración 1:1 (0,1 μ L Sytox+0,1 μ L muestra) observada a 400X, donde se aprecian células con coloración roja y células con coloración amarillenta en ambas imágenes.	38
Figura 25. Muestra sin tratamiento térmico del reactor a escala de planta piloto (TM) a concentración 1:0,1 (1 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox) observada a 400X, donde se aprecian células viables (rojas) y células inviables (amarillentas) en ambas imágenes.	39
Figura 26. a) Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala de planta piloto (TM) a concentración 5:0,1 (5 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), en la que se aprecian células rodeadas de bacterias, observada a 400X, b) Muestra sin tratamiento térmico del reactor a escala de planta piloto (TM) a concentración 5:0,1 observada a 400X donde se aprecian células vivas (rojas) y células inviables (verdes).....	40
Figura 27. Muestra térmica procedente del reactor a escala de planta piloto (TM) a concentración 5:0,1 (5 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observada a 400X, donde se aprecian los núcleos verdes del interior de las células, aunque la coloración no se ve tan intensa como aquella observada directamente en el microscopio debido a la pérdida de fluorescencia.	40
Figura 28. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 10:0,1 (10 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observada a 400X, a) se aprecia un conjunto de células inviables (verdes) en la parte superior de la fotografía y algunas células viables (rojas) en la parte inferior de la fotografía. b) conjunto de células viables y dañadas en la parte superior de la fotografía y alguna célula inviable (verde) en la parte inferior. c) Conjunto de células viables (rojas) rodeadas por bacterias formando un flóculo.	41
Figura 29. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 3) a concentración 10:0,1 (10 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observadas a a) 400X donde se aprecian en la primera imagen células inviables (verdes) con orgánulos de un verde más intenso en la parte superior de la imagen, junto con conjuntos de células viables (rojas) en la parte inferior de la imagen, en la segunda se observan conjuntos de células viables (rojas) con células inviables (verdes) en las esquinas del conjunto, y alguna célula viable suelta en la parte inferior de la imagen, y en la tercera imagen se aprecia un conjunto de células viables (rojas) y un conjunto de células inviables (verdes) b) 1000X, donde puede apreciarse en la primera imagen un conjunto de células viables (rojas) y un conjunto de células inviables (verdes) donde la coloración verde es demasiado intensa, y en la segunda imagen se aprecian células inviables con orgánulos coloreados de un verde más intenso al resto de la célula..	42
Figura 30. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 4) a concentración 10:0,1 (10 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observada a 400X. En ambas imágenes se aprecian en su mayoría células viables (rojas), a la vez que se pueden ver una cantidad menor de células inviables (verdes) observándose en la segunda imagen que las células inviables deslumbran y desenfocan la imagen.	42

- Figura 31.** Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 10:0,1 (10 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observada a a) 400X, donde se aprecian células inviables con un orgánulo verde muy intenso y b) 1000X, formado por un conjunto de 3 células con orgánulos en su interior teñidos de verde más intenso que el resto de la célula. 43
- Figura 32.** Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 3) a concentración 10:0,1 (10 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X formada por un conjunto de células inviables con orgánulos en el interior más deslumbrantes que el resto de la célula b) observada a 400X, donde se aprecia que hay tinte sobrante por la muestra que impide una buena observación de las células..... 43
- Figura 33.** Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X, se observa una célula inviable (verde) y algunas células viables (rojas) y b) observada a 1000X, formada por un conjunto de células viables (rojas) 44
- Figura 34.** Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 3) a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X donde se ve un conjunto de células viables (rojas) en la parte inferior de la imagen, así como otros conjuntos de células viables y dos células inviables individuales, y b) observada a 1000X, donde se aprecian células viables, y células inviables que han perdido coloración por lo que ya no se ven de un color tan verde deslumbrante, sino de un color más anaranjado. 44
- Figura 35.** Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 4) a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X formada por células inviables (verdes) que deslumbran un poco por la imagen, y células viables (rojas) y b) observada a 1000X, donde puede apreciarse que las células inviables deslumbran al ser demasiado fluorescentes 45
- Figura 36.** Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala de laboratorio a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), donde se aprecian células viables (rojas) a) observada a 400X y b) observada a 630X 45
- Figura 37.** Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X, donde se aprecia en la primera imagen un conjunto de células inviables con orgánulos más fluorescentes que el resto de la célula y en la segunda imagen se observan células inviables (verdes) con orgánulos más deslumbrantes y b) observada a 1000X. En este caso se ha perdido coloración, por lo que solo se aprecian verde algún orgánulo, quedando el resto de célula de un color anaranjado..... 46
- Figura 38.** Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 4) a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X formada por células inviables con orgánulos más deslumbrantes que el resto de célula, que dificultan a la hora de enfocar la muestra y b) observada a 1000X, donde se aprecia que a este aumento el verde es muy fluorescente e impide enfocar adecuadamente las células..... 46
- Figura 39.** Muestra térmica procedente del reactor a escala de laboratorio a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X, formada por células inviables con orgánulos verdes más fluorescentes en su interior y b) observada a 1000X, en esta imagen se

ha perdido la coloración, quedando algún orgánulo del interior de la célula verde y el resto de célula de coloración roja.	47
Figura 40. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), a) observada a 400X, formada por un conjunto de células viables y b) observada a 1000X, formada por un conjunto de células donde se aprecia la coloración verde de un orgánulo en el interior de las células y el resto de célula roja	47
Figura 41. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 3) a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), a) observada a 400X, donde se aprecian células en su mayoría viables y alguna célula inviable donde destaca el color verde más intenso de algún orgánulo en el interior de las células y b) observada a 630X donde se aprecian células viables.....	48
Figura 42. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala de laboratorio a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), a) observada a 400X donde se aprecian células viables y b) observada a 400X, viéndose células verde poco visibles debido a la pérdida de coloración tras la exposición prolongada a la luz del microscopio.	48
Figura 43. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), a) observada a 400X, donde se aprecia un conjunto de células inviables con orgánulos de un color más fluorescente y b) observada a 1000X, donde se ven los orgánulos del interior de la célula de color más deslumbrante que el resto de la célula	49
Figura 44. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 3) a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), a) observada a 400X donde se aprecian células inviables con orgánulos más fluorescentes en el interior de la célula y b) observada a 400X donde ya se forman flóculos debido al tratamiento térmico	49
Figura 45. Muestra térmica procedente del reactor a escala de laboratorio a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), a) observada a 400X donde se aprecian células inviables y b) observada a 630X, donde se aprecian células inviables con orgánulos verdes más intenso en su interior.....	49
Figura 46. Pérdida de coloración verde a lo largo del tiempo. Entre cada imagen transcurre el tiempo de 10 segundos.....	50
Figura 47. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a concentración 25:0,1 (25 µL muestra + 0,1 µL Sytox), observadas a 400X. En la imagen a) se observa que la concentración de organismos es la adecuada, las células se visualizan correctamente y no se produce sobretinción, lo mismo ocurre en la imagen b).....	51
Figura 48. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), observadas a 400X. En la imagen a) se observa que la concentración de organismos es la adecuada, las células se visualizan correctamente y no se produce sobretinción, lo mismo ocurre en la imagen b).....	51
Figura 49. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a) a concentración 25:0,1 (25 µL muestra + 0,1 µL Sytox), observada a 400X y b) a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), observada a 400X	52

Figura 50. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a) a concentración 25:0,1 (25 µL muestra + 0,1 µL Sytox), observada a 400X, b) a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), observada a 400X	52
Figura 51. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), observadas a 400X. a) todas las células quedan teñidas de verde-amarillento. En la imagen b) puede apreciarse que comienzan a formarse flóculos.	53
Figura 52. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), observadas a a) 400X, donde se aprecia que la concentración de células es demasiado elevada, impidiendo un buen enfoque de la muestra, aunque todas células llegan a teñirse b) comienzo de formación de un flóculo, observado a 400X.....	53
Figura 53. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), observadas a a) 400X, donde se aprecia que todas las células quedan teñidas, aunque la visualización se ve dificultada debido a la gran cantidad de células presentes y b) flóculo formado por acumulación de células observado a 400X.....	54
Figura 54. Blanco de muestra procedente de fango y agua, dilución 1:50, observado a 400X..	56
Figura 55. Muestra procedente de fango con agua, con sytox 50:0,1 (50 µL de muestra y 0,1 µL de Sytox), dilución 1:50, concentración 5,38 µL Sytox/mg SST, observada a 400X.....	56
Figura 56. Blanco de muestra procedente de fango con algas, dilución 1:50, observada a 400X	57
Figura 57. Muestra procedente de fango con algas con Sytox 50:0,1 (50 µL de muestra y 0,1 µL de Sytox), dilución 1:50, concentración 5,54 µL Sytox/mg SST, observada a 400X.....	57
Figura 58. TRC y TRH en el FBR 4 para el periodo de estudio comprendido entre el 10/04/2014 y el 14/07/2014	63
Figura 59. Esquematización del proceso de operación del FBR 4.....	64
Figura 60. Periodos y condiciones de operación observados.....	64
Figura 61. a) Densidad celular y b) % de abundancia en el FBR 4 para el periodo de estudio comprendido entre el 10/04/2014 y el 14/07/2014.....	65
Figura 62. % Viabilidad en el FBR 4 para el periodo de estudio comprendido entre el 10/04/2014 y el 14/07/2014.....	65
Figura 63. Periodos de similares condiciones de operación y resultados obtenidos.	67

Índice de Tablas

Tabla 1. Ensayos de evaluación de Viabilidad.....	5
Tabla 2. Condiciones recomendadas para teñir células con Sytox Green	8
Tabla 3. Concentración y dilución de muestra para el cálculo de la densidad celular óptima...	15

Tabla 4. Pruebas de concentración de Sytox realizadas	16
Tabla 5. Pruebas a diferente concentración de SST.....	16
Tabla 6. Experimentos realizados	19
Tabla 7. Características de los filtros ópticos en el microscopio de epifluorescencia Leica DM 2500.....	21
Tabla 8. Pruebas realizadas para el cálculo del tiempo de incubación.....	31
Tabla 9. Relación entre la concentración de SST y el número de células visible en cada concentración.....	36
Tabla 10. Resumen de las pruebas a distinta relación Volumen de muestra/Volumen de Sytox, para muestras sin tratamiento y muestras térmicas	50
Tabla 11. Relación entre la concentración de SST y la concentración de Sytox elegida	54
Tabla 12. Valores establecidos de los parámetros objeto de estudio	55
Tabla 13. Correlación estadística entre la absorbancia a 680 nm y 750 nm y los SST y SSV	58
Tabla 14. Error sistemático y error aleatorio de las pipetas Eppendorf Research	59
Tabla 15. Error sistemático y error aleatorio de las pipetas Socorex Acura 825	59
Tabla 16. Error sistemático y error aleatorio causado por las pipetas	59
Tabla 17. Pruebas realizadas para el cálculo de la incertidumbre causada por la repetitividad	60
Tabla 18. Errores producidos a lo largo del proceso de medición.....	61
Tabla 19. Media, desviación típica, coeficiente de variación (CV) y percentil 50 (P50) para los recuentos de los distintos organismos presentes en las muestras con la cámara Neubauer (1) y las membranas de policarbonato (2).	61
Tabla 20. Resultados obtenidos del análisis de la varianza (ANOVA).....	62

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Volumen de muestra contenido en cada recuadro mediano.....	23
Ecuación 2. Número de células por litro de muestra.....	23
Ecuación 3. Porcentaje de células vivas en cada muestra	23
Ecuación 4. Porcentaje de células muertas en cada muestra.....	23
Ecuación 5. Coeficiente de correlación de Pearson	26
Ecuación 6. Media aritmética	28
Ecuación 7. Varianza	28
Ecuación 8. Desviación típica	29
Ecuación 9. Varianza combinada	29
Ecuación 10. Incertidumbre típica combinada	29

Abreviaciones

ET: Eucariotas Totales

FBR: Fotobioreactor

FBR 1: Fotobioreactor 1

FBR 2: Fotobioreactor 2

FBR 3: Fotobioreactor 3

FBR 4: Fotobioreactor 4

SST: Sólidos suspendidos totales

SSV: Sólidos suspendidos volátiles

TM: Tanque de Membranas

1. Introducción

1.1. Importancia de las microalgas para el tratamiento de aguas

El uso de cultivos de algas para el tratamiento de aguas residuales y producción de biomasa comenzó hace más de 75 años. El tratamiento de las aguas residuales con cultivos de microalgas es interesante debido a la capacidad fotosintética de estos organismos que permite la conversión de la energía solar en biomasa útil y la incorporación de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo para su crecimiento, evitando así vertidos que puedan causar eutrofización (De la Noüe y De Pauw, 1988; Tam y Wong, 1995). Además estos organismos exhiben capacidad para eliminar metales pesados (Rai *et al.*, 1981) y algunos compuestos tóxicos orgánicos (Redalje *et al.*, 1989), evitando la contaminación secundaria.

Las algas son utilizadas en el tratamiento de aguas residuales para varios objetivos, como son la eliminación de bacterias coliformes, reducción tanto de la demanda química de oxígeno como de la demanda biológica, eliminación de N y/o P, y también para la eliminación de metales pesados. Los principales géneros utilizados con estos fines son *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium* y *Golenkinia* (Abdel-Raouf *et al.*, 2012.).

Además también pueden utilizarse para el tratamiento de desechos de ganadería, desechos agro-industriales, desechos industriales, efluentes de granjas, efluentes de fábricas de industria alimenticia y otros desechos agrícolas.

El cultivo de microalgas para la depuración de aguas se ha utilizado como un proceso de tratamiento terciario. Éste parece funcionar bien en comparación con los procesos químicos, que en general son demasiado costosos para ponerlos en práctica en la mayor parte de sitios.

El interés por los cultivos de microalgas se deriva del hecho de que los procesos de tratamiento convencionales sufren algunas desventajas importantes: (a) eficacia variable dependiendo del nutriente a eliminar; (b) funcionamiento costoso; (c) procesos químicos que a menudo conducen a la contaminación secundaria; y (d) pérdida de nutrientes potenciales valiosos (N, P) (De la Noüe, *et al.*, 1992).

1.2. Características básicas de las microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos adaptados a vivir en suspensión en la columna de agua (Reynolds, 2006). Engloba a organismos unicelulares planctónicos tanto de aguas dulces como de ecosistemas marinos.

La mayoría de las microalgas son autótrofas fotosintéticas, es decir, contienen pigmentos que les permiten fijar la energía solar mediante la fotosíntesis y convertir el carbono inorgánico a formas de energía transferibles a otras partes de la cadena trófica. Constituyen la base de las cadenas tróficas pelágicas y por lo tanto cualquier cambio cuantitativo o cualitativo puede

afectar a la dinámica de los niveles tróficos superiores debido a la variabilidad en su biomasa y producción (Shiah *et al.*, 1996).

Las microalgas presentan gran diversidad desde el punto de vista morfológico, de reproducción y tamaño. Sieburth *et al.* (1978) establecieron un sistema claro y lógico, con límites que corresponden a tres órdenes de magnitud en el tamaño de los microorganismos que forman parte del plancton marino: el picoplancton (de 0,2 a 2 μm), el nanoplancton (de 2 a 20 μm) y el microplancton (de 20 a 200 μm).

La composición y abundancia de las microalgas depende de los siguientes factores:

- Condiciones físicas e hidrológicas: luz, necesaria para el desarrollo y crecimiento; temperatura, puesto que determina las tasas metabólicas de los organismos; turbulencia/estabilidad del agua; tiempo de residencia del agua y tasa de sedimentación del plancton.
- Composición química del agua: nutrientes, no solo la presencia de determinados nutrientes sino la forma en que estos aparezcan, pH, oligoelementos, etc...
- Factores biológicos: depredación por parte de filtradores planctófagos (zooplancton y peces), relaciones entre especies (efectos aleopáticos y toxicidad inducida por algunas especies) y parasitismo fúngico, infecciones por parte de hongos y cromistas heterótrofos flagelados capaces de reducir densas poblaciones de microalgas.

1.2.1. Grupos de microalgas estudiados

Las algas no constituyen hoy día una categoría taxonómica. Sin embargo sigue siendo útil para agrupar organismos muy diversos, tanto procariotas, que no presentan orgánulos celulares delimitados por membranas, como eucariotas, que sí los presentan.

Para la ordenación sistemática de las algas se utilizan como caracteres básicos los caracteres químicos como la composición de pigmentos fotosintéticos, las sustancias de reserva que acumulan, el tipo de pared celular y caracteres citológicos como la ultraestructura celular, especialmente las características de los cloroplastos y su origen endosimbótico. Las clasificaciones están apoyadas por la genética molecular y en especial la interpretación de las secuencias de bases del ARN ribosómico del cloroplasto.

Dentro de los organismos procariotas, las algas están representadas por la división, Cyanobacteria.

- División Cyanobacteria:

Pertenecen al Reino Monera, con un elevado número de especies englobadas en tres órdenes principales Oscillatoriales, Nostocales, y Chroococcales. Son organismos unicelulares con morfología cocoide o filamentosa que pueden crecer en colonias o filamentos envueltos por vainas gelatinosas. No presentan núcleo ni sistema interno de membranas, realizan la fotosíntesis oxigénica y algunas de ellas tienen fuentes de poder reductor diferentes al agua, como el ácido sulfhídrico H_2S .

Contienen clorofila *a* y ficobilinas (ficoeritrinas y ficocianinas) asociadas a ficobilisomas. Algunos géneros, pueden liberar toxinas y como sustancia de reserva presentan el almidón de cianofíceas, gránulos de polifosfatos o de cianoficina.

Son importantes en el ciclo del nitrógeno dado que son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico a formas orgánicas de nitrógeno, en unas células especiales llamadas heterocistes.

Dentro de los grupos eucariotas, se distinguen dos divisiones de organismos: División Chromophyta y División Chlorophyta (Tomas, 1997).

Todas las clases pertenecientes a la división Chromophyta se caracterizan por tener clorofila *a*, pigmentos accesorios y a veces clorofila *c*, y estar desprovistos de clorofila *b*. En la división Chlorophyta todos los grupos poseen clorofila *a* y *b* y pigmentos accesorios.

A continuación se describen los grupos eucariotas de microalgas estudiados en este trabajo.

- División Chromophyta, Clase Bacillariophyceae:

Las Baciliarofíceas, también llamadas diatomeas, constituyen la clase más numerosa con más de 20.000 especies bentónicas y planctónicas, tanto de agua dulce como marina. Se dividen en dos grandes clases, las céntricas y las pennadas.

Las diatomeas son unicelulares, constituyendo en algunos casos, colonias de aspecto filamentosas, carecen de flagelos y su tamaño oscila entre 5 y 200 μm , aunque algunas especies alcanzan los 2 mm. Poseen una envoltura rígida y translúcida de sílice y restos de otras sustancias, como azúcares, aminoácidos y ácido urónico denominada frústula. Las paredes, que no contienen celulosa, están constituidas por dos mitades o valvas, la de mayor tamaño constituye la epitoca, y cubre a la valva menor o hipoteca (Round *et al.*, 1990).

Los pigmentos mayoritarios son clorofila *a*, *c1* y *c2*, β , β -caroteno, fucoxantina, diatoxantina y diadinoxantina. El rápido crecimiento en general de las diatomeas asegura que sean las primeras en aparecer en la columna de agua después de un enriquecimiento en nutrientes.

En la Figura 1 se muestra una imagen de una célula diatomea observada en una de las muestras de estudio.

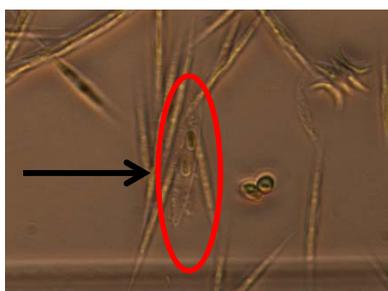


Figura 1. Diatomea observada a 400X.

- División Chlorophyta, Clase Chlorophyceae:

La clase Clorofíceas, también llamadas algas verdes, es uno de los mayores grupos de algas tanto en forma como en número, con medios de vida muy diversos: agua dulce, marina, salobre, planctónico, bentónico, simbiosis con líquenes, etc. Dentro de esta clase existe una gran diversidad de organismos.

Se caracterizan por tener clorofila *a* y *b*, α , β y Ψ caroteno, xantofilas violaxantina y neoxantina. Las células presentan pared de celulosa, a veces puede haber depósitos de sílice, quitina, esporopolenina y calcio. La dotación flagelar más común es de 2 pudiendo aparecer células con 4 y hasta 8 flagelos. Se pueden encontrar organismos unicelulares libres con formas cocoides (g. *Chlorococcum*) o formando colonias (g. *Pediastrum*).

En este estudio, dentro de esta división y clase, se han encontrado células del género *Monoraphidium* (Figura 2 a) y del género *Scenedesmus* (Figura 2 b).

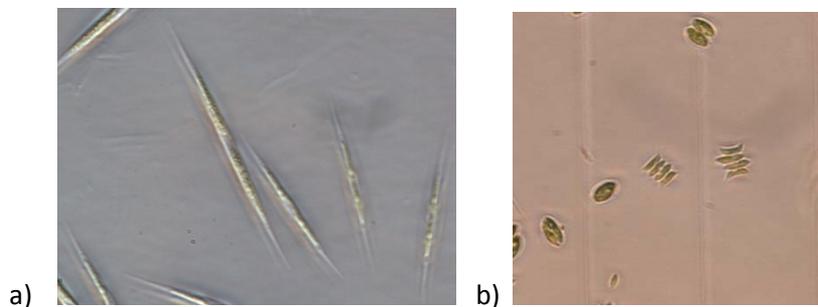


Figura 2. a) *Monoraphidium* observados a 1000X y b) *Scenedesmus* libres y formando colonias, observados a 400X

1.3. Viabilidad celular

Conocer la viabilidad de las microalgas es crucial para optimizar los procesos de tratamiento de agua. La viabilidad hace referencia a aquellas células que tienen la habilidad de crecer activamente y duplicarse. La determinación de esta actividad (crecimiento y duplicación) así como de la integridad celular se realiza mediante diferentes métodos que permiten distinguir entre células metabólicamente activas y células inactivas, y entre células que mantienen la integridad de sus componentes celulares, principalmente membrana plasmática, de las que no.

1.4. Métodos de medida de la viabilidad celular

Existen varias técnicas para evaluar la viabilidad celular que se pueden utilizar tanto en células de cultivo como en células cultivadas en presencia de un compuesto más o menos citotóxico (ensayos toxicológicos). Entre los métodos de laboratorio para estudiar la viabilidad celular destacan la evaluación de la integridad de la membrana celular, los ensayos funcionales, los ensayos de viabilidad a través de biosensores de fluorescencia, los estudios de morfología celular, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X, y las técnicas de determinación de la expresión genética mediante microarrays (Tabla 1).

Tipo de Ensayo	Método de evaluación
Evaluación de la integridad de la membrana	Basados en colorantes o sustancias fluorescentes Basados en tinciones catiónicas Basados en la determinación de liberación de moléculas
Ensayos funcionales	Medición del ATP Tasa de ADN Síntesis de proteínas
Ensayos con fluorescencia	Utilización de biosensores de fluorescencia
Ensayos morfológicos	Basados en la observación microscópica
Microscopía electrónica analítica	Microanálisis por energía dispersiva de rayos X
Determinación de la expresión génica global	Microarrays de ADN Complementario (ADNc) Microarrays de oligonucleótidos

Tabla 1. Ensayos de evaluación de Viabilidad.

Métodos de evaluación de la integridad de la membrana celular

Estos métodos presuponen que una célula viable tendrá su membrana intacta mientras que una célula inviable tendrá la membrana celular alterada, por lo que permitirá el paso de moléculas que en condiciones normales no se difundirían o, por el contrario, no permitirá el paso de moléculas que en condiciones normales atravesarían la membrana.

- Métodos basados en la utilización de colorantes orgánicos o sustancias con propiedades de fluorescencia.

Se dividen en ensayos de exclusión y de inclusión. Entre los primeros, dentro de los colorantes con propiedades fluorescentes, se encuentran los colorantes orgánicos como el azul de tripán, eosina, rojo congo y eritrosina B, así como el yoduro de propidio o el bromuro de etidio. Los ensayos de inclusión evalúan la integridad de la membrana celular, siendo los más utilizados el diacetato de fluoresceína, o la calceína. Estos atraviesan la membrana plasmática, se hidrolizan por las esterasas y dan lugar a fluorescencia dentro de la célula, siempre que ésta se encuentre en estado funcional.

- Métodos basados en la utilización de tinciones catiónicas.

Basados en tinciones fluorescentes catiónicas que miden los cambios del potencial de membrana de las células mediante microfluorimetría. Uno de ellos, el éster de rodamina, cuando penetra en la célula es enormemente fluorescente. Éste no penetra en la célula dañada, por lo que la fluorescencia en estos casos es extracelular. El contraste entre la fluorescencia intracelular y la extracelular es lo que se mide.

- Métodos basados en la determinación de la liberación de moléculas en el medio extracelular

Se distinguen entre los que se basan en la detección de enzimas intracelulares, los basados en la determinación de ácidos nucleicos o aquellos que se basan en la detección del cromó radioactivo, isótopo que se une a los aminoácidos básicos de las proteínas intracelulares. De este modo, niveles elevados de enzimas intracelulares, de ADN o de cromó radioactivo en el medio de cultivo, indican que un porcentaje significativo de células presentan sus membranas lisiadas, estando comprometida la viabilidad celular (Coco-Martín *et al.*, 1992; Da Costa *et al.*, 1999; Posadas *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008).

Ensayos funcionales

Evalúan los componentes metabólicos que son necesarios para el crecimiento celular bajo la premisa de que el daño celular produce una pérdida en la producción y almacenamiento de la energía necesaria para el crecimiento y metabolismo celular. Estos ensayos pueden medir los niveles totales de trifosfato de adenosina (ATP), la tasa de ADN o la síntesis de proteínas.

Biosensores de fluorescencia

Miden la dinámica molecular de macromoléculas, metabolitos e iones en células vivas con una gran resolución temporal y espacial. Los biosensores son proteínas marcadas mediante fluorescencia que miden reacciones químicas específicas. Cuando el biosensor se encuentra dentro de una célula viva, el componente proteico del biosensor puede activarse. Una vez activado, la molécula fluorescente unida a este componente proteico traduce los cambios ambientales en señales fluorescentes en la proximidad del lugar. Estas señales fluorescentes son detectadas por un sistema con una enorme resolución temporal y espacial. Como la activación proteica es reversible, estos biosensores pueden ser reutilizados (Gerstein *et al.*, 1994; Giuliano y Post, 1995; Giuliano y Taylor, 1998).

Ensayos morfológicos

Se basan en cambios morfológicos que ocurren en la superficie celular o en el citoesqueleto relacionados con la viabilidad celular (Beattie *et al.*, 1994). Cambios de volumen irreversibles pueden indicar la muerte celular. Si éste disminuye, puede indicar la pérdida de proteínas o iones intracelulares, o una alteración de la permeabilidad para el sodio o el potasio (Allen, 1988). Estos cambios son difíciles de medir, por lo que otros ensayos conjuntos de evaluación de integridad de la membrana, como los ensayos funcionales, nos pueden aportar mayor información.

Microanálisis por energía dispersiva de rayos X

Una de las técnicas más sensibles para determinar la viabilidad de las células en cultivo es la cuantificación del contenido iónico, especialmente del potasio y del sodio (Rodríguez-Morata *et al.*, 2008). La concentración intracelular de esos iones se correlaciona bastante bien con el estado vital celular y es un excelente marcador de la fisiología celular y de la viabilidad celular (Zierold, 1997; Fernández-Segura *et al.*, 1999; Roomans, 2002;). El microanálisis por energía dispersiva de rayos X asociada a la microscopía electrónica supone una potente herramienta

para cuantificar los elementos de una muestra, al mismo tiempo que se consigue determinar la concentración de los mismos y la ultraestructura de las células (Vanthanouvong, et. al, 2003; Warley, 1997). Esta técnica permite el análisis simultáneo de todos los cationes y aniones con número atómico inferior o igual a 11 (Warley et. al., 1994; Rodríguez-Morata et. al., 2008) así como estudiar la composición química de la muestra de forma simultánea a su observación microscópica (Carini et. al., 1995; Carini et. al., 1997; Carini et. al., 2000). Para determinar la composición iónica de una muestra se hace incidir un haz de electrones acelerados sobre la superficie de la misma, produciéndose la ionización de los átomos de la misma. Cuando un átomo se encuentra ionizado, otro electrón de la capa más externa pasa a la capa deficitaria, liberando energía que se manifiesta en forma de radiación electromagnética (rayos X); esta energía es característica para cada átomo, por lo cual también lo es para cada elemento. Mediante el registro del espectro de radiación X emitida se puede identificar los elementos que conforman una determinada muestra.

Determinación del perfil de expresión génica mediante microarrays.

El Microarrays (Chip de AND) es una técnica que permite la evaluación simultánea de un importante número de genes en un único experimento (Gress *et al.*, 1992; Friemert *et al.*, 1998). La determinación del perfil de expresión génica sirve para estudiar algunas propiedades de las células. De este modo se puede evaluar la viabilidad celular mediante la identificación de genes relacionados con la muerte celular (Wong *et al.*, 2006).

1.5. Método de análisis de Viabilidad mediante Sytox

Las técnicas a base de fluorescencia proporcionan métodos alternativos para ensayos de viabilidad y permiten dar medidas rápidas y directas. Un nuevo método para realizar análisis de viabilidad rápido y eficaz consiste en utilizar tinte Sytox. El tinte Sytox Green de ácidos nucleicos (Invitrogen S7020) es un tinte con alta afinidad por los ácidos nucleicos, que fácilmente penetra en las células con la membrana plasmática rota y no atraviesa las membranas de las células vivas.

Después una breve incubación con tinte de ácidos nucleicos Sytox Green, los ácidos nucleicos de las células muertas se ven verde fluorescente brillante cuando son excitados a 488 nm en la línea espectral del argón, o cualquier otra fuente de 450-490 nm. Estas propiedades, combinadas con su aumento de fluorescencia sobre los ácidos nucleicos, hacen del tinte Sytox Green un indicador de las células inviables simple y cuantitativo, de un solo paso, para el empleo con microscopios de fluorescencia, fluorómetros, lectores de fluorescencia en microplatos, y citómetros de flujo.

Este tinte de las células inviables se puede utilizar en conjunción con etiquetas de fluorescencia superficiales rojas o azules (moléculas o reactivos que se unen químicamente a una región específica de las células) para análisis multiparámetro. También es posible combinar el Sytox Green con DAPI (C₁₆H₁₅N₅, marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas de Adenina y Timina en secuencias de ADN) o con tinte rojo fluorescente, para la visualización de células viables e inviables en dos colores. Sytox Green es también un contra-tinte de ADN para el etiquetaje del cromosoma y para células fijas y tejidos.

En la Figura 3 se muestran células teñidas mediante Sytox donde aparecen con coloración verde (células inviables) y con coloración roja (células viables).

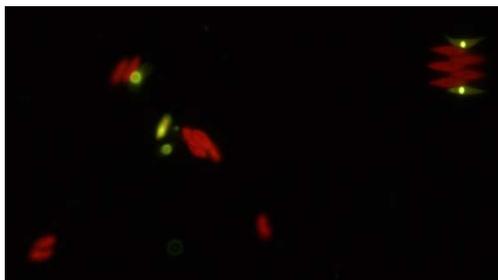


Figura 3. Imagen de células teñidas mediante Sytox, donde se aprecian con coloración verde aquellas en las que ha penetrado el tinte y con coloración roja aquellas en las que no ha penetrado.

El tipo de célula, el medio de crecimiento, la densidad de la célula, la presencia de otros tipos de células, y otros factores pueden influir en la tinción con este reactivo (Tabla 2).

Tipo de células	Concentración de Sytox	Condiciones de Incubación
Bacterias	0,5 - 5 uM	Incubación < 5 Minutos en un vortex para mezcla
Levaduras	1 - 50 uM	Incubación < 10 minutos con agitación periódica
Otras Eucariotas	10 nM - 1 uM	Incubación < 10 minutos

Tabla 2. Condiciones recomendadas para teñir células con Sytox Green

Las células teñidas con tinte Sytox Green pueden ser observadas con un microscopio de fluorescencia equipado con un juego de filtros de fluorescencia estándar. Las células eucariotas teñidas generalmente tendrán los núcleos verdes brillantes así como alguna mancha de bajo nivel en el citoplasma. Las bacterias, generalmente se tiñen uniformemente una vez que el tinte intracelular está en equilibrio con la muestra que se tiñe.

La intensidad de la fluorescencia generada por el Sytox depende del grosor de la pared celular, que a su vez depende de la edad y es una función de la fase ontogenética de las células. Por lo general la fluorescencia más brillante se registra en células maduras (Pouneva, I. 1997).

Por último, cabe señalar que la tinción con Sytox no enmascara aquella autofluorescencia debida a la clorofila, y por tanto la fluorescencia del Sytox y la autofluorescencia pueden ser utilizadas simultáneamente como identificadores de viabilidad celular (Sato *et al.*, 2004).

2. Objetivos

El desarrollo de este trabajo tiene como objetivo principal poner a punto el método para la determinación de la viabilidad de microalgas utilizando la tinción con Sytox Green, en muestras procedentes de dos tipos de sistemas. Uno de estos es una planta piloto formada por cuatro fotobiorreactores (FBR) semicontínuos para el tratamiento de agua residual, tras un tratamiento anaerobio, y el otro es una planta de laboratorio que consiste en un reactor con modo de operación semicontínuo.

Los objetivos específicos que se persiguen se describen a continuación:

- Establecer la concentración óptima de reactivo Sytox y concentración de SST para muestras procedentes de los dos sistemas.
- Establecer el tiempo de incubación óptimo para que el Sytox llegue a teñir todas las células inviables.
- Establecer la concentración de SST a la cual los recuentos se realicen satisfactoriamente.
- Determinación del error sistemático y aleatorio, así como de la incertidumbre propia del método.
- Comprobación del funcionamiento del método puesto a punto con muestras de diferente procedencia.
- Comparación del método de análisis mediante Sytox con el método de epifluorescencia sobre membranas de policarbonato.
- Análisis de la viabilidad de las poblaciones de microalgas y su relación con la eliminación de nutrientes, en un FBR durante el periodo comprendido entre el 10/04/2014 y el 14/07/2014 mediante el método desarrollado.

Con todo ello se pretende disponer de un método rápido, fácil, económico y fiable que permita realizar el seguimiento de la viabilidad de los cultivos de microalgas que intervienen en tratamientos de las aguas residuales.

3. Material y Métodos

3.1. Reactivo utilizado: Sytox Green, tinte de ácidos nucleicos

El reactivo utilizado para observar la viabilidad de las algas es Sytox Green Tinte de ácidos nucleicos (Invitrogen S7020). Este tinte se caracteriza por su gran afinidad con los ácidos nucleicos. En células con la membrana plasmática dañada el reactivo puede penetrar fácilmente por las mismas y unirse a los ácidos nucleicos dando una coloración verde característica cuando se irradia con una luz de longitud de onda entre 450-490 nm. Esto se debe al hecho de que las paredes de las células inviables pierden su integridad y semipermeabilidad y el tinte se acumula en las células. Cuando esto sucede el citoplasma celular también puede sufrir una tinción suave. Por el contrario, en células con las membranas intactas esta reacción no sucede y muestran la autofluorescencia natural propia de los pigmentos fotosintéticos que es de color rojo bajo una luz de 450-490 nm. Esta coloración verde-rojo permite diferenciar las células viables de las no viables.

La tinción celular con el Sytox Green depende de varios factores citológicos como el grosor de la pared celular o la fase ontogenética (Pouneva, 1997) por lo que todas las células no quedarán teñidas de la misma manera. Las células vivas, en buen estado e integridad muestran coloración roja debida a la clorofila (autofluorescencia). Las células no viables (muertas) se tiñen completamente de verde brillante (fluorescencia verde solo del Sytox) y las células senescentes muestran fluorescencia verde-marrón debido a la fluorescencia verde del Sytox más la autofluorescencia (Sato *et al.*, 2004).

En la Figura 4 se muestran conjuntos de células donde se aprecia coloración verde (células no viables), coloración roja (células viables) y coloración verde-marrón (células dañadas o senescentes)

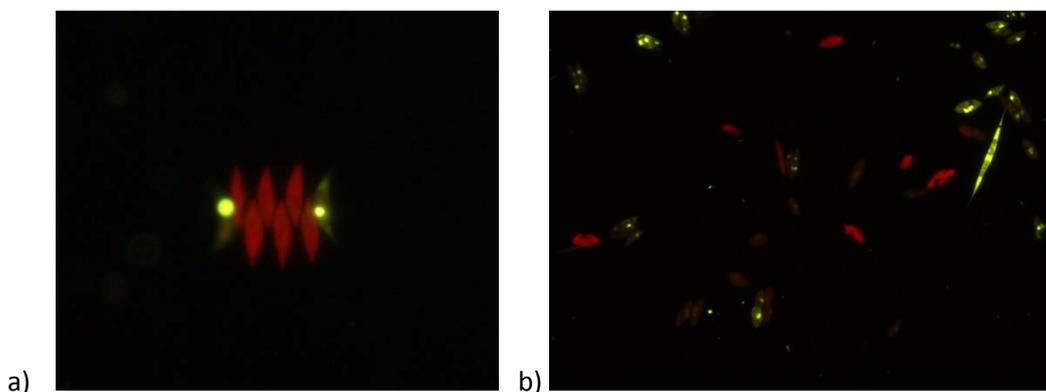


Figura 4. Imágenes de a) *Scenedesmus* formado por 2 células no viables en los extremos de la colonia y 6 células vivas (rojas), observado a 400X, b) conjunto de células vivas, dañadas e inviables, 400X

3.2. Muestras Estudiadas

Las muestras utilizadas para el estudio de la viabilidad celular proceden de dos sistemas distintos. Uno de estos es una planta piloto formada por cuatro fotobioreactores (FBR) semicontinuos para el tratamiento de agua tras un tratamiento anaerobio, y el otro es una planta de laboratorio que consiste en un reactor con modo de operación semicontínuo. Ambos sistemas derivan de un cultivo inicial de algas procedente del decantador secundario de la estación depuradora de aguas residuales de la Cuenca de Carraixet.

Además, como pruebas confirmatorias de que el método funciona con distintos tipos de muestras, se utiliza muestra procedente de botellas en las que se han realizado ensayos de biodegradabilidad anaerobia (Apartado 3.2.3.). Estos ensayos se realizaron a 35°C con un fango procedente de un digestor mesófilo convencional, en concreto del digestor anaerobio de la EDAR de Carraixet. Se dispone de dos muestras de fango, una de ellas, que se utilizará como blanco, se mezcló con agua, y la otra con algas, todo ello antes de realizar el ensayo.

3.2.1. Planta Piloto

La planta piloto de post tratamiento de agua tras un tratamiento anaerobio, está ubicada en la EDAR de la Cuenca del Carraixet, situada en Alboraya (Valencia). La EDAR recibe principalmente las aguas residuales domésticas de las poblaciones próximas a la Cuenca del Carraixet incluyendo también aguas residuales de tipo industrial.

El agua afluyente a la planta piloto viene de una planta anaerobia con sistema de membranas. Esta agua no contiene sólidos suspendidos, la DQO es muy baja y muestra valores de P_PO₄ de 5 a 8 mg/L y de N_NH₄ de 40 a 60 mg/L.

La planta piloto está formada por dos líneas de agua. El agua a tratar entra en la planta a través de dos bombas y se almacena en un depósito que distribuye el agua a cada línea (D1). A continuación este agua pasa a unos fotobioreactores (FBR), 2 por cada línea, donde se encuentra el cultivo de microalgas. Cada FBR tiene una capacidad de 500 L y son de metacrilato para que la luz pueda penetrar en ellos (Figura 5). Los FBR están aireados, logrando una concentración de O₂ entre 8-10 mg/L y un pH de 7,5. El pH se controla mediante la inyección automatizada de CO₂. Estos FBR tienen un rebosadero a partir del cual el agua sale y es enviada a otro depósito (D2). El D2 dispone de dos bombas, una bomba de desplazamiento horizontal, y una bomba *airlift* (bomba de aire comprimido) que envían el agua desde el D2 (cada bomba se encarga de enviar el agua procedente de una de las líneas) hacia los tanques de membranas (TM). En ambos tanques de membranas se produce la filtración a través de las membranas que separan el agua de las algas presentes en ella. Las membranas permiten trabajar con un tiempo de retención celular (TRC) y un tiempo de retención hidráulico (TRH) diferentes. Las condiciones de operación en el periodo de realización de las pruebas son una purga manual una vez al día en ambas líneas y un TRC = TRH de 11 días para una de las líneas y TRC = TRH de 5,5 días para la otra línea. En la Figura 6 se muestra un esquema de la planta piloto.



Figura 5. Planta piloto ubicada en la EDAR de la Cuenca del Carraixet

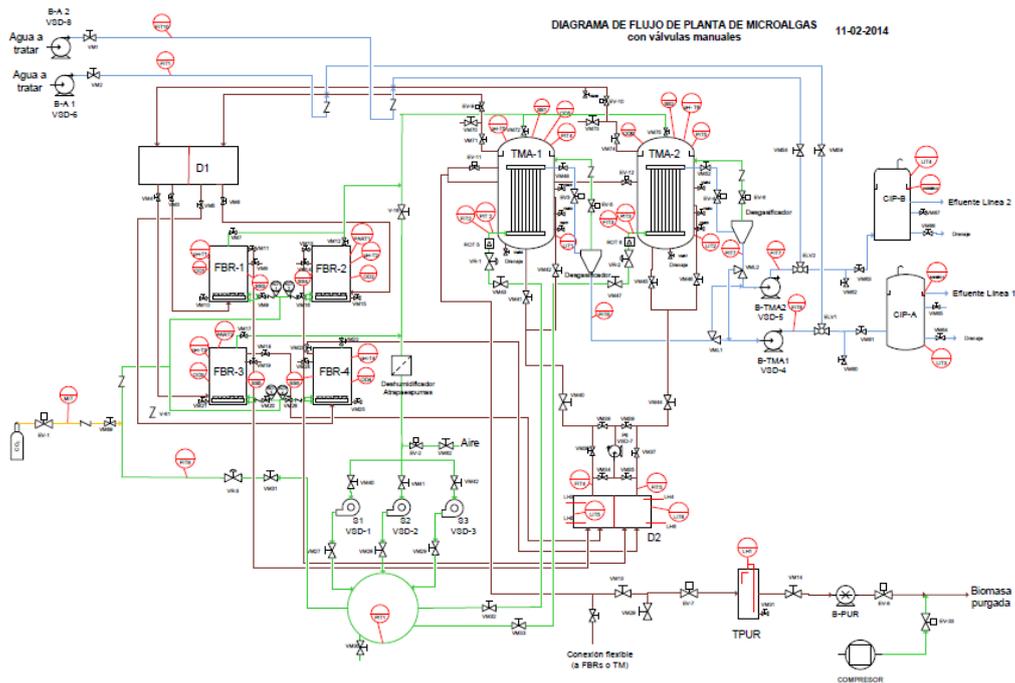


Figura 6. Esquema de la planta piloto ubicada en la EDAR de la Cuenca del Carraixet

3.2.2. Planta de Laboratorio

Se trata de un reactor semicontínuo a escala de laboratorio (Figura 7) ubicado en el Departamento de Ingeniería Química de la Universitat de València. El reactor de laboratorio tiene una capacidad de 8L y se encuentra rodeado de 12 luces Sylvania grolux, que emiten radiación electromagnética luminosa cuya longitud de onda está comprendida entre 380 y 780 nm. Esta luz se utiliza para favorecer el crecimiento de las algas. El reactor está en continua aireación y el pH se controla mediante la inyección automatizada de CO₂ para que se mantenga en valores de 7,5. Las condiciones de operación en el periodo de realización de las pruebas son una temperatura de 21 °C, luz de 49,4 E/m², tiempo de retención hidráulica (TRH) y Tiempo de retención celular (TRC) de 8 días y una alimentación en semicontinuo de 0,25 L cada 6 horas, (en total 1 L al día).

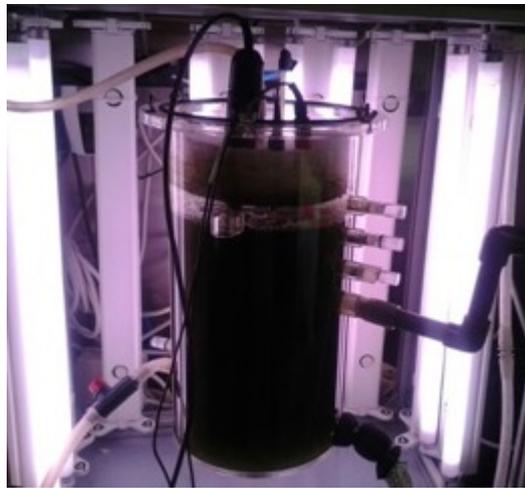


Figura 7. Reactor de Laboratorio

3.2.3. Ensayos de biodegradabilidad anaerobia en botella

Los ensayos se realizan a 35 °C con fango procedente del digester anaerobio de la EDAR de Carraixet. Se trata de ensayos en discontinuo.

Estos ensayos tuvieron una duración de 40 días, se realizan dentro de la tesis doctoral “ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA RECUPERACION COMO BIOGAS DE LA ENERGIA DE LA MATERIA ORGANICA Y NUTRIENTES DEL AGUA RESIDUAL, ACOPLANDO UN ANBRM Y UN CULTIVO DE MICROALGAS”.

Se calcula la viabilidad de las algas que aparecen en el ensayo para comprobar de forma microbiológica la degradación que han sufrido dichas algas.

Estas muestras son:

- Botella 1, Blanco: 300 mL de fango del digestor anaerobio de la EDAR del Carraixet y 100 mL de agua. Este tiene una concentración de SST de 18562 mg/L y una concentración de SSV de 10780 mg/L (58,08% de SV). Esta muestra es utilizada como blanco para el estudio realizado en la tesis doctoral.
- Botella 2, Algas: 300 mL de fango del digestor anaerobio de la EDAR del Carraixet y 100 mL de algas. Este tiene una concentración de SST de 18030 mg/L y una concentración de SSV de 10462 mg/L (58,03% de SV).

El hecho de querer saber la viabilidad de las algas es para corroborar si coincide el biogás generado por la digestión de las algas con el porcentaje de algas muertas. La viabilidad del blanco se realiza para comprobar la presencia de algas por contaminación.

En este estudio, estas muestras se utilizan simplemente para realizar pruebas confirmatorias de que el método de determinación de viabilidad mediante Sytox Green funciona con diferentes tipos de muestras.

3.3. Diseño de experimentos

Para el estudio de la viabilidad celular se han realizado una serie de experimentos con el fin de poner a punto el método mediante el uso del Sytox Green, tinte de ácidos nucleicos.

Se han tenido en cuenta 3 variables para la puesta a punto del método; el tiempo de incubación del reactivo, la concentración de SST y SSV de la muestra y la concentración del reactivo Sytox. Además, se considera también el uso de Vectashield (Vector Laboratories, EEUU) como medio de montaje que evita la pérdida de fluorescencia sufrida por las células tras la exposición a la luz del microscopio.

El propósito es encontrar aquellos valores óptimos de estas tres variables que permitan estimar la viabilidad adecuadamente. Para ello se ha realizado un total de 171 pruebas con muestras procedentes de los dos sistemas (planta piloto y planta de laboratorio), así como de muestras de fango tras un tratamiento anaerobio en botellas (controles negativos).

- Tiempo de incubación:

La reacción que se produce al mezclar el reactivo Sytox con la muestra se realiza en oscuridad y es bastante rápida, según fabricante 5-10 minutos (Sytox Green Nucleic Acid Stain, Molecular probes, Invitrogen detection technologies). Se realizan pruebas a dos tiempos distintos de incubación con el objetivo de determinar el tiempo óptimo. Los tiempos de incubación utilizados son de 5 y 10 minutos.

Las pruebas se realizan con muestra sometida a un tratamiento térmico en la unidad de digestión Bloc Digest 20, (P. Selecta) durante 3 horas a la temperatura de 90 °C, para asegurar que todas las células son inviables y por tanto deben teñirse todas de verde. La muestra utilizada tiene una concentración de SST aproximada de 340 mg/L.

- Concentración de sólidos en la muestra:

La concentración de SST en la muestra es un parámetro importante a tener en cuenta porque está relacionado con la densidad celular del cultivo. Valores altos de sólidos en la muestra pueden impedir una correcta tinción de las células. Además pueden dificultar la visión posterior de éstas por la superposición de los organismos en el campo de visión del microscopio. Por el contrario valores bajos de sólidos pueden hacer que no se llegue a alcanzar el número mínimo de células necesario para que el recuento sea representativo. Por todo esto se realizan pruebas que consisten en concentrar y diluir muestras procedentes del reactor a escala de laboratorio con el fin de aumentar la concentración de sólidos y observar si hay suficientes organismos para llevar a cabo el recuento, y que éste sea representativo, o si por el contrario el número de organismos es muy elevado lo que impediría un recuento fiable.

La muestra de partida utilizada tiene una concentración inicial de SST de 360 mg/L. En la tabla 3 se muestran las concentraciones y las diluciones que se han estudiado.

Muestra planta de laboratorio						
Concentración de SST (mg/L)	90	120	180	360	720	1080
	5 ml muestra + 20 ml H ₂ O destilada	5 ml muestra + 15 ml H ₂ O destilada	5 ml muestra + 10 ml H ₂ O destilada		4 ml muestra – 2 ml sobrenadante	6 ml muestra – 4 ml sobrenadante

Tabla 3. Concentración y dilución de muestra para el cálculo de la densidad celular óptima

Estas pruebas se repiten con muestra procedente del sistema a escala de planta piloto (FBR 3) para comprobar si el rango elegido es el óptimo.

- Concentración de Sytox:

La concentración de Sytox a añadir a la muestra es un parámetro importante a la hora de asegurar el proceso de tinción. Por ello se plantea estudiar cual es la concentración óptima del Sytox que asegura que todas las células se tiñen correctamente y se pueden realizar los recuentos adecuadamente.

Según describen Sato *et. al.* 2004 y Gonzalez-Fernandez *et. al.* 2012, la concentración óptima utilizada es de 5 mol.m⁻³ en solución con DMSO. Además, la relación volumen de muestra/volumen de colorante descrita es 1 (0.5 µl muestra/0.5 µl Sytox). Se considera que estos valores para el tipo de muestra objeto de estudio (muestras procedentes de ambos sistemas con una concentración de SST de 360 mg/L) son inadecuados debido a la poca cantidad de muestra (que impide la visualización debido al secado de la muestra antes de la observación al microscopio) y la gran cantidad de Sytox utilizada (producto costoso por lo que debe optimizarse su uso), por ello se plantea realizar pruebas a diferentes concentraciones.

Las pruebas se realizan con muestra procedente de ambos sistemas, con una concentración de SST aproximada de 360 mg/L. A algunas de ellas se les aplicó un tratamiento térmico (3 horas a 90 °C) para asegurar la completa destrucción de las membranas celulares y por tanto cabe

esperar una coloración verde de todas las células. También se dispone de un “Blanco” al que no se le añade ningún reactivo. En la tabla 4 se muestran las pruebas de concentración de Sytox realizadas.

Relación Volumen Muestra por Volumen Colorante (μL muestra/ μL Sytox)	μL Sytox/mg SST	Concentración (μL muestra/ μL Sytox)	Sin Tratamiento (muestra fresca)	Tratamiento Térmico
Blanco		1:0	TM	TM
0,1 μL muestra con 0,1 μL Sytox (1:1)	2777,7	1:1	TM	TM
0,1 μL muestra+50 μL H ₂ O con 0,1 μL Sytox (1:1)	2777,7	1:1		TM
1 μL muestra con 0,1 μL Sytox (1:0,1)	277,7	1:0,1	TM	TM
5 μL muestra con 0,1 μL Sytox (5:0,1)	55,5	5:0,1	TM	TM
10 μL muestra con 0,1 μL Sytox (10:0,1)	27,7	10:0,1	TM, FBR 3, FBR 4	TM, FBR 3
25 μL muestra con 0,1 μL Sytox (25:0,1)	11,1	25:0,1	TM, FBR 3, FBR 4, Reactor de laboratorio	TM, FBR 4, Reactor de laboratorio
50 μL muestra con 0,1 μL Sytox (50:0,1)	5,5	50:0,1	TM, FBR 3, Reactor de laboratorio	TM, FBR 3, Reactor de laboratorio

Tabla 4. Pruebas de concentración de Sytox realizadas

- Concentración de Sytox - Concentración Sólidos Suspendidos Totales (SST):

Se planteó realizar más pruebas con muestras procedentes de la planta piloto para comprobar que, tanto los rangos de SST elegidos como la concentración de Sytox eran las más adecuadas. La muestra de partida tiene una concentración de SST de 356 mg/L. Las pruebas se realizan a dicha concentración y a las concentraciones de 712 mg/L y 1068 mg/L. Además, una réplica de cada una de estas tres muestras es sometida a un tratamiento térmico (3h 90°C), con el fin de destruir completamente la integridad de las membranas. En la tabla 5 se muestran las pruebas realizadas a diferente concentración de Sytox.

	Concentración de la muestra (mg/L)					
	356		712		1068	
	μL muestra: μL Sytox	μL Sytox/mg SST	μL muestra: μL Sytox	μL Sytox/mg SST	μL muestra: μL Sytox	μL Sytox/mg SST
Frescas	25:0,1	11,2	25:0,1	5,6	25:0,1	3,7
	50:0,1	5,6	50:0,1	2,8	50:0,1	1,8
Tratamiento térmico	50:0,1	5,6	50:0,1	2,8	50:0,1	1,8

Tabla 5. Pruebas a diferente concentración de SST

Se realizan pruebas a concentración 25:0,1 y 50:0,1 tanto de las muestras sin tratamiento térmico como de las muestras tras el tratamiento térmico.

- Vectashield:

De forma natural, la exposición de las muestras a la luz del microscopio provoca una pérdida de fluorescencia que puede llegar a dificultar la visualización de la muestra y por tanto el proceso de recuento posterior. Para evitar esta pérdida de fluorescencia se han realizado pruebas con un medio de montaje denominado Vectashield. Para ello se añaden a la cámara Neubauer un cubreobjetos y a continuación una gota de Vectashield junto con otro cubreobjetos. El objetivo es comprobar si la fluorescencia de las células se mantiene y permite la observación de la muestra durante más tiempo.

- Confirmación del funcionamiento del método:

Una vez establecidos los valores de los parámetros que permiten desarrollar y aplicar el método para la determinación de la viabilidad correctamente se comprueba la validez del mismo con un grupo de muestras de distinta procedencia.

Las muestras utilizadas, (Apartado 3.2.3.), están formadas una por 300 mL de fango del digestor anaerobio de la EDAR del Carraixet y 100 mL de agua. Esta muestra tiene una concentración de SST de 18562 mg/L y una concentración de SSV de 10780 mg/L (58,08% de SV).

La segunda muestra está formada por 300 mL de fango del digestor anaerobio de la EDAR del Carraixet y 100 mL de algas. Este tiene una concentración de SST de 18030 mg/L y una concentración de SSV de 10462 mg/L (58,03% de SV).

Para adecuar la muestra a los parámetros establecidos (250-400 mg SST/L) se realiza una dilución 1:50.

En la tabla 6 se muestra un resumen de todos los experimentos realizados donde se indican las variables que se tienen en cuenta en cada experimento.

Parámetro de estudio	Muestra		Tiempo de incubación (min)	Concentración celular (SST(mg/L))	Concentración Sytox (Vol. muestra (µL) - Vol. Sytox (µL))	µL Sytox/mg SST	Vectashield
	Sin tratamiento	Térmica					
Tiempo de incubación		-	5	340	50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	5,8	
		-	10				
Concentración de SST en la muestra	Reactor de laboratorio		5	90			
				120			
				180			
				360			
				720			
				1080			
	FBR 3		5	365			
				730			
				1095			

Concentración de Sytox	TM		5	360	Blanco	-	
					0,1 µL muestra con 0,1 µL Sytox (1:1)	2777,7	
					1 µL muestra + 0,1 µL Sytox (1:0,1)	277,7	
					5 µL muestra + 0,1 µL Sytox (5:0,1)	55,5	
					10 µL muestra + 0,1 µL Sytox (10:0,1)	27,7	
					25 µL muestra + 0,1 µL Sytox (25:0,1)	11,1	
					50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	5,5	
	TM		5	360	Blanco	-	
					0,1 µL muestra + 0,1 µL Sytox (1:1)	2777,7	
					0,1 µL muestra + 50 µL H2O con 0,1 µL	2777,7	
					1 µL muestra + 0,1 µL Sytox (1:0,1)	277,7	
					5 µL muestra + 0,1 µL Sytox (5:0,1)	55,5	
					10 µL muestra + 0,1 µL Sytox (10:0,1)	27,7	
					25 µL muestra + 0,1 µL Sytox (25:0,1)	11,1	
					50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	5,5	
	FBR 3		5	360	10 µL muestra + 0,1 µL Sytox (10:0,1)	27,7	
					25 µL muestra + 0,1 µL Sytox (25:0,1)	11,1	
					50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	5,5	
	FBR 3	FBR 3	5	360	10 µL muestra + 0,1 µL Sytox (10:0,1)	27,7	
					50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	5,5	
	FBR 4		5	360	10 µL muestra + 0,1 µL Sytox (10:0,1)	27,7	
					25 µL muestra + 0,1 µL Sytox (25:0,1)	11,1	
	Reactor de laboratorio	FBR 4	5	360	25 µL muestra + 0,1 µL Sytox (25:0,1)	11,1	
					50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	5,5	

		Reactor de laboratorio	5	360	25 µL muestra + 0,1 µL Sytox (25:0,1)	11,1	
					50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	5,5	
Concentración de Sytox vs Concentración de sólidos	FBR 3		5	356	25 µL muestra + 0,1 µL Sytox (25:0,1)	11,2	
					50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	5,6	
				712	25 µL muestra + 0,1 µL Sytox (25:0,1)	5,6	
					50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	2,8	
				1068	25 µL muestra + 0,1 µL Sytox (25:0,1)	3,7	
					50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	1,8	
	FBR 3		5	356	50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	5,6	
				712	50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	2,8	
				1068	50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	1,8	
Pérdida de fluorescencia			5		50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)		1 gota
Validación del método	Fango con agua biodegradabilidad anaerobia en botella		5	18562	blanco	-	
				18562	50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	5,3	
	Fango con algas biodegradabilidad anaerobia en botella		5	18030	blanco	-	
				18030	50 µL muestra + 0,1 µL Sytox (50:0,1)	5,5	

Tabla 6. Experimentos realizados

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Determinación de Sólidos Suspendidos Totales y Sólidos Suspendidos Volátiles

La concentración de sólidos suspendidos totales (SST) se determina mediante el paso de una muestra a través de un filtro con tamaño de poro de 0.45 µm. Posteriormente, se pesa el material retenido una vez se haya eliminado la humedad a 105°C en una estufa. El incremento en el peso del filtro representa la cantidad de sólidos suspendidos totales en la muestra. Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) y los sólidos suspendidos no volátiles (SSNV) se determinan mediante la calcinación de los sólidos suspendidos totales a 550°C (APHA/AWWA/WEF, 2005).

3.4.2. Determinación de la Absorbancia

La absorbancia se mide con la finalidad de tener una aproximación de la concentración de SST presente en cada muestra en caso de no disponer de los datos reales, debido a que esta concentración puede variar cada día y su cálculo supone 2 días de pruebas. De esta manera se podría ajustar los SST de la muestra al valor de recuento adecuado, sin tener que esperar a que se realice la analítica de SS que tarda más tiempo.

Se miden las absorbancias de las muestras mediante el espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis (Figura 8) con luz pulsante Xenon a las longitudes de onda de 680nm y 750nm. Se realizan dos réplicas de cada muestra, obteniendo como resultado final una media de las dos absorbancias calculadas.



Figura 8. Espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis

3.4.3. Observación en el Microscopio

Una vez preparada la muestra, la observación en el microscopio debe llevarse a cabo en el mismo día.

- **Microscopio de Epifluorescencia Leica DM 2500**

Los recuentos se llevan a cabo por el método de microscopía de epifluorescencia. El microscopio óptico de epifluorescencia utilizado es un Leica DM 2500 (Figura 9) equipado con objetivos de 10X, 40X, 63X y 100X. Además los oculares son 10X consiguiendo un total de 1000 aumentos.

La fuente de luz es una lámpara de mercurio. Antes de incidir sobre la muestra, la luz atraviesa un filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo. Esta luz se refleja en un espejo dicromático (o dicroico) e incide sobre la muestra, excitando así el fluorocromo, que emite fotones de una longitud de onda mayor que la incidente. La luz emitida por la muestra no se refleja sino que atraviesa el espejo dicroico y llega a un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo.

Los filtros de fluorescencia utilizados presentan las siguientes características (Tabla 7):

Rango de excitación	Azul
Filtro de excitación (azul)	BP 450-490
Espejo dicromático (verde)	510
Filtro supresor (rojo)	LP 515

Tabla 7. Características de los filtros ópticos en el microscopio de epifluorescencia Leica DM 2500

El microscopio tiene acoplada una cámara de forma que se pueden tomar imágenes de los campos recontados.



Figura 9. Microscopio óptico Leica DM 2500

- **Cámara Neubauer**

Para el cálculo del número de células por unidad de volumen se utiliza una cámara de conteo. Existen infinidad de cámaras de conteo con una gran variedad de usos, en este caso se utiliza la Cámara Neubauer Laboroptik, que dispone de una cuadrícula de recuento formada por un cuadro central grande con una superficie de 1 mm^2 . El cuadro grande central está dividido en 16 cuadrados medianos de $0,0625 \text{ mm}^2$. Además cada uno de estos a su vez, está dividido en 25 cuadrados pequeños. Al mismo tiempo, la cámara tiene una hendidura en la cual al colocar muestra bajo el cubreobjetos, la suspensión celular alcanza una altura de $0,1 \text{ mm}$.

En las figuras 10 y 11 se muestran imágenes de la cámara Neubauer utilizada y de la cuadrícula de recuento que incluye dicha cámara respectivamente.



Figura 10. Cámara Neubauer Labor Optik

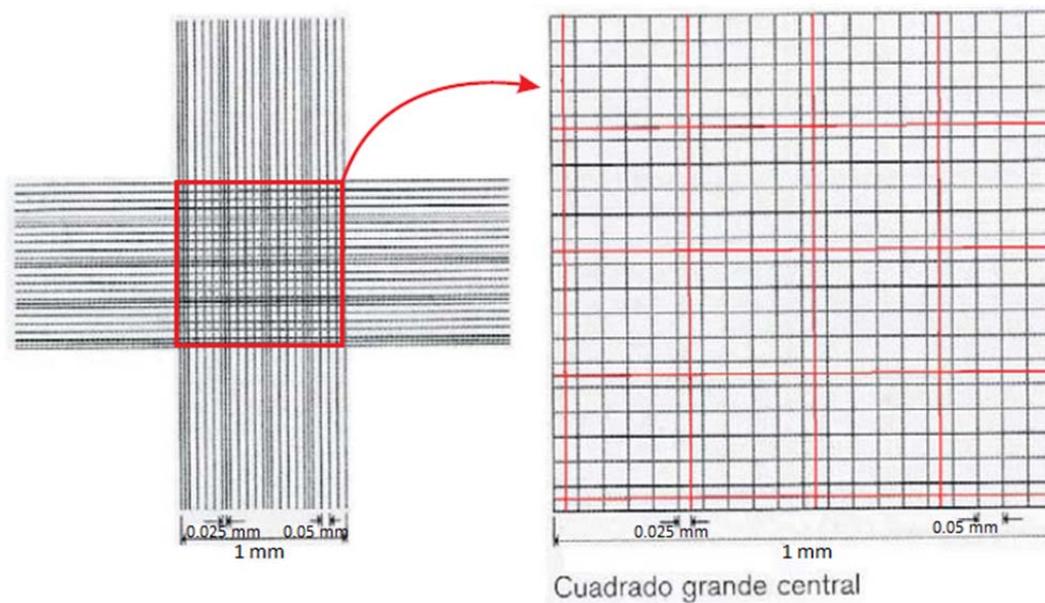


Figura 11. Cuadrícula de recuento de la cámara Neubauer

Recuentos celulares:

Se calcula el número de células por litro presentes en una muestra de agua mediante cámara Neubauer y con un microscopio de epifluorescencia.

Se va a realizar una diferenciación de los distintos taxones encontrados en la muestra, teniendo en cuenta si son diatomeas, clorofíceas del género *Scenedesmus*, o *Monoraphidium* u otros taxones que puedan aparecer, así como los organismos viables y no viables. La identificación de los distintos géneros se realiza según Tomas, 1997. En la figura 12 se muestra la morfología de los 3 taxones que se han tenido en cuenta para realizar los recuentos celulares.

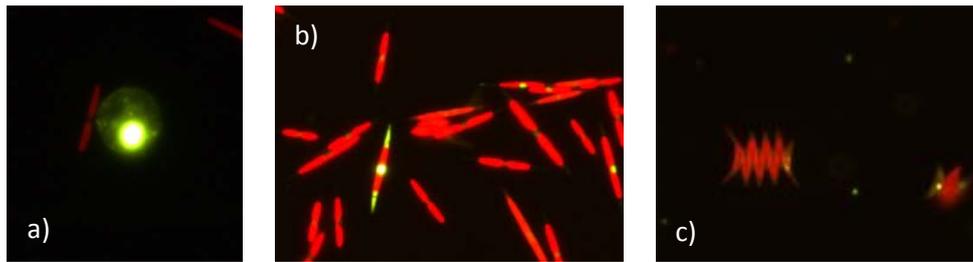


Figura 12. Taxones que aparecen en las muestras estudiadas, observados a 400X. a) Diatomea inviable (verde) junto a *Monoraphidium* viable (rojo). b) *Monoraphidium* viables e inviables. Los *Monoraphidium* se caracterizan por tener morfología alargada; c) Colonia de *Scenedesmus*. Estos suelen aparecer en colonias de 4 a 8 células.

Como los recuentos se realizan contando diferente número de cuadros medianos, se calcula el volumen de muestra contenido en cada cuadro mediano.

$$V = 0,25 \text{ mm} * 0,25 \text{ mm} * 0,1 \text{ mm} = 0,00625 \text{ mm}^3 = 6,25 * 10^{-9} \text{ L}$$

Ecuación 1. Volumen de muestra contenido en cada recuadro mediano

Una vez conocido el volumen de cada cuadro mediano se calcula el número de células por litro de muestra:

$$\frac{N^{\circ} \text{ Células}}{\text{Litro}} = \frac{N^{\circ} \text{ Células contadas}}{N^{\circ} \text{ Cuadros medianos contados} * \text{Volumen cuadro mediano}}$$

Ecuación 2. Número de células por litro de muestra

Como los recuentos se realizan diferenciando las células viables de las inviables, se calcula el porcentaje de células viables e inviables en cada muestra.

$$\% \text{ Células vivas} = \frac{(\text{Células /L}) \text{vivas contadas} * 100}{(\text{Células/L}) \text{totales contadas}}$$

Ecuación 3. Porcentaje de células vivas en cada muestra

$$\% \text{ Células muertas} = \frac{(\text{Células /L}) \text{muertas contadas} * 100}{(\text{Células/L}) \text{totales contadas}}$$

Ecuación 4. Porcentaje de células muertas en cada muestra

Para realizar los recuentos en la cámara Neubauer se introducen 200 μL de solución en la hendidura que presenta la cámara con forma de H, pero en este caso, para optimizar el uso de Sytox se introduce directamente sobre la cuadrícula 10 μL de solución y se coloca un cubreobjetos sobre ella.

Se realiza un recuento para el número de células viables e inviables de cada taxón (género), el número total de organismos eucariotas en la muestra y los porcentajes de células de cada tipo respecto al total de eucariotas presentes en la muestra.

Las condiciones que se tienen en cuenta para que el recuento sea válido son:

- Distribución aleatoria de los organismos en el campo de visión
- No superposición de células en el campo
- Sin flóculos en exceso

Para cada muestra estudiada se realizan dos réplicas con el fin de reducir los errores que se puedan producir en el recuento.

- **Procedimiento de observación al microscopio**

Para la observación al microscopio, se coloca la cámara Neubauer con la muestra sobre el microscopio. Con el objetivo 10X se centra la cuadrícula existente en la cámara Neubauer mediante el campo claro del microscopio, una vez enfocada la cuadrícula, se cambia al objetivo 40X.

La cuadrícula está dividida en 16 cuadros medianos, se coloca el objetivo de 40X sobre cada uno de los cuadros y se cuenta el número de células por cuadrado mediano mediante campo claro del microscopio, diferenciando las células por taxones según la morfología que tiene cada célula (Figura 12), posteriormente se observa la muestra mediante epifluorescencia contabilizando las células según su coloración (verde: células inviables y rojo: células viables), para así tener el total de células presentes de cada taxón y el total de células vivas y muertas. De esta manera se reduce la pérdida de coloración que sufren las células al incidir el haz de luz del filtro epifluorescente sobre ellas.

Este procedimiento se repite para los 16 cuadros medianos presentes en la cuadrícula.

3.4.4. Tratamiento térmico de las muestras

Para asegurar que todas las células son inviables, y por tanto deben teñirse todas de verde, en algunos casos se realizan las pruebas con muestra sometida a un tratamiento térmico en la unidad de digestión Bloc Digest 20, P. Selecta (Figura 13) durante 3 horas a la temperatura de 90 °C.

El principal objetivo del tratamiento térmico es la termodestrucción de los microorganismos vivos presentes en la muestra. A altas temperaturas se desnaturalizan las proteínas celulares y se alteran las membranas lipídicas provocando la muerte celular.

El tratamiento térmico se realiza con el fin de disponer de controles negativos.



Figura 13. Equipo digestor completo compuesto por Bloque metálico conectado a programador de procesos tiempo/temperatura, gradilla portatubos con tubos de digestión y colector de humos.

3.5. Tratamiento estadístico de los datos

Se va a realizar correlaciones estadísticas entre la absorbancia y los SST para comprobar si los datos obtenidos son estadísticamente significativos, y por tanto se puede utilizar el valor de la absorbancia como una aproximación de la concentración de SST presente en cada muestra en caso de no disponer de los datos reales. Esto se realiza para poder ajustar los SS de la muestra al valor de recuento adecuado, sin tener que esperar a que se haga la analítica de SS que tarda más tiempo. También se realiza análisis de la varianza para comparar el método de estudio de viabilidad mediante Sytox con el método de epifluorescencia en membranas de policarbonato. En este caso se realiza para comprobar que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados proporcionados por un método y el otro.

3.5.1. Correlación estadística

Para comprobar si los datos obtenidos muestran correlaciones estadísticamente significativas se realizan correlaciones de Pearson mediante test de la t-Student con el programa estadístico SPSS 16.1.

La correlación estadística determina la relación o dependencia que existe entre las dos variables que intervienen en una distribución bidimensional. Es decir, indica la fuerza y la dirección de una relación lineal y proporcionalidad entre dos variables estadísticas. Se considera que dos variables están correlacionadas cuando los valores de una de ellas varían sistemáticamente con respecto a los valores homónimos de la otra. La correlación entre dos variables, por si misma, no implica ninguna relación de causalidad.

- Test de correlación de Pearson: Se utiliza para estudiar la asociación entre un factor de estudio y una variable de respuesta cuantitativa, mide el grado de asociación entre dos variables tomando valores entre -1 y 1. Los valores cercanos a -1 indican una fuerte asociación lineal negativa (cuando una variable aumenta, la otra disminuye), los valores cercanos a 1 indican una fuerte asociación lineal positiva (cuando una variable aumenta, la otra también aumenta) y los valores cercanos a cero indican que no existe asociación lineal. El coeficiente de correlación lineal se expresa mediante la letra r aunque comúnmente se suele utilizar r^2 para evitar valores negativos.

$$r = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y}$$

Ecuación 5. Coeficiente de correlación de Pearson

- Test significativo t-Student: Se utiliza para determinar si hay una diferencia significativa entre las medias de dos grupos. Se asume que las variables dependientes tienen una distribución normal. Tiene en cuenta dos hipótesis: H_0 cuando no existe relación y H_a cuando si existe relación. Se especifica el nivel de probabilidad de cometer un error (valor de α) que se está dispuesto a aceptar (Error tipo I: Rechaza una hipótesis nula que sea realmente verdad; Error tipo II: Falla en rechazar una hipótesis nula que sea falsa), en este caso se utiliza 0,01 y 0,05, por tanto se acepta que se puede producir un error de 1% o de 5%. Si $p\text{-valor} < \alpha$ toma la hipótesis H_a y si $p\text{-valor} > \alpha$ toma la hipótesis H_0 .

3.5.2. Análisis de la varianza (ANOVA)

El análisis de varianza ANOVA (SPSS 16.1) se utiliza para comparar varios grupos definidos por un factor. Esta prueba es una generalización del contraste de igualdad de medias para dos muestras independientes. Se aplica para contrastar la igualdad de medias de poblaciones independientes y con distribución normal. Tiene en cuenta dos hipótesis: H_0 cuando las medias poblacionales son iguales y H_1 cuando las poblaciones son distintas. Si el nivel de significación (sig.) intra-clase es menor o igual que 0,05 se rechaza la hipótesis de igualdad de medias, si es mayor se acepta la igualdad de medias, es decir, no existen diferencias significativas entre los grupos.

Para realizar el contraste ANOVA, se requieren k muestras independientes de la variable de interés. Una variable de agrupación denominada Factor (F) clasifica las observaciones de la variable en las distintas muestras. Cuando la F no es significativa el factor no influye en la variable dependiente, es decir, los distintos niveles del factor se comportan de igual forma en lo que a la variable dependiente se refiere.

3.6. Error del método

El objetivo de una medición es determinar el valor del mensurando; esto es, el valor de la magnitud particular bajo medición. Por tanto, una medición comienza con una adecuada definición del mensurando, del método de medida y del procedimiento de medida (JCGM 100:2008)

El resultado de una medición es sólo una aproximación o estimación del valor del mensurando, y únicamente se halla completo cuando está acompañado de una declaración acerca de la incertidumbre de dicha estimación.

En muchos casos, el resultado de una medición se determina a partir de una serie de observaciones obtenidas en condiciones de repetitividad. La variación entre las observaciones repetidas se asume que es debida a magnitudes de influencia que pueden afectar al resultado de medida por no mantenerse totalmente constantes.

En una medición se cometen imperfecciones que dan lugar a un error en el resultado de medida. Tradicionalmente, el error se ha considerado constituido por dos componentes, una componente aleatoria y una componente sistemática.

El error aleatorio se supone que procede de variaciones de las magnitudes de influencia, de carácter temporal y espacial, impredecibles o estocásticas. Los efectos de tales variaciones, denominados efectos aleatorios, dan lugar a variaciones en las observaciones repetidas del mensurando. Aunque no es posible compensar el error aleatorio de un resultado de medida, habitualmente puede reducirse incrementando el número de observaciones. Su esperanza matemática o valor esperado es igual a cero. Este error nos expresa la precisión, es decir, el grado de reproducibilidad de las medias y se calcula a través de la desviación típica o el coeficiente de variación (CV).

El error sistemático, al igual que el error aleatorio, no puede eliminarse, pero frecuentemente puede ser reducido. Si se produce un error sistemático sobre un resultado de medida, debido a un efecto identificado de una magnitud de influencia (efecto sistemático), dicho efecto puede cuantificarse y, si es suficientemente significativo frente a la exactitud requerida en la medición, puede aplicarse una corrección o un factor de corrección para compensarlo. Se asume que, tras la corrección, la esperanza matemática del error debido al efecto sistemático es igual a cero. Este error nos expresa la exactitud, es decir, la proximidad de la media a su valor real.

La incertidumbre del resultado de una medición refleja la imposibilidad de conocer exactamente el valor del mensurando. El resultado de una medición tras la corrección de los efectos sistemáticos identificados es aún una estimación del valor del mensurando, dada la incertidumbre debida a los efectos aleatorios y a la corrección imperfecta del resultado por efectos sistemáticos.

Identificación de las fuentes de incertidumbre:

Se va a medir la viabilidad de las algas presentes en una muestra. Se estima que las fuentes de incertidumbre para esta medición son las siguientes:

- a) Error causado por las pipetas
- b) Error de la cámara Neubauer
- c) Error debido a la repetitividad

- a) Error causado por las pipetas

Respecto al error causado por las pipetas, se utilizan las siguientes pipetas:

- Pipeta Eppendorf Research de volumen variable 10-100 μL para dosificar 50 μL
- Pipeta Socorex Acura 825 de volumen regulable 0,1-2 μL para dosificar 0,1 μL
- Pipeta Eppendorf Research de volumen variable 10-100 μL para dosificar 10 μL

El volumen del líquido tomado en una punta depende del ángulo con el que se sujete la pipeta y la profundidad a la que se sumerja al tomar el líquido. Cada persona consigue una precisión y una exactitud algo diferentes al utilizar la misma micropipeta. A medida que se desgastan las partes interiores, la exactitud puede disminuir en un orden de magnitud. Las micropipetas necesitan un calibrado periódico y los técnicos tienen que estar acreditados.

- b) Error de la cámara Neubauer

Este error viene definido por la casa comercial que distribuye las cámaras.

- c) Error debido a la repetitividad

Para el cálculo de la incertidumbre causada por la repetitividad, se realizan una serie de observaciones independientes en las mismas condiciones de medida. En este caso se han realizado 10 repeticiones con muestra procedente del sistema a escala planta piloto (FBR 4). Con ello se pretende obtener el error aleatorio del método de medida de las células.

Se calcula la media aritmética de las observaciones según la ecuación:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n x_k$$

Ecuación 6. Media aritmética

La incertidumbre típica $u(x_k)$ se calcula a partir de la varianza ($s^2(x_k)$) y la desviación típica ($s(x_k)$), que representa la variabilidad de los valores observados x_k , o su dispersión alrededor de su media \bar{x} .

$$s^2(x_k) = \frac{\sum (x_k - \bar{x})^2}{(n - 1)}$$

Ecuación 7. Varianza

$$s(x_k) = \sqrt{s^2(x_k)}$$

Ecuación 8. Desviación típica

Incertidumbre típica combinada

La incertidumbre típica combinada $u_c(y)$ es la raíz cuadrada positiva de la varianza combinada $u_c^2(y)$, dada por:

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\delta f}{\delta x_i} \right]^2 u^2(x_i)$$

Ecuación 9. Varianza combinada

donde f es la función. Cada $u(x_i)$ es una incertidumbre. La incertidumbre típica combinada $u_c(y)$ es una desviación típica estimada y caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando.

$$u_c(y) = \sqrt{\sum [u(x_i)]^2}$$

Ecuación 10. Incertidumbre típica combinada

En este caso la incertidumbre típica combinada está formada por el error sistemático y aleatorio producido por el uso de las pipetas y la cámara Neubauer y por la incertidumbre típica causada por la repetitividad. Se expresa en porcentaje.

Al realizar las repeticiones para el cálculo de la incertidumbre típica causada por la repetitividad en las mismas condiciones de medida, se considera que el error causado por las pipetas y la cámara Neubauer está incluido en el error causado por la repetitividad.

3.7. Comparación del método de cálculo de viabilidad mediante Sytox y el método de recuento por epifluorescencia en membranas de policarbonato.

Los recuentos de organismos realizados para aplicar el método de la viabilidad utilizando Sytox se llevan a cabo con una cámara Neubauer (Apartado 3.4.3.). En ella el cálculo de las células litro se hace en función de las áreas y el volumen de los cuadros que tiene la misma. El microscopio utilizado es de epifluorescencia equipado con los filtros de luz adecuados para observar la tinción diferencial de las células.

Con este tipo de microscopios también se realizan recuentos de cel/L, con filtrado de muestra sobre membranas de policarbonato, pero sin la posibilidad de diferenciar organismos viables o no viables.

En este tipo de recuento las muestras son filtradas con membranas de policarbonato de tamaño de poro uniforme de 0,2 μm (Millipore GTTP de \varnothing 25mm). El filtrado se realiza con una bomba de vacío manual (5 y 10 Kpa) con el fin de obtener una buena distribución de las células sobre la membrana, tener una alta eficiencia de recolección y evitar que se produzcan procesos de deformaciones estructurales en los organismos. Se deshidratan los filtros con lavados sucesivos de etanol, de menor a mayor concentración (50%, 80%, 90% y 100%), para eliminar toda el agua de la membrana filtrante. Después se deja en un desecador con gel de sílice lo que facilita la manipulación y el montaje posterior del filtro. Una vez el filtro está seco se procede al montaje con aceite de inmersión. Para ello se añade una gota de aceite de inmersión sobre el portaobjetos, se deposita el filtro encima, se vuelve añadir otra gota de aceite sobre él y se pone el cubreobjetos. El recuento de los organismos se realiza como se describe en Lund *et al.* (1958). Para ello, un total de 300 células y al menos 100 células del género más abundante, son contados consiguiendo un error menor del 20%. Los fundamentos estadísticos del conteo de microalgas se describen en detalle en Venrick (1978).

Se propone comparar los resultados de ambos métodos para comprobar si al realizar los recuentos de viabilidad en cámara Neubauer se pueden prescindir de los recuentos con membranas de policarbonato, lo que abarataría el coste económico y el tiempo empleado en analizar las muestras. En el caso del método de cálculo de viabilidad mediante Sytox, además, se puede diferenciar entre células viables e inviables, por lo cual es una mejora al método de recuento mediante epifluorescencia en membranas de policarbonato.

Con el objetivo de comparar ambos métodos se calculan los parámetros estadísticos descriptivos (media, desviación típica, coeficiente de variación y percentil 50) de cada uno de los principales grupos de microalgas identificados en las muestras, en un total de 181 muestras. Para comprobar que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados proporcionados por un método y el otro se realiza un análisis de la varianza (Apartado 3.5.2) con el programa SPSS 16.1.

3.8. Aplicación de la metodología desarrollada

Una vez puesto a punto el método de análisis de viabilidad se procede a aplicar la técnica, para comprobar si esta herramienta permite hacer un seguimiento del FBR y relacionar abundancia y viabilidad con los parámetros operacionales y la eliminación de nutrientes. Para ello se analizan 74 muestras del FBR 4 correspondientes al periodo comprendido entre el 10/04/2014 y el 14/07/2014.

4. Resultados y discusión

Se han realizado un total de 171 pruebas con el objetivo de calcular la concentración de SST y SSV óptima para realizar las pruebas de viabilidad, la concentración de Sytox óptima y el tiempo de incubación adecuado. Además se realizó el experimento con Vectashield para evitar la pérdida de coloración y la confirmación del funcionamiento del método con un conjunto de muestras diferentes. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros.

Cabe señalar que en ocasiones la calidad (color, brillo, nitidez, etc.) de las observaciones a través de los oculares del microscopio dista bastante de la obtenida mediante la toma de imágenes, sin perjudicar esto al resultado final de las cuantificaciones. Además las imágenes pierden calidad cuando son impresas sobre papel. La mayor parte de los resultados de este trabajo son visuales.

4.1. Experimentos realizados

4.1.1. Tiempo de incubación óptimo

En la tabla 8 se muestran los resultados de tinción de organismos tras diferentes tiempos de incubación para muestras tratadas térmicamente (controles negativos) procedentes de los dos sistemas, planta piloto y planta de laboratorio, a concentración 50:0,1 (50 µL muestra con 0,1 µL Sytox). La concentración de Sytox es de 5,88 µL Sytox/mg SST

Muestra Tiempo de Incubación	Planta piloto			Planta de laboratorio
	TM	FBR 3	FBR 4	Reactor de laboratorio
5 minutos	Todas las células teñidas de verde			
10 minutos		Todas las células teñidas de verde	Todas las células teñidas de verde	Todas las células teñidas de verde

Tabla 8. Pruebas realizadas para el cálculo del tiempo de incubación.

A continuación, en la Figura 14, se muestran imágenes de células (400X) teñidas con Sytox a diferentes tiempos de incubación tras un tratamiento térmico.

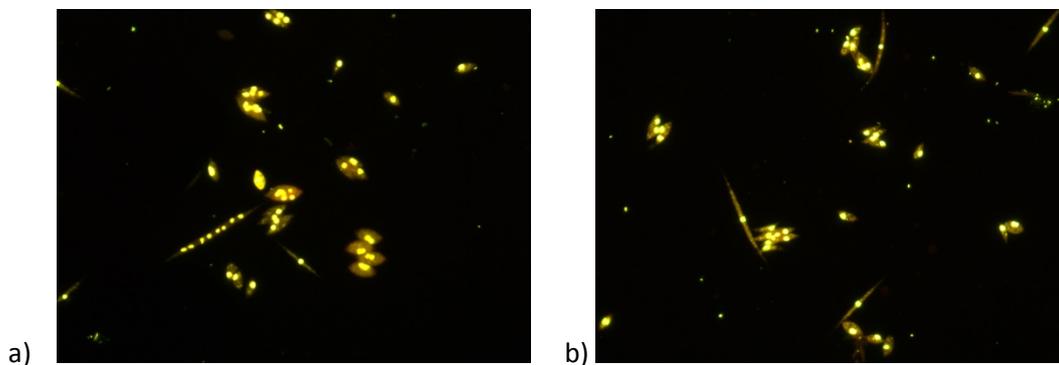


Figura 14. Muestras observadas a 400X de células tras tratamiento térmico teñidas con Sytox tras un tiempo de incubación de a) 5 minutos y b) 10 minutos

En la Figura 14 se observa la coloración verde típica del Sytox cuando penetra en el interior de las células y se une a los ácidos nucleicos. Las imágenes revelan que no hay diferencias de tinción a partir del tiempo de incubación de 5 minutos, quedando la totalidad de las células teñidas. Tal y como se ha comentado anteriormente, la fluorescencia del Sytox y la autofluorescencia natural puede ir atenuándose con el paso del tiempo. Es por esto que se considera que 5 min es el tiempo de incubación adecuado para el tipo de muestras que se van a utilizar, puesto que no se aprecian diferencias de tinción a partir de este tiempo de incubación, quedando todas células teñidas de verde.

4.1.2. Concentración de sólidos en la muestra

Esta prueba se realiza con el fin de encontrar la concentración de SST en la muestra que permita el recuento de organismos con el menor error posible. En este caso no se utiliza Sytox, sino únicamente la autofluorescencia de las células debida a la clorofila.

Los resultados de las pruebas realizadas concentrando y diluyendo las muestras son los siguientes:

Concentración (90 mg/L): Como se observa en la Figura 15, las células no poseen una distribución homogénea a lo largo del campo de visión. Solo se observan células en el centro de la cámara de recuento quedando las esquinas y el resto de la muestra vacío. Esta concentración no se considera adecuada para realizar recuentos de viabilidad porque tal y como se menciona en el apartado 3.4.3. el recuento es representativo cuando la distribución de los organismos es aleatoria y este hecho no se da en esta concentración. Además el número de células por campo es muy pequeño, lo que tampoco asegura la representatividad de la muestra.

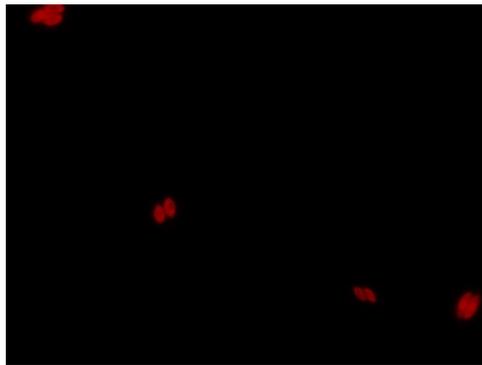


Figura 15. Muestra a concentración 90 mg/L de SST, observada a 400X

Concentración (120 mg/L): En la Figura 16 se observa que la cantidad de células por campo es reducida y además no muestran una distribución aleatoria, agrupándose la mayoría de ellas en el centro de la cámara y quedando las esquinas casi sin células. Se considera que esta concentración no es adecuada para realizar recuentos de viabilidad porque no cumple el número mínimo de organismos por campo ni la distribución aleatoria de los mismos.

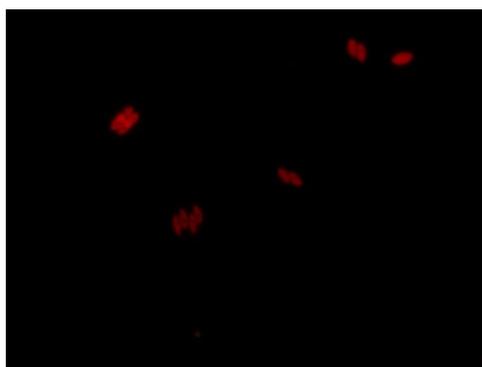


Figura 16. Muestra a concentración 120 mg/L de SST, observada a 400X

Concentración (180 mg/L): Como se observa en la Figura 17, el número de células por campo aumenta, sin embargo este aumento no es suficiente para realizar un conteo representativo puesto que no se llega al mínimo de células recomendado. Por tanto se considera que esta concentración no es adecuada para realizar recuentos de viabilidad.

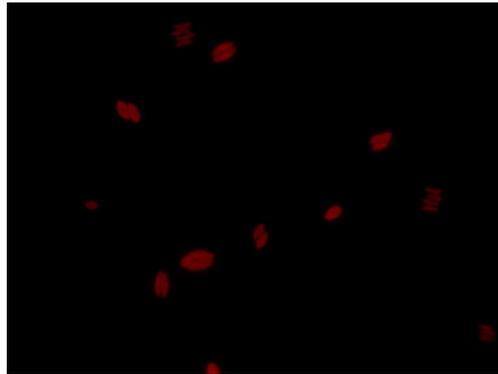


Figura 17. Muestra a concentración 180 mg/L, observada a 400X

Concentración (360 mg/L): Como se aprecia en la Figura 18 se observan un número suficiente de organismos con una distribución aleatoria sobre el campo de visión. Estas condiciones son óptimas para permitir realizar un conteo representativo. A esta concentración no se observa superposición de células y se aprecian claramente las colonias de organismos. Es por ello que esta concentración se considera adecuada para el método de viabilidad celular.

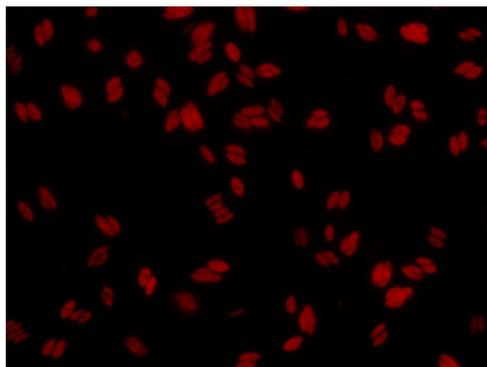


Figura 18. Muestra a concentración 360 mg/L, observada a 400X

Concentración (720 mg/L): Como se puede observar en la Figura 19 a estas concentraciones existe una mayor cantidad de células. El conjunto de células es tan elevado que en algunas zonas no se puede enfocar bien todas las células debido a que se acumulan y se superponen. Por tanto los resultados derivados de esta concentración no son fiables porque pueden estar subestimando el valor real de células por litro.

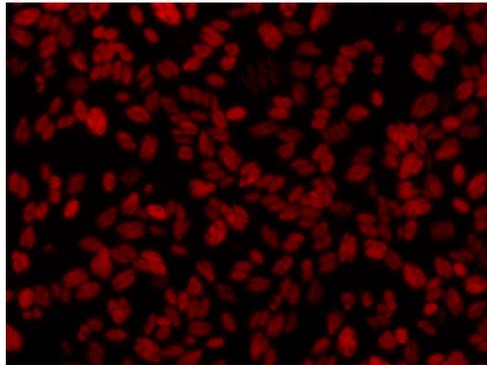


Figura 19. Muestra a concentración 720 mg/L, observada a 400X

Concentración (1080 mg/L): Como se observa en la Figura 20, la cantidad de células es tan elevada que se superponen en distintas capas a lo largo de toda la muestra. Eso impide enfocar bien la muestra y por tanto el recuento posterior. Se considera que esta concentración es demasiado elevada para realizar el recuento de viabilidad.

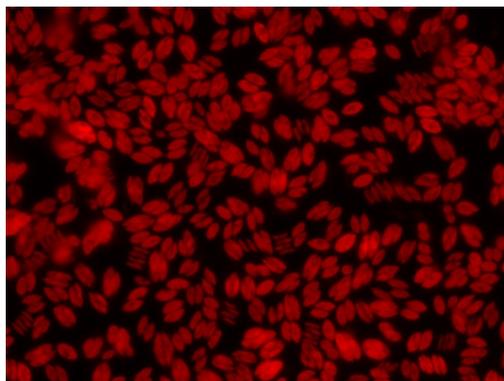


Figura 20. Muestra a concentración 1080 mg/L, observada a 400X

En la tabla 9 se resumen las características visuales más relevantes encontradas al realizar los recuentos a diferentes concentraciones de sólidos.

Concentración de SST (mg/L)					
90	120	180	360	720	1080
Muy pocas células, y distribución no homogénea en campo de visión. No se considera adecuado para realizar recuentos de viabilidad.	Células dispersas y distribución no homogénea. No se considera adecuado para realizar recuentos de viabilidad.	Células suficientes para realizar recuentos, pero no se considera representativo. No se considera adecuado para realizar recuentos de viabilidad.	Cantidad de células adecuada y con distribución aleatoria. Se considera adecuada para realizar recuentos de viabilidad.	El número de células es elevado; superposición de células. No representativo	Superposición celular en diferentes capas que impide enfocar la muestra. No representativo

Tabla 9. Relación entre la concentración de SST y el número de células visible en cada concentración.

Puesto que a 180 mg/L existen suficientes células para hacer el recuento pero no se considera representativo y a 720 mg/L el número de células es tan grande que se superponen las células se considera que la concentración óptima de sólidos debe tener un rango entre 250 y 600 mg/L con un valor central en torno a los 400 mg/L.

Las pruebas se repiten con muestra procedente del sistema a escala planta piloto (FBR3) para ajustar el rango de concentración establecido.

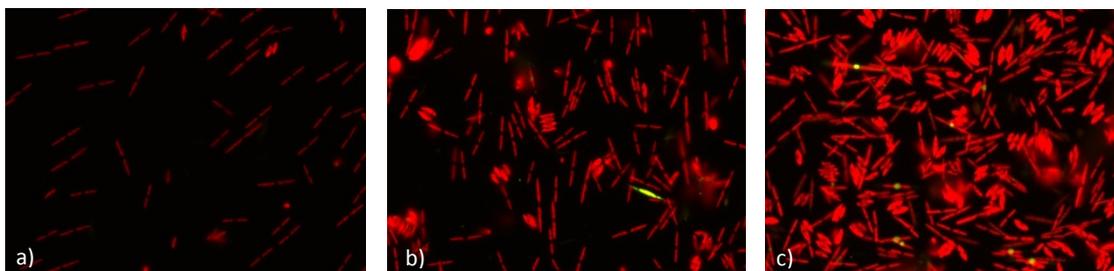


Figura 21. Muestra observada a 400X procedente del sistema a escala de planta piloto (FBR 3) a concentración: a) 365 mg/L b) 730 mg/L y c) 1095 mg/L respectivamente

En la Figura 21 se observa que la concentración 365 mg/L (a) permite un recuento adecuado por no superposición de células y a la vez por tener un número suficiente de organismos. A mayores concentraciones (b y c) ya se producen superposiciones de células en el campo de visión, observándose zonas borrosas que dificultan el recuento.

Por tanto se considera que la concentración de SST óptima se encuentra en un rango entre 250 mg/L y 400 mg/L.

4.1.3. Concentración de Sytox óptima (Relación Volumen de muestra por Volumen de colorante)

Tras realizar las pruebas para obtener la concentración óptima de Sytox que asegure teñir todas las células y que los recuentos se realicen adecuadamente (Tabla 4), se describen los resultados obtenidos.

Las muestras utilizadas para la realización de estas pruebas proceden tanto del sistema a escala de planta piloto como del sistema a escala de laboratorio y tienen una concentración de SST aproximada de 360 mg/L.

Muestra Blanco (sin Sytox) - Sin tratamiento térmico:

Las muestras frescas sin tratamiento térmico y sin Sytox (blanco) observadas al microscopio (400X) (Figura 22 a) muestran todas las células de color rojo. Al observar las células a más aumentos (1000X) (Figura 22 b) se ve claramente que todas las células son rojas debidas a la fluorescencia propia de la clorofila. Esto es lo que se espera observar ya que al no añadirle tinte Sytox no puede apreciarse diferencia entre células vivas y muertas.

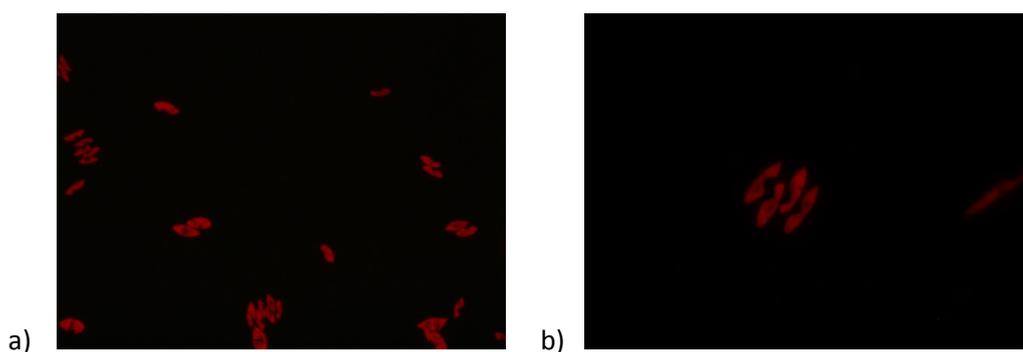


Figura 22. Blanco (sin Sytox) de muestra sin tratamiento térmico del reactor a escala de planta piloto (TM) observado a a) 400X y b) 1000X. Se puede apreciar la coloración roja propia de la autofluorescencia de la clorofila.

Muestra Blanco (sin Sytox) - Tratamiento térmico (control negativo):

En las muestras sin añadir Sytox (Blanco) sometidas a un tratamiento térmico (Figura 23) se ven todas las células de color rojo. Cabe señalar que el color rojo que se detecta no es tan intenso como en el caso anterior y en algunos casos se observa una coloración amarillenta débil en el interior de la célula. Esto puede ser debido a que el pigmento de la clorofila después de un tratamiento térmico sufre un daño irreversible que puede afectar a su estructura y funcionalidad, manifestándose una pérdida de la fluorescencia rápida (Pouneva *et al.* 1997).

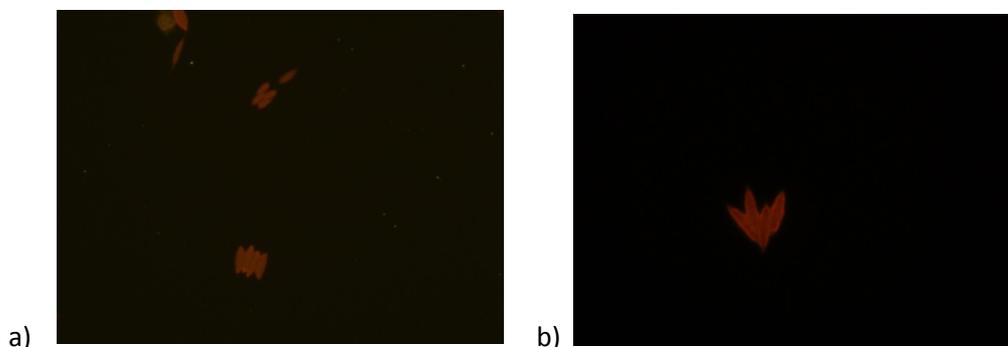


Figura 23. Blanco (sin Sytox) de muestra térmica del reactor a escala de planta piloto (TM) observada a a) 400X y b) 1000X donde se aprecia coloración marrón no tan intensa

Concentración 1:1 (0,1 μ L Sytox+0,1 μ L muestra) - Sin tratamiento térmico \rightarrow (2777,7 μ L Sytox/mg SST):

En las pruebas a concentración 1:1 (0,1 μ L Sytox+0,1 μ L muestra) de muestra fresca (Figura 24) se ha observado que además de células rojas existen células con coloración verde-amarilla. Esto es debido a que estas células tienen dañadas las membranas plasmáticas y el Sytox puede penetrar y unirse a los ácidos nucleicos.

Puede apreciarse la diferencia de coloración con respecto a los blancos (sin Sytox) de muestra fresca realizados (Figura 22), en la que todas las células tienen coloración roja.

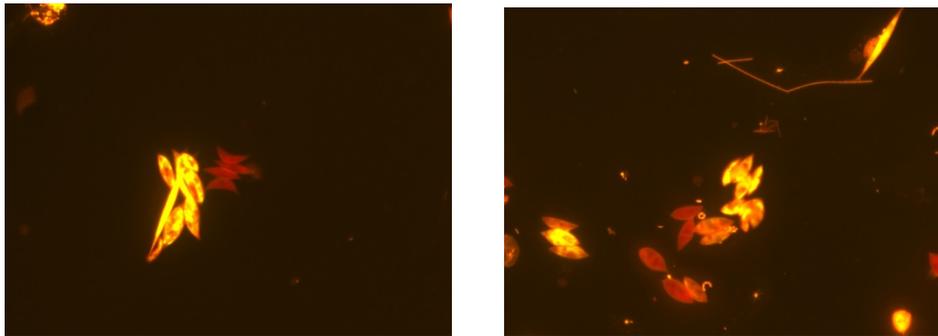


Figura 24. Muestra sin tratamiento térmico del reactor a escala de planta piloto (TM) a concentración 1:1 (0,1 μ L Sytox+0,1 μ L muestra) observada a 400X, donde se aprecian células con coloración roja y células con coloración amarillenta en ambas imágenes.

Concentración 1:1 (0,1 μ L Sytox+0,1 μ L muestra) - Tratamiento térmico (control negativo) \rightarrow (2777,7 μ L Sytox/mg SST):

Respecto a las muestras sometidas a un tratamiento térmico se han realizado dos pruebas. En la primera, que consiste en añadir 0,1 μ L de muestra junto con 0,1 μ L de Sytox, no se han observado resultados porque al tener tan poco volumen la muestra se secó rápidamente y fue inviable la visualización. En la segunda prueba, que consiste en utilizar 0,1 μ L de muestra junto con 50 μ L de agua destilada para facilitar la mezcla (matriz donde producir la reacción), a lo que posteriormente se añade 0,1 μ L de Sytox, tampoco se aprecian resultados satisfactorios en los recuentos (poca densidad celular). De estas pruebas no se disponen de fotografías que muestren visualmente los resultados.

Concentración 1:0,1 (1 μ L muestra+0,1 μ L Sytox) - Sin tratamiento térmico \rightarrow (277,7 μ L Sytox/mg SST):

En las pruebas a concentración 1:0,1 (1 μ L muestra+0,1 μ L Sytox) (Figura 25) las células se ven teñidas de rojo, y alguna parece tener cierta coloración verde-amarillenta en el interior. Además, alrededor de algunas células se observa color amarillo. Como apunta Sato *et al.*, (2004) esto puede ser atribuido a la acumulación de materia alrededor de la célula debido a la fuga de ADN tras la rotura de la pared celular. Hay que tener en cuenta que con esta concentración aparecen problemas tanto de homogeneización de la muestra con el Sytox

como de la aparición de huecos de aire en los portaobjetos empeorando la visualización de la muestra al microscopio.

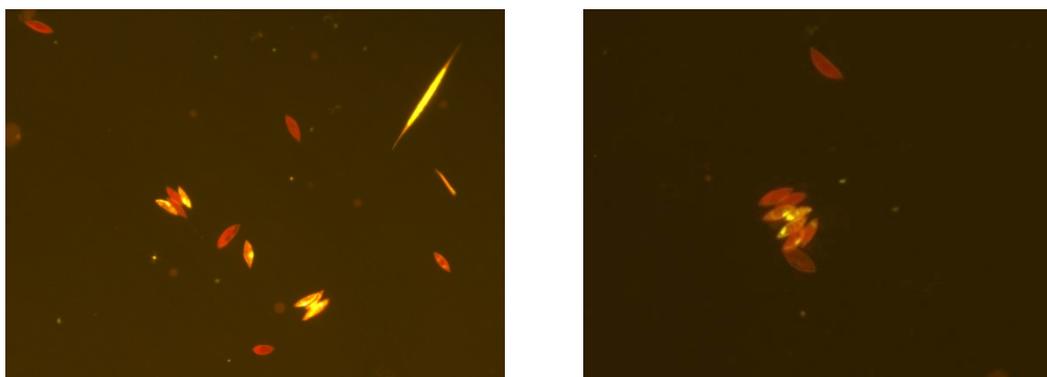


Figura 25. Muestra sin tratamiento térmico del reactor a escala de planta piloto (TM) a concentración 1:0,1 (1 μL muestra + 0,1 μL Sytox) observada a 400X, donde se aprecian células viables (rojas) y células inviables (amarillentas) en ambas imágenes.

Concentración 1:0,1 (1 μL muestra+0,1 μL Sytox) - Tratamiento térmico (control negativo) \rightarrow (277,7 μL Sytox/mg SST):

En las pruebas realizadas a esta concentración tras un tratamiento térmico todas las células muestran una coloración verde intensa (1000X). Esto puede ser debido a un exceso de tinte, ya que todas las células se ven de color verde fluorescente y algunos orgánulos de un color mucho más intenso que impide visualizar correctamente la muestra. Esto se puede atribuir a la mayor fluorescencia de algunos cloroplastos que pueden llegar a enmascarar el resto de la célula. Este hecho impidió la realización de imágenes de calidad y por tanto no se dispone de fotografías para ver visualmente los resultados.

Comparado con los resultados obtenidos a distinta concentración (más diluidas) tras un tratamiento térmico parece que en este tipo de muestras existe un excedente de reactivo que sobretiene todas las células.

Concentración 5:0,1 (5 μL muestra+0,1 μL Sytox) - Sin tratamiento térmico \rightarrow (55,5 μL Sytox/mg SST):

Para esta concentración la mayor parte de los organismos muestran una coloración roja (Figura 26 b). Sin embargo algunos de ellos presentan orgánulos teñidos de verde muy fluorescente. Alrededor de algunas células, tanto viables (rojas) como dañadas o inviables (rojas con orgánulos verdes o verdes completamente), se puede apreciar una coloración amarillenta igual que sucede en el caso anterior, probablemente debido al escape de material genético. Hay que tener en cuenta que la fluorescencia verde se pierde rápidamente tras observar la muestra al microscopio (al incidir la luz sobre las células), por lo que al realizar fotografías se ha perdido parte de la coloración. Esto concuerda con lo señalado por Pouneva, I., 1997 en su estudio en el que indica que las pruebas de viabilidad realizadas con microscopía de epifluorescencia son muy sensibles a la luz del microscopio. En este caso hay demasiada concentración de tinte, ya que los orgánulos teñidos de verde emiten demasiada fluorescencia enmascarando a las células, y no dejan apreciar bien la coloración roja del resto de células.

Además, estas muestras presentan flóculos que se tiñen de verde fluorescente e impiden una buena observación de la viabilidad del resto de organismos (Figura 26 a).

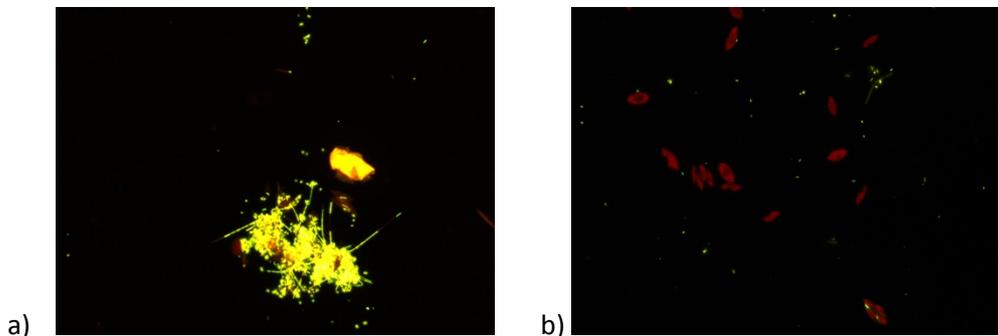


Figura 26. a) Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala de planta piloto (TM) a concentración 5:0,1 (5 μL muestra + 0,1 μL Sytox), en la que se aprecian células rodeadas de bacterias, observada a 400X, b) Muestra sin tratamiento térmico del reactor a escala de planta piloto (TM) a concentración 5:0,1 observada a 400X donde se aprecian células vivas (rojas) y células inviables (verdes).

Concentración 5:0,1 (5 μL muestra+0,1 μL Sytox) - Tratamiento térmico (Control negativo) \rightarrow (55,5 μL Sytox/mg SST):

A estas concentraciones y tras un tratamiento térmico, todos los organismos muestran coloración verde fluorescente en el interior mientras que el resto de la célula tiene un color rojo más apagado (Figura 27). La fluorescencia verde se pierde rápidamente tras la observación, impidiendo que las imágenes sean tan fluorescentes como aquellas observadas en el microscopio.

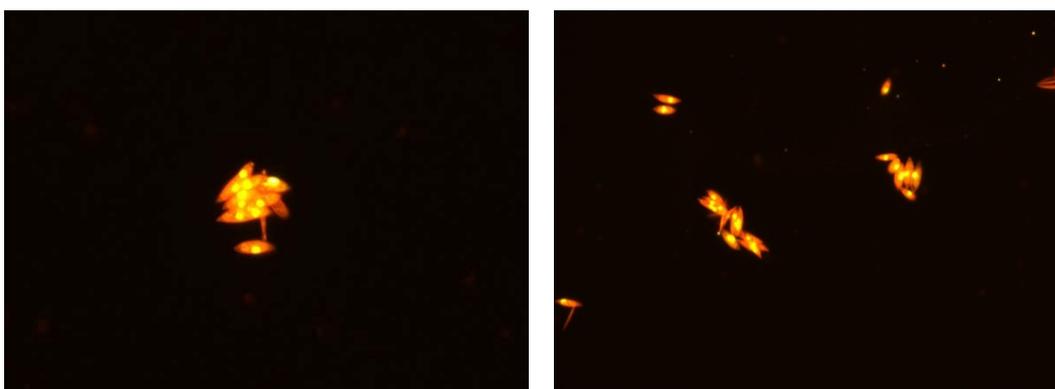


Figura 27. Muestra térmica procedente del reactor a escala de planta piloto (TM) a concentración 5:0,1 (5 μL muestra + 0,1 μL Sytox), observada a 400X, donde se aprecian los núcleos verdes del interior de las células, aunque la coloración no se ve tan intensa como aquella observada directamente en el microscopio debido a la pérdida de fluorescencia.

Concentración 10:0,1 (10 μ L muestra+0,1 μ L Sytox) - Sin tratamiento térmico \rightarrow (27,7 μ L Sytox/mg SST):

Respecto a las muestras sin tratamiento térmico (400X) las células pueden verse completamente verdes, completamente rojas o en ocasiones solo se ven orgánulos verdes en su interior, mientras que el resto de célula se ve rojo. También se aprecian flóculos en los que hay adheridos microorganismos. Cabe destacar que a 1000 aumentos el color verde es demasiado intenso impidiendo que se pueda enfocar bien la muestra y provocando que las células rojas se vean borrosas (bajo un halo de color verde) (Figura 29 b). La cantidad de tinte es demasiada ya que en las células que se encuentran cercanas a los flóculos no se aprecia bien la coloración porque deslumbra el verde de los flóculos. También hay que tener en cuenta que la coloración se pierde enseguida, desapareciendo primero la coloración verde, que se convierte en anaranjada, y posteriormente la coloración roja, quedando las células de un color marrón. Por tanto deben realizarse las fotografías y los recuentos rápidamente para que los datos sean reales y no estén influidos por el cambio de coloración que van sufriendo las células tras la exposición a la luz del microscopio.

En las Figuras 28, 29 y 30 pueden observarse imágenes de células procedentes de muestra sin tratamiento originarias del reactor a escala planta piloto (TM, FBR3 y FBR4) donde se aprecian células inviables (verdes), células dañadas (rojas con orgánulos verdes en el interior) y células viables (rojas), así como un flóculo formado por células (Figura 28 c).

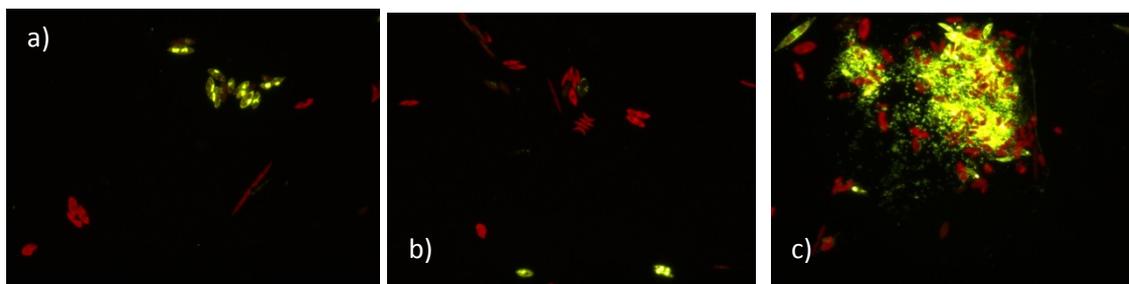


Figura 28. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 10:0,1 (10 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observada a 400X, a) se aprecia un conjunto de células inviables (verdes) en la parte superior de la fotografía y algunas células viables (rojas) en la parte inferior de la fotografía. b) conjunto de células viables y dañadas en la parte superior de la fotografía y alguna célula inviable (verde) en la parte inferior. c) Conjunto de células viables (rojas) rodeadas por bacterias formando un flóculo.

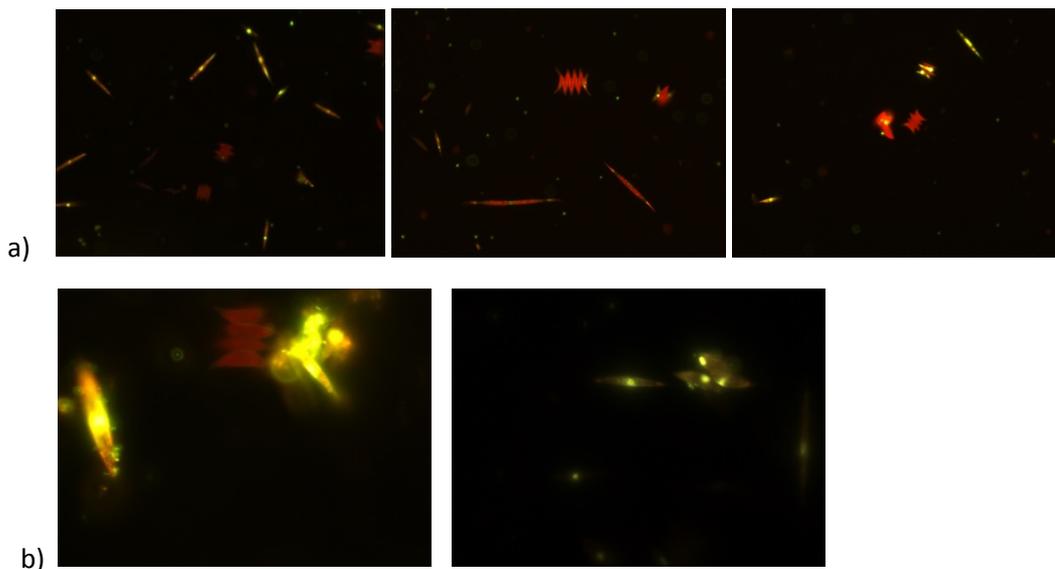


Figura 29. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 3) a concentración 10:0,1 (10 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observadas a a) 400X donde se aprecian en la primera imagen células inviables (verdes) con orgánulos de un verde más intenso en la parte superior de la imagen, junto con conjuntos de células viables (rojas) en la parte inferior de la imagen, en la segunda se observan conjuntos de células viables (rojas) con células inviables (verdes) en las esquinas del conjunto, y alguna célula viable suelta en la parte inferior de la imagen, y en la tercera imagen se aprecia un conjunto de células viables (rojas) y un conjunto de células inviables (verdes).

b) 1000X, donde puede apreciarse en la primera imagen un conjunto de células viables (rojas) y un conjunto de células inviables (verdes) donde la coloración verde es demasiado intensa, y en la segunda imagen se aprecian células inviables con orgánulos coloreados de un verde más intenso al resto de la célula.

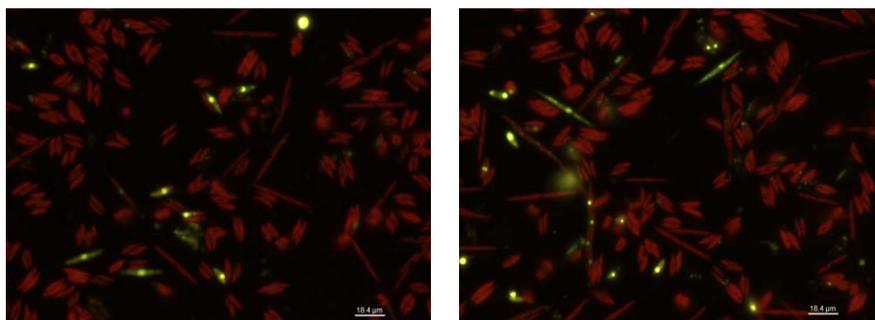


Figura 30. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 4) a concentración 10:0,1 (10 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observada a 400X. En ambas imágenes se aprecian en su mayoría células viables (rojas), a la vez que se pueden ver una cantidad menor de células inviables (verdes) observándose en la segunda imagen que las células inviables deslumbran y desenfocan la imagen.

Concentración 10:0,1 (10 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox) - Tratamiento térmico (control negativo)
→ (27,7 μ L Sytox/mg SST):

En las pruebas realizadas con muestra térmica (Figuras 31 y 32) se observan todas las células con un orgánulo teñido de verde brillante muy intenso (Figura 31 a). A 1000x se observan todas las células inviables (verdes), además se aprecian muy bien los orgánulos de las células teñidos de verde y el resto de la célula más claro (Figura 31 b).

En este caso la concentración de tinte sigue siendo muy elevada, ya que se observan las células sobreteñidas, produciendo un halo verde alrededor de las mismas como consecuencia de tinte sobrante (Figura 32 b). Este brillo que deslumbra genera problemas a la hora de enfocar la muestra. Además, hay que añadir que la presencia de flóculos también dificulta la visualización de la muestra debido a su gran fluorescencia y con ello el recuento posterior.

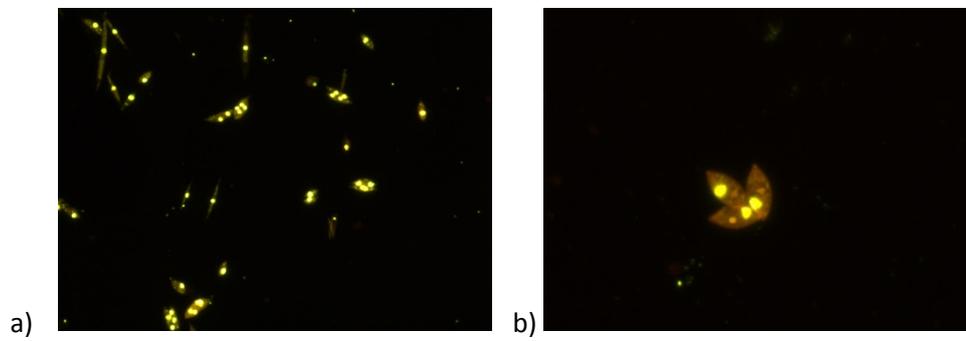


Figura 31. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 10:0,1 (10 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observada a a) 400X, donde se aprecian células inviables con un orgánulo verde muy intenso y b) 1000X, formado por un conjunto de 3 células con orgánulos en su interior teñidos de verde más intenso que el resto de la célula.

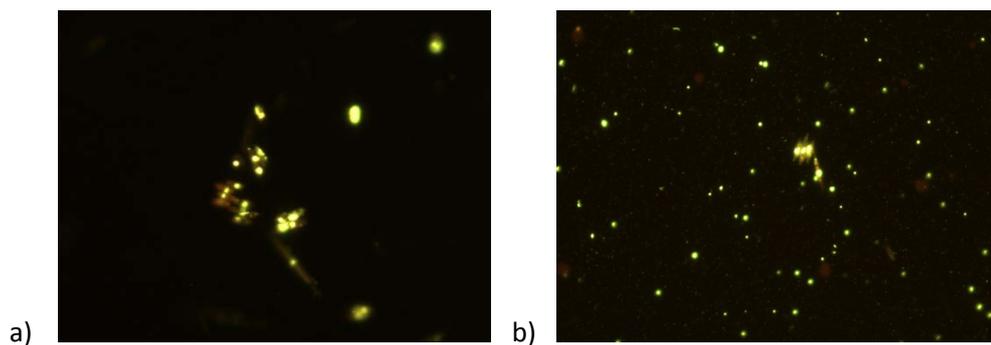


Figura 32. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 3) a concentración 10:0,1 (10 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X formada por un conjunto de células inviables con orgánulos en el interior más deslumbrantes que el resto de la célula b) observada a 400X, donde se aprecia que hay tinte sobrante por la muestra que impide una buena observación de las células.

Concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox) - Sin tratamiento térmico \rightarrow (11,1 μ L Sytox/mg SST):

En las muestras sin tratamiento térmico (Figuras 33, 34, 35 y 36) se puede ver a 400X células con coloración roja y células verdes. Los resultados son similares a los obtenidos en la concentración 10:0,1 con la diferencia de que a esta concentración la coloración verde es un poco menos intensa, por tanto no deslumbra ni dificulta la visualización de las células. Hay que tener en cuenta que a mayores aumentos (1000X) el color verde todavía es bastante deslumbrante (Figura 35 b) aunque esta coloración se pierde rápidamente.

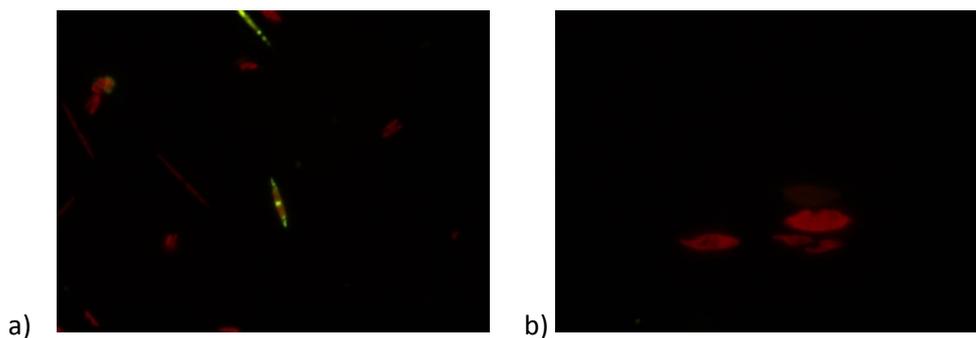


Figura 33. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X, se observa una célula inviable (verde) y algunas células viables (rojas) y b) observada a 1000X, formada por un conjunto de células viables (rojas)

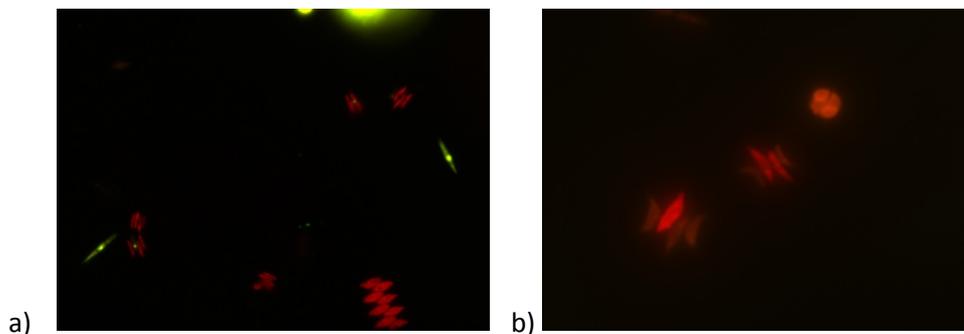


Figura 34. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 3) a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X donde se ve un conjunto de células viables (rojas) en la parte inferior de la imagen, así como otros conjuntos de células viables y dos células inviables individuales, y b) observada a 1000X, donde se aprecian células viables, y células inviables que han perdido coloración por lo que ya no se ven de un color tan verde deslumbrante, sino de un color más anaranjado.

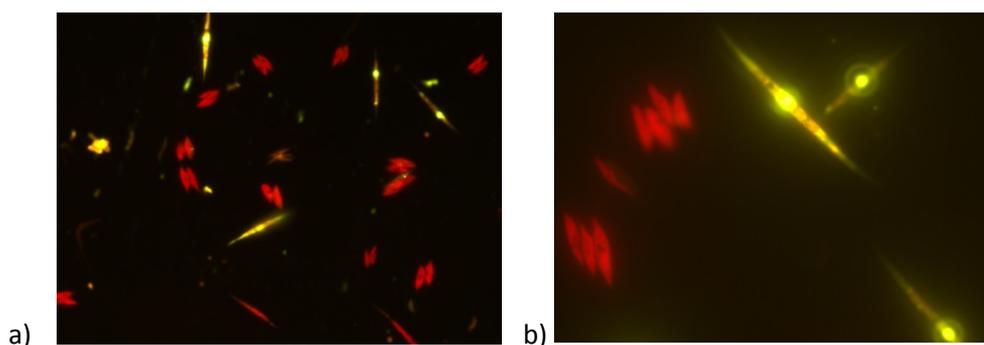


Figura 35. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 4) a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X formada por células inviables (verdes) que deslumbran un poco por la imagen, y células viables (rojas) y b) observada a 1000X, donde puede apreciarse que las células inviables deslumbran al ser demasiado fluorescentes

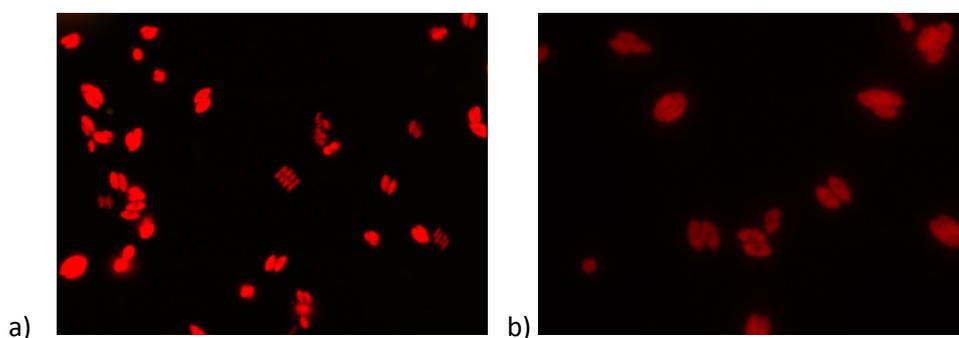


Figura 36. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala de laboratorio a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), donde se aprecian células viables (rojas) a) observada a 400X y b) observada a 630X

Concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox) - Tratamiento térmico (control negativo) \rightarrow (11,1 μ L Sytox/mg SST):

Tras un tratamiento térmico y a esta concentración todas las células muestran coloración verde y además la mayoría presenta orgánulos teñidos de verde intenso. Los resultados parecen indicar que la cantidad de tinte empleado a esta concentración es suficiente para teñir todas las células de la muestra. Cabe señalar que a estas concentraciones con el paso del tiempo se sigue perdiendo la coloración verde de las células, quedando los orgánulos verdes y el resto de células rojo menos intenso (Figura 37 b).

En las Figuras 37, 38 y 39 se observan imágenes de muestras procedentes de los distintos sistemas (planta piloto (TM y FBR4) y planta de laboratorio).

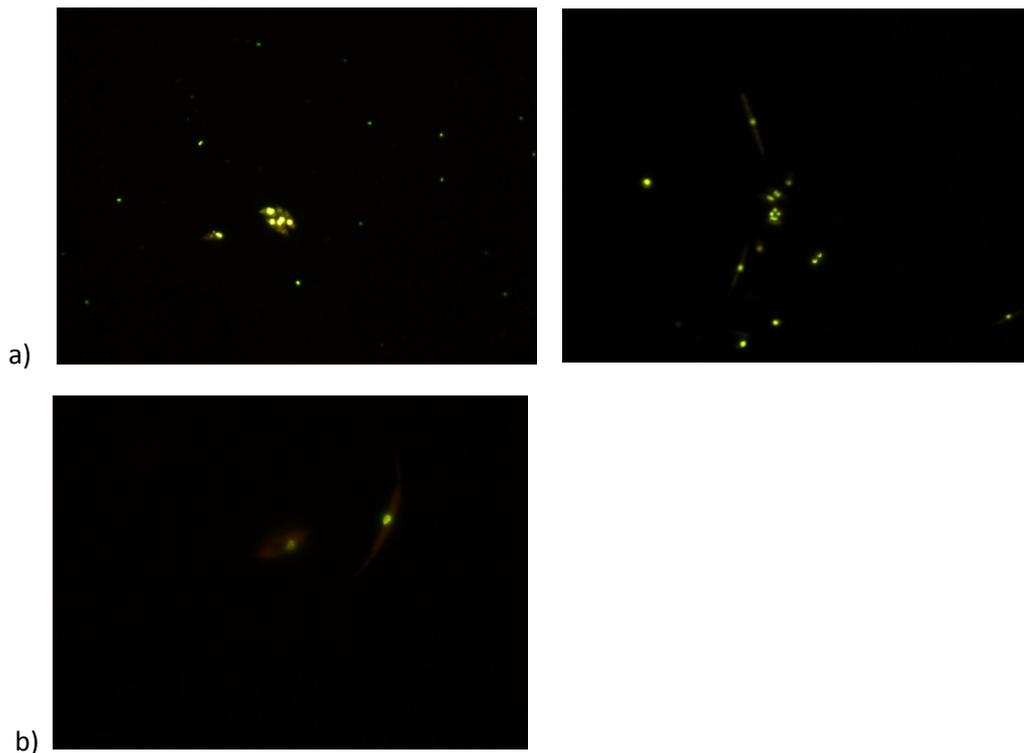


Figura 37. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X, donde se aprecia en la primera imagen un conjunto de células inviables con orgánulos más fluorescentes que el resto de la célula y en la segunda imagen se observan células inviables (verdes) con orgánulos más deslumbrantes y b) observada a 1000X. En este caso se ha perdido coloración, por lo que solo se aprecian verde algún orgánulo, quedando el resto de célula de un color anaranjado.

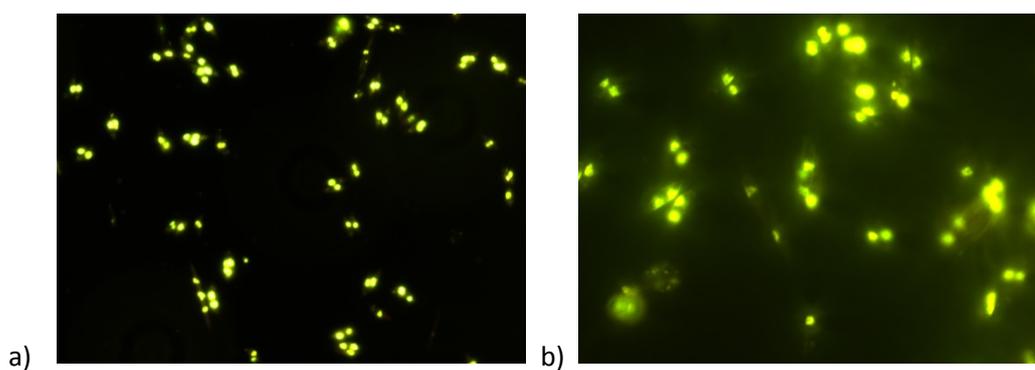


Figura 38. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 4) a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X formada por células inviables con orgánulos más deslumbrantes que el resto de célula, que dificultan a la hora de enfocar la muestra y b) observada a 1000X, donde se aprecia que a este aumento el verde es muy fluorescente e impide enfocar adecuadamente las células.

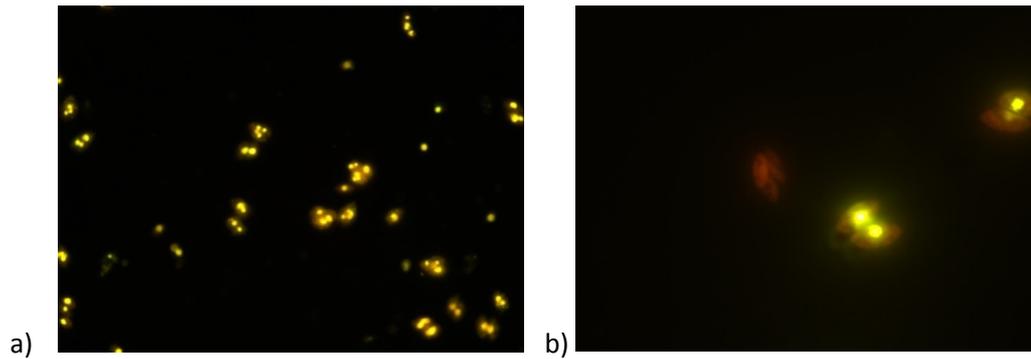


Figura 39. Muestra térmica procedente del reactor a escala de laboratorio a concentración 25:0,1 (25 μL muestra + 0,1 μL Sytox), a) observada a 400X, formada por células inviables con orgánulos verdes más fluorescentes en su interior y b) observada a 1000X, en esta imagen se ha perdido la coloración, quedando algún orgánulo del interior de la célula verde y el resto de célula de coloración roja.

Concentración 50:0,1 (50 μL muestra + 0,1 μL Sytox) - Sin tratamiento térmico \rightarrow (5,5 μL Sytox/mg SST):

En las pruebas a esta concentración, como cabe esperar, se observa células rojas (viables) y otras verdes (no viables). Como ocurre en el resto de casos, la coloración se pierde enseguida, sobre todo a mayores aumentos, perdiéndose primero la tonalidad verde y posteriormente la tonalidad roja. A 630X y 1000X se aprecia mejor la diferencia entre el orgánulo verde y el resto de célula con coloración roja (Figura 40 b), aunque en la fotografía no se ve tanto color como observada la muestra a microscopio.

En las Figuras 40 41 y 42 se muestran imágenes de muestras a concentración 50:0,1 (50 μL muestra + 0,1 μL Sytox), sin tratamiento térmico.

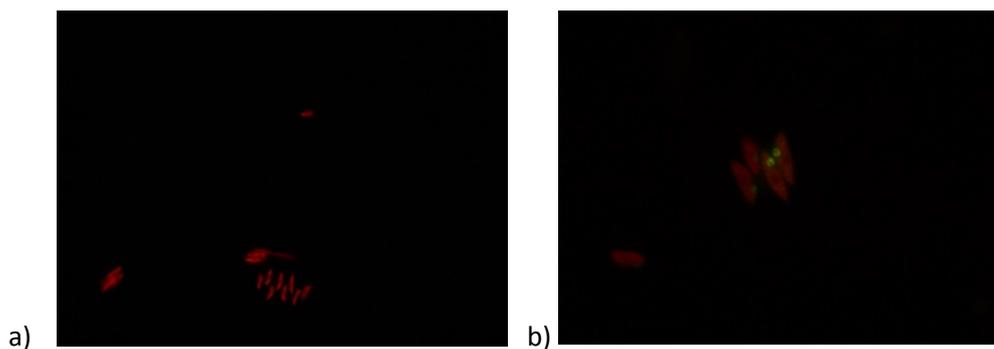


Figura 40. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 50:0,1 (50 μL muestra + 0,1 μL Sytox), a) observada a 400X, formada por un conjunto de células viables y b) observada a 1000X, formada por un conjunto de células donde se aprecia la coloración verde de un orgánulo en el interior de las células y el resto de célula roja

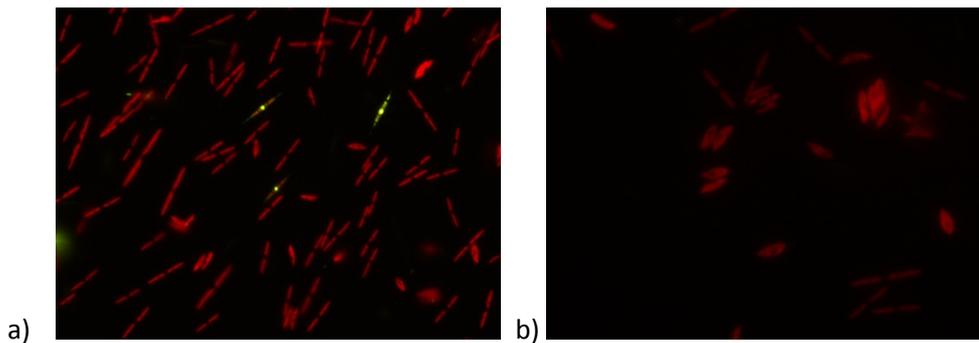


Figura 41. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 3) a concentración 50:0,1 (50 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X, donde se aprecian células en su mayoría viables y alguna célula inviable donde destaca el color verde más intenso de algún orgánulo en el interior de las células y b) observada a 630X donde se aprecian células viables

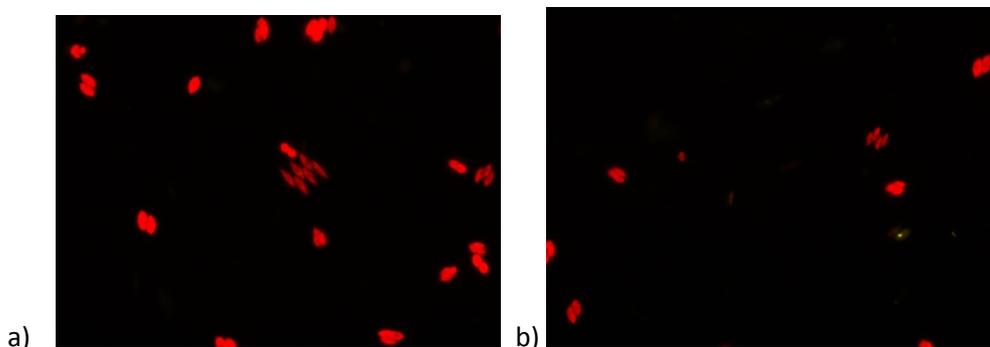


Figura 42. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala de laboratorio a concentración 50:0,1 (50 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X donde se aprecian células viables y b) observada a 400X, viéndose células verde poco visibles debido a la pérdida de coloración tras la exposición prolongada a la luz del microscopio.

Concentración 50:0,1 (50 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox) - Tratamiento térmico (control negativo)
→ (5,5 μ L Sytox/mg SST):

Respecto a las pruebas con tratamiento térmico (Figura 43, 44 y 45) se observa que todas las células son de color verde predominando la fluorescencia de los orgánulos con respecto al resto de la célula, que no es tan brillante. La mayor parte de especies de algas tienen cloroplastos de gran tamaño en el interior de las células que emiten mayores fluorescencias, enmascarando al resto de célula, por ello se observan células verdes con orgánulos más fluorescentes en el interior. (Pouneva, I., 1997). La coloración verde se va perdiendo a lo largo del tiempo tal y como se muestra en la Figura 46, que reproduce fotografías de la misma imagen a lo largo del tiempo. En este caso, no se ven células sumamente fluorescentes deslumbrantes como en otras muestras. A 630x se aprecian mayores diferencias entre los orgánulos, que se ve verde o amarillento, y el resto de célula rojo, pero la coloración se pierde mucho más rápido a estos aumentos, lo mismo ocurre a 1000x.

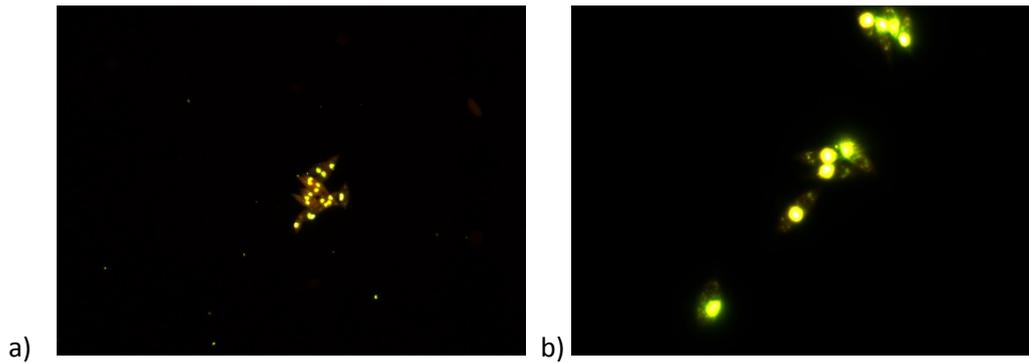


Figura 43. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (TM) a concentración 50:0,1 (50 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X, donde se aprecia un conjunto de células inviables con orgánulos de un color más fluorescente y b) observada a 1000X, donde se ven los orgánulos del interior de la célula de color más deslumbrante que el resto de la célula

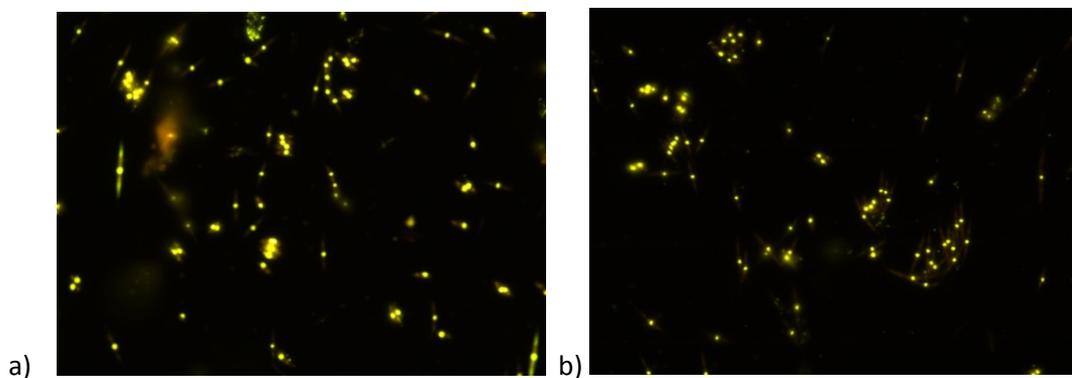


Figura 44. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR 3) a concentración 50:0,1 (50 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X donde se aprecian células inviables con orgánulos más fluorescentes en el interior de la célula y b) observada a 400X donde ya se forman flóculos debido al tratamiento térmico

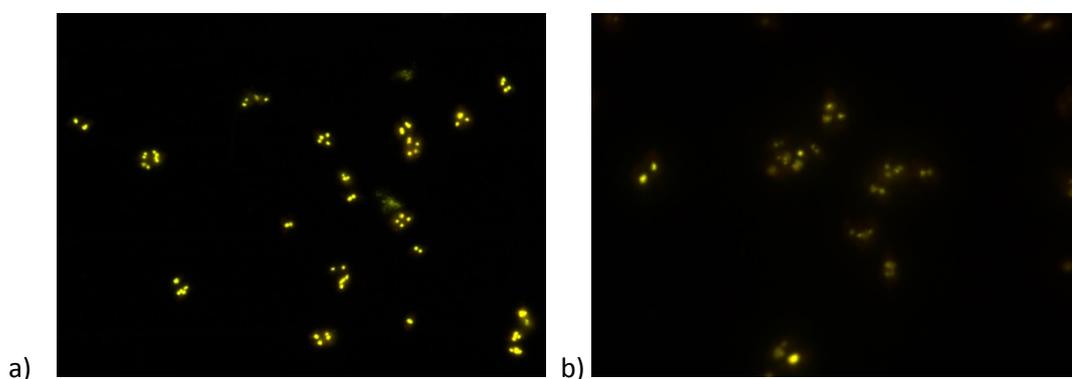


Figura 45. Muestra térmica procedente del reactor a escala de laboratorio a concentración 50:0,1 (50 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), a) observada a 400X donde se aprecian células inviables y b) observada a 630X, donde se aprecian células inviables con orgánulos verdes más intenso en su interior.

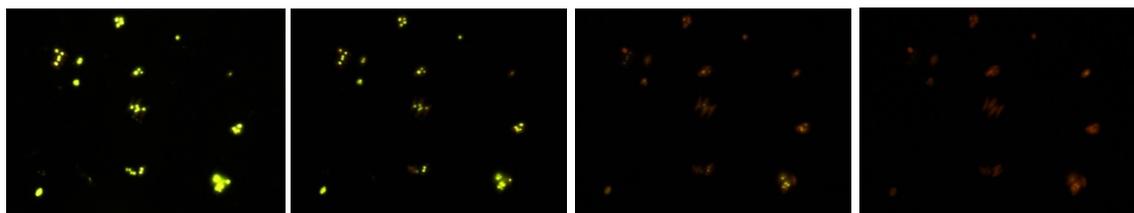


Figura 46. Pérdida de coloración verde a lo largo del tiempo. Entre cada imagen transcurre el tiempo de 10 segundos.

En la tabla 10 se muestra un resumen de todos los resultados obtenidos:

V muestra / V Colorante (μL muestra:μL Sytox)	μL Sytox/mg SST	Sin tratamiento (muestra fresca)	Tratamiento Térmico
0 (Blanco)	-	Células rojas	Células marrones – anaranjadas, debido a la pérdida de actividad de la clorofila después del tratamiento térmico.
1:1	2777,7	Problemas de homogeneización, Demasiada tinción	Problemas de homogeneización. Sobretinción
1:1 con 50 μL H ₂ O	2777,7		No se observaron resultados
1:0,1	277,7	Problemas de homogeneización, Demasiada tinción	Problemas de homogeneización. Sobretinción
5:0,1	55,5	Demasiada tinción	Demasiado brillo, muy verde, mucha tinción. Sobretinción
10:0,1	27,7	Demasiada tinción	Demasiado brillo en la muestra. Sobretinción
25:0,1	11,1	Visualización de la muestra adecuada	Verde aceptable, aunque todavía demasiado intenso
50:0,1	5,5	Visualización de la muestra adecuada	Verde correcto

Tabla 10. Resumen de las pruebas a distinta relación Volumen de muestra/Volumen de Sytox, para muestras sin tratamiento y muestras térmicas

Por todo lo comentado anteriormente se concluye que la relación Volumen de muestra/Volumen de colorante (Sytox) adecuada es de 25:0,1 o de 50:0,1 (en este caso de 5,5 a 11,1 μL Sytox/mg SST) ya que a esta relación en las muestras sometidas a un tratamiento térmico, todas las células quedan teñidas de verde, se identifican correctamente las células, no se producen sobretinciones que impidan la visualización correcta de la muestra y por tanto no deslumbran. Todo ello permite un enfoque adecuado del campo de visión del microscopio y un recuento posterior representativo.

4.1.4. Concentración Sytox - Concentración SST

Tras realizar pruebas concentrando muestra procedente del sistema a escala planta piloto (FBR 3) para determinar si a concentraciones de SST mayores la relación volumen de muestra-volumen de Sytox (25:0,1 y 50:0,1) sigue siendo adecuada los resultados obtenidos son los siguientes:

a) Muestras sin tratamiento térmico a concentración 25:0,1 y 50:0,1

En la muestra sin tratamiento térmico (356 mg/L) tanto a concentración 25:0,1 (11,2 μ L Sytox/mg SST) como a concentración 50:0,1 (5,6 μ L Sytox/mg SST) las células se visualizan correctamente. No hay sobresaturación por el tinte, ni las células se superponen permitiendo un enfoque adecuado de la muestra. En estas muestras la mayoría de las células son viables (coloración roja), aunque un pequeño porcentaje si presenta coloración verde (no viabilidad).

En las figuras 47 y 48 se muestran imágenes a 400X de muestras sin tratamiento térmico procedentes de la planta piloto, concretamente del FBR 3 a concentración 25:0,1 (Figura 47) y a concentración 50:0,1 (Figura 48).

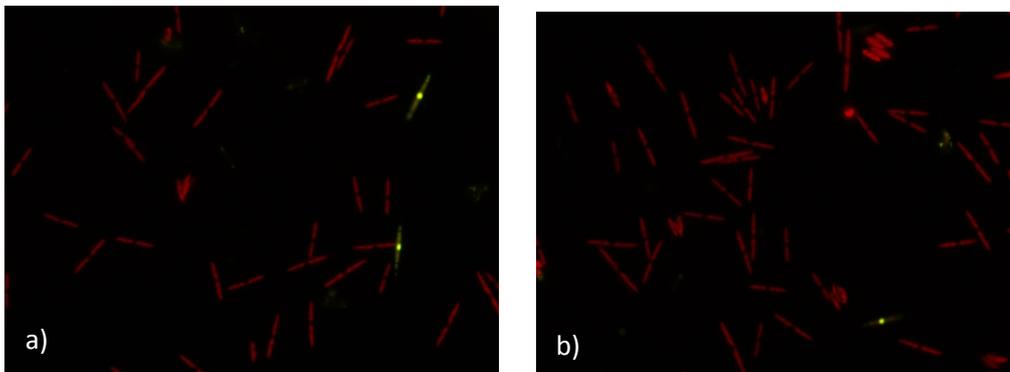


Figura 47. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a concentración 25:0,1 (25 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observadas a 400X. En la imagen a) se observa que la concentración de organismos es la adecuada, las células se visualizan correctamente y no se produce sobretinción, lo mismo ocurre en la imagen b).

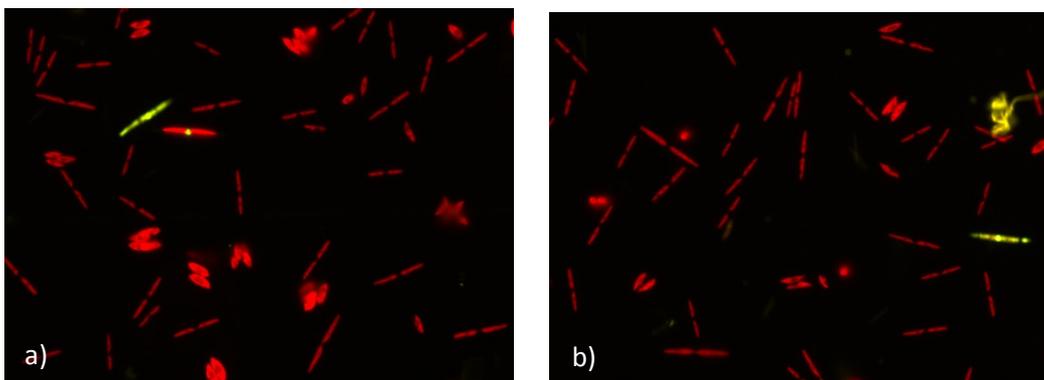


Figura 48. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a concentración 50:0,1 (50 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observadas a 400X. En la imagen a) se observa que la concentración de organismos es la adecuada, las células se visualizan correctamente y no se produce sobretinción, lo mismo ocurre en la imagen b).

En la muestra sin tratamiento térmico (712 mg/L) no se aprecian diferencias entre la concentración 25:0,1 (5,6 μL Sytox/mg SST) y 50:0,1 (2,8 μL Sytox/mg SST) (Figura 49). En estas muestras la concentración celular es muy elevada dificultando el enfoque del microscopio y por tanto la identificación y recuento. Además se observa la superposición de células en el campo de visión del microscopio.

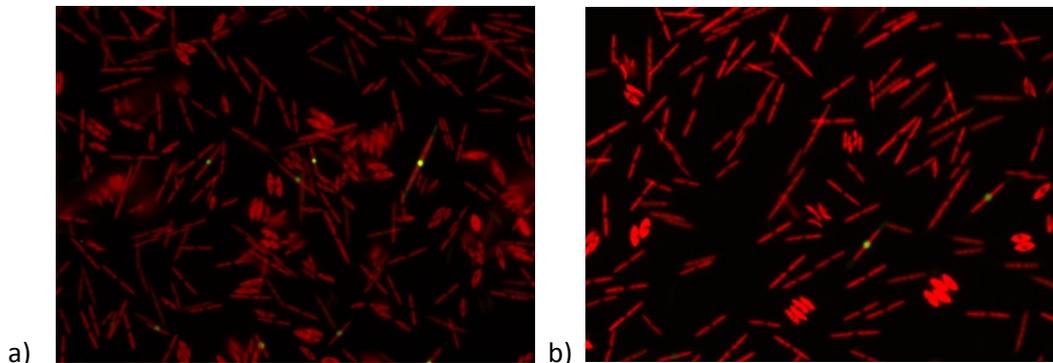


Figura 49. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a) a concentración 25:0,1 (25 μL muestra + 0,1 μL Sytox), observada a 400X y b) a concentración 50:0,1 (50 μL muestra + 0,1 μL Sytox), observada a 400X

En la muestra sin tratamiento térmico (1068 mg/L) los resultados observados son similares tanto a concentración 25:0,1 (3,7 μL Sytox/mg SST) como a 50:0,1 (1,8 μL Sytox/mg SST). Como se observa en la Figura 50, la concentración celular es muy alta. Esto impide obtener resultados representativos en los recuentos posteriores. Además la coloración verde se pierde muy rápidamente lo que dificulta el tratamiento de la muestra.

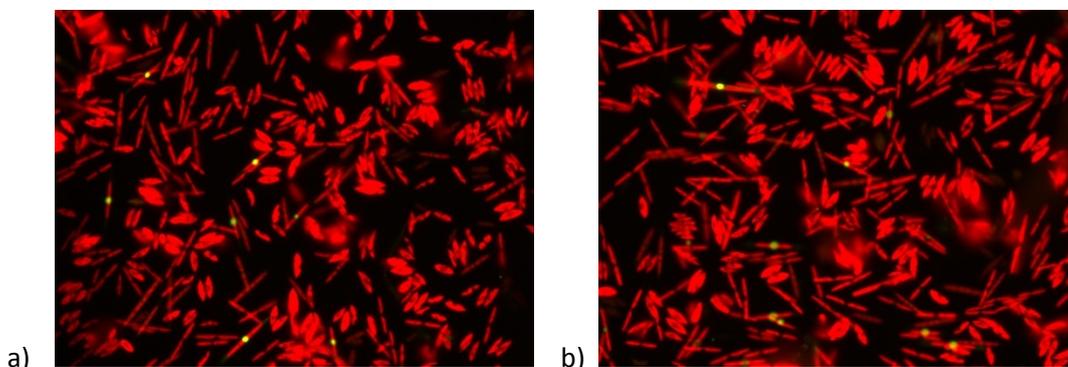


Figura 50. Muestra sin tratamiento térmico procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a) a concentración 25:0,1 (25 μL muestra + 0,1 μL Sytox), observada a 400X, b) a concentración 50:0,1 (50 μL muestra + 0,1 μL Sytox), observada a 400X

b) Muestras tras un tratamiento térmico a concentración 50:0,1

Estas pruebas se realizan con la finalidad de estudiar si a mayores concentraciones de células (concentraciones mayores de SST) el Sytox llega a teñir todas ellas o si por el contrario ya aparecen células que no llegan a teñirse.

En la muestra térmica (356 mg/L y 5,6 μ L Sytox/mg SST) (Figura 51) se observa que todos los organismos están teñidos (verde-amarillo). Esto parece indicar que la relación volumen de muestra-volumen de Sytox es suficiente para teñir todas las células. Estos resultados concuerdan una vez más con aquellos obtenidos por Pouneva (1997) en los que células con estados fisiológicos debilitados (por ejemplo, tras un tratamiento térmico), muestran una autofluorescencia de la clorofila menor, y por tanto una fluorescencia brillante más amarillenta.

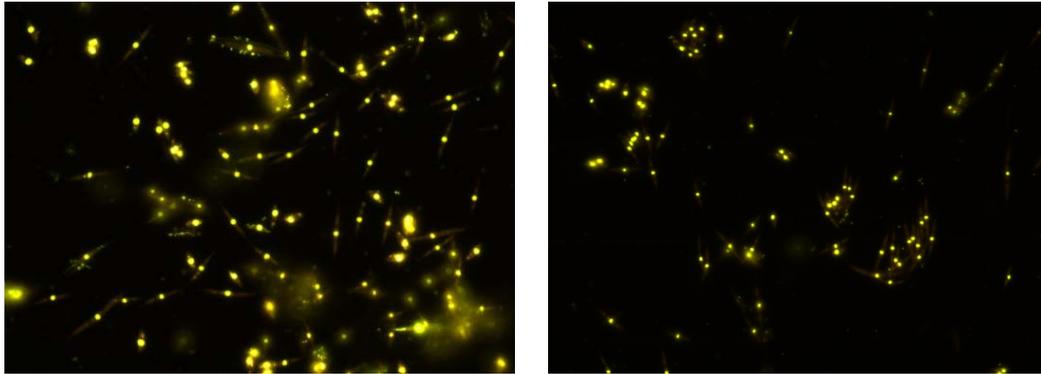


Figura 51. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a concentración 50:0,1 (50 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observadas a 400X. a) todas las células quedan teñidas de verde-amarillento. En la imagen b) puede apreciarse que comienzan a formarse flóculos.

En la muestra térmica (712 mg/L y 2,8 μ L Sytox/mg SST) (Figura 52) se observan todas las células teñidas de amarillo. La tinción en estas muestras dura más tiempo en comparación a las muestras sin tratamiento térmico. La concentración de sólidos es alta y las condiciones de operación favorecen la formación de flóculos (Figura 52 b) lo que genera superposición de células que dificultan tanto el enfoque como el recuento posterior, aunque todas las células llegan a teñirse.

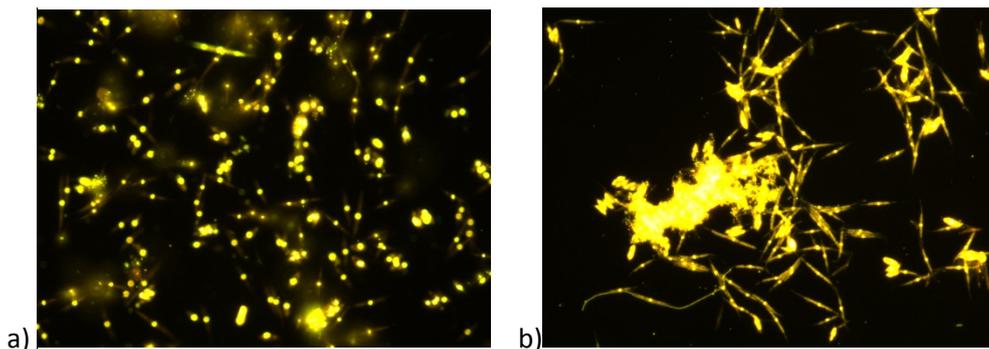


Figura 52. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a concentración 50:0,1 (50 μ L muestra + 0,1 μ L Sytox), observadas a a) 400X, donde se aprecia que la concentración de células es demasiado elevada, impidiendo un buen enfoque de la muestra, aunque todas células llegan a teñirse b) comienzo de formación de un flóculo, observado a 400X

En la muestra térmica (1068 mg/L y 1,8 μ L Sytox/mg SST) (Figura 53) todas las células están teñidas de un color amarillento. La concentración de sólidos es muy elevada. Se produce la acumulación de las células en el campo de visión y la formación de flóculos (Figura 53 b). Como ocurre en el resto de muestras térmicas, la coloración amarillenta se pierde con el tiempo,

aunque dura mucho más tiempo fijada a las células que aquellas con coloración verde más intenso.

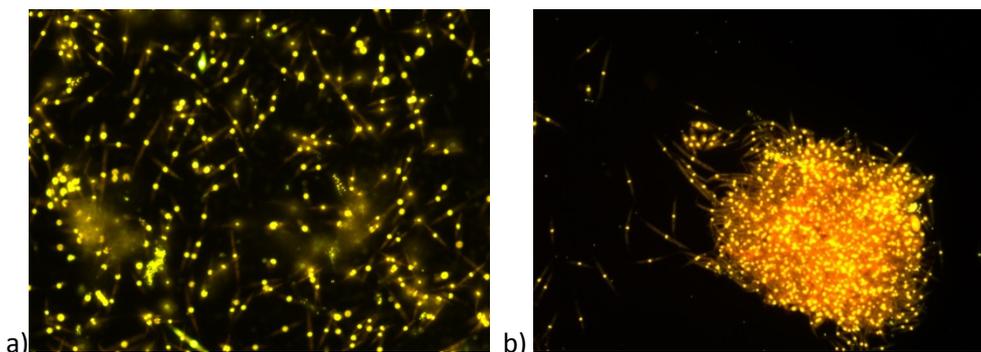


Figura 53. Muestra térmica procedente del reactor a escala planta piloto (FBR3) a concentración 50:0,1 (50 µL muestra + 0,1 µL Sytox), observadas a a) 400X, donde se aprecia que todas las células quedan teñidas, aunque la visualización se ve dificultada debido a la gran cantidad de células presentes y b) flóculo formado por acumulación de células observado a 400X

Viendo que no hay diferencias entre la tinción de células a 25:0,1 y 50:0,1 y teniendo en cuenta que a concentración de 356 mg SST/L ambas concentraciones (µL muestra/µL Sytox) permiten el recuento de las muestras de manera adecuada se decide poner a punto el método con una relación de Volumen de muestra - Volumen de Sytox de 50:0,1. Con esta relación Volumen de muestra - Volumen de Sytox se optimiza el uso del reactivo que como se comentó en el apartado 1.5 es cancerígeno y genera un residuo tóxico.

Respecto a la relación Volumen de muestra - Volumen de Sytox, las múltiples pruebas realizadas ponen de manifiesto que a mayor concentración de SST (1068 mg/L), las células no viables se tiñen de un color más amarillento y cada vez más anaranjado, mientras que si la cantidad de células no viables es menor (720-365 mg/L) adquieren un color verde brillante muy fluorescente que deslumbra y que se pierde rápidamente. Esto puede ser debido a una limitación de Sytox en estas muestras que impide la detección correcta de las células no viables. De hecho a concentraciones de 1068 mg/L ya aparecen las primeras células no teñidas.

Por último, una vez conocida la relación volumen de muestra-Volumen de Sytox óptima (50:0,1) y la concentración de SST óptima (250-400 mg/L) se relacionan ambos parámetros, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 11):

	SST (mg/L)	Sytox (µl Sytox/mg SST)	Sytox (µl Sytox/L)
Min	250	8	2000
Max	400	5	2000

Tabla 11. Relación entre la concentración de SST y la concentración de Sytox elegida

Por tanto se tiene un rango de **5-8 µL Sytox/mg SST**; o de 2000 µL Sytox/L en ese rango de concentración de SST (250-400 mg SST/L).

4.1.5. Pérdida de fluorescencia

En la mayoría de pruebas realizadas se observa una atenuación de la fluorescencia generada por el Sytox (verde-rojo) con el paso del tiempo que puede llegar a ser muy rápida.

Tras realizar pruebas con un medio de montaje para evitar esta pérdida de fluorescencia (Vectashield), se comprueba que se sigue perdiendo fluorescencia del mismo modo que ocurría con las anteriores muestras. Además el hecho de que la muestra lleve dos cubreobjetos hace que la nitidez de las células se pierda y se observe el campo mucho más difuso. Por tanto se descarta el uso del medio de montaje para método de viabilidad.

4.1.6. Parámetros óptimos establecidos

Tras las múltiples pruebas realizadas, los valores de los parámetros que permiten desarrollar y aplicar el método para la determinación de la viabilidad correctamente son los siguientes:

Tiempo de incubación (Minutos)	Concentración SST (mg/L)	Relación Volumen muestra (μl)- Volumen Sytox (μl)	Concentración de Sytox	
			(μl Sytox/mg SST)	(μl Sytox/L)
5	250-400	50:0,1	5-8	2000

Tabla 12. Valores establecidos de los parámetros objeto de estudio

Como se muestra en la tabla 12, el tiempo de incubación de las muestras con Sytox es de 5 minutos, la concentración de SST en la muestra debe estar comprendida entre 250-400 mg SST/L, la relación entre el volumen de muestra y el volumen de Sytox utilizado es de 50:0,1 en este rango de concentraciones de SST y la concentración de Sytox debe estar comprendida entre 5-8 μl Sytox/mg SST o 2000 μl Sytox/L en este rango de concentración de SST.

4.1.7. Confirmación del funcionamiento del método

Una vez establecidos los valores de los parámetros que permiten desarrollar y aplicar el método para la determinación de la viabilidad correctamente se plantea comprobar la validez del mismo con un grupo de muestras de distinta procedencia (Apartado 3.2.3.). Los resultados se describen a continuación:

a) Botella 1: Blanco (formada por fango y agua):

Esta muestra, caracterizada como blanco por no añadir algas externas, está formada por 300 mL de fango del digestor anaerobio de la EDAR del Carraixet y 100 mL de agua, tiene una concentración de SST de 18562 mg/L y una concentración de SSV de 10780 mg/L (58,08% de SV).

Tras realizar las diluciones (1:50) para adecuar la concentración de SST al rango seleccionado (250-400 mg/L) se observa que la concentración elegida es la adecuada ya que el número de células que se ve es el adecuado para realizar recuentos de viabilidad. Por tanto el rango de SST establecido para el método de viabilidad mediante Sytox es satisfactorio para diferentes tipos de muestra.

Respecto al blanco de la muestra de fango y agua, en el que no se incluye Sytox (Figura 54), se observa coloración roja, fluorescencia típica de la clorofila, aunque la coloración no es tan intensa como en otro tipo de muestras, esto puede ser debido al tratamiento anaerobio que han sufrido las células que puede haberlas dañado haciendo que su coloración sea menos intensa.



Figura 54. Blanco de muestra procedente de fango y agua, dilución 1:50, observado a 400X

Respecto a la prueba realizada con fango con agua a 50:0,1 (50 μL de muestra y 0,1 μL de Sytox) y 5,3 μL Sytox/mg SST, como se observa en la Figura 55, casi todas las células tienen coloración verde. Como ocurre con el resto de muestras, esta coloración se pierde muy rápido, por lo que se debe realizar el recuento rápidamente y con poca intensidad de luz. Todas las células llegan a teñirse a estas concentraciones, lo que concuerda con los datos obtenidos con las muestras utilizadas para poner a punto el método (muestras procedentes de la planta piloto y la planta de laboratorio). De los datos obtenidos se deduce que tras una digestión anaerobia las algas presentes mueren.

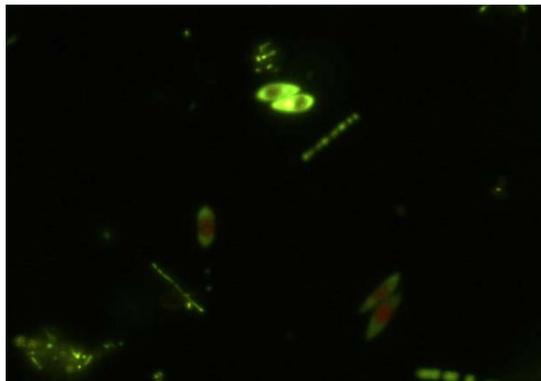


Figura 55. Muestra procedente de fango con agua, con sytox 50:0,1 (50 μL de muestra y 0,1 μL de Sytox), dilución 1:50, concentración 5,38 μL Sytox/mg SST, observada a 400X

b) Botella 2: Algas (formada por fango y algas)

Esta muestra está formada por 300 mL de fango del digestor anaerobio de la EDAR del Carraixet y 100 mL de algas, tiene una concentración de SST de 18030 mg/L y una concentración de SSV de 10462 mg/L (58,03% de SV).

Como ocurre con la muestra formada por fango y agua, tras realizar las diluciones (1:50) para adecuar la concentración de SST al rango seleccionado (250-400 mg/L) se observa que la concentración elegida es la adecuada ya que el número de células es el adecuado para realizar recuentos de viabilidad.

Respecto al blanco de la muestra de fango con algas sin Sytox (Figura 56), las células se ven de un color más marrón, no un rojo tan intenso, lo que puede indicar que debido al tratamiento anaerobio que han sufrido las células, estas son inviables y por tanto la clorofila pierde la fluorescencia rápidamente.



Figura 56. Blanco de muestra procedente de fango con algas, dilución 1:50, observada a 400X

Respecto a la prueba realizada con fango con algas 50:0,1 (50 μ L de muestra y 0,1 μ L de Sytox) y 5,5 μ L Sytox/mg SST, como se observa en la figura 57 casi todos los organismos presentan una coloración verde, por tanto indica que la mayoría son células inviables. Aunque aparecen zonas más borrosas debido a la acumulación de materia presente en el fango, las células llegan a verse perfectamente, permitiendo un recuento y posterior cálculo de viabilidad satisfactorio. Según los datos obtenidos, parece ser que tras una digestión anaerobia las algas presentes en la muestra mueren.

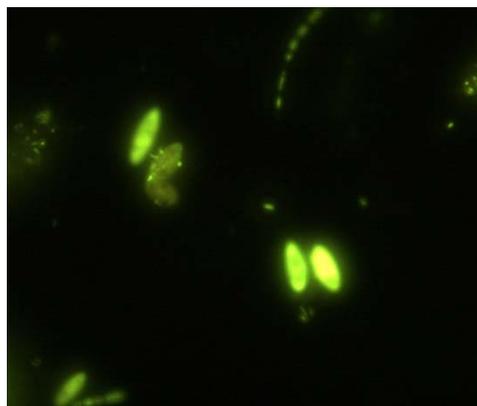


Figura 57. Muestra procedente de fango con algas con Sytox 50:0,1 (50 μ L de muestra y 0,1 μ L de Sytox), dilución 1:50, concentración 5,54 μ L Sytox/mg SST, observada a 400X

Por tanto se ha podido aplicar satisfactoriamente el método de viabilidad mediante Sytox a muestras distintas aplicando los rangos establecidos previamente de SST (250-400 mg SST/L), tiempo de incubación de las muestras de 5 minutos, relación volumen de muestra-volumen de Sytox 50:0,1 (50 μ L de muestra y 0,1 μ L de Sytox), y concentración final de Sytox en las muestras de 5,3 μ L Sytox/mg SST para la muestra de fango y agua y de 5,5 μ L Sytox/mg SST para la muestra de fango y algas.

El hecho de poder llevar a cabo las identificaciones de organismos viables y no viables correctamente para estas muestras externas evidencia que el método de análisis de viabilidad mediante Sytox es un método que puede utilizarse para distintos tipos de muestras.

4.2. Correlación estadística

Una vez realizados los cálculos estadísticos con 181 muestras para comprobar si existe una correlación estadística entre la concentración de SST presente en cada muestra y la absorbancia de dicha muestra, que permita saber si se puede prescindir del cálculo de SST, se han obtenido los siguientes resultados:

Coefficiente de Correlación	Absorbancia 680 nm	Absorbancia 750 nm
SST	0,21	0,16
SSV	0,22	0,19

Tabla 13. Correlación estadística entre la absorbancia a 680 nm y 750 nm y los SST y SSV

Como se muestra en la Tabla 13, la correlación estadística entre la concentración de SST o SSV y la absorbancia es estadísticamente significativa pero con un valor de coeficiente muy bajo (aproximadamente de 0,2). Esto puede ser debido a dos motivos, el primero de ellos que no se disponga de una serie de datos lo suficientemente grande como para comprobar que el coeficiente aumenta o, el segundo, a que dicha relación no sea lineal. Por tanto, la medida de SST o SSV es necesaria y no puede ser sustituida por la de absorbancia de la muestra para aplicar el método de la viabilidad con Sytox.

Este resultado era de esperar debido a que en las aguas residuales se pueden encontrar muchos componentes que pueden afectar a la absorbancia.

4.3. Error del método

Tras medir la viabilidad de las algas presentes en una muestra se estima que las fuentes de incertidumbre para esta medición son las siguientes:

- a) Error causado por las pipetas
- b) Error de la cámara Neubauer
- c) Error debido a la repetitividad

- a) Error causado por las pipetas

En las siguientes tablas se recogen las tolerancias de micropipetas dadas por el fabricante.

Según datos del fabricante, el error sistemático (exactitud) y el error aleatorio (precisión) de estas pipetas es el siguiente:

Rango volumétrico	Volumen	Desviación sistemática		Desviación aleatoria	
10-100µL	10	± 3%	±0,3 µL	± 1%	±0,1 µL
	50	± 1%	±0,5 µL	± 0,3%	±0,15 µL

Tabla 14. Error sistemático y error aleatorio de las pipetas Eppendorf Research

En la tabla 14 se observa que el error sistemático y el error aleatorio de la pipeta Eppendorf Research 10- 100 µL para la dosificación de 50 µL es del ± 1% (± 0,5 µL) y de ± 0,3% (± 0,15 µL) respectivamente. Para la dosificación de 10 µL los errores son de ± 3% (±0,3 µL) y ± 1% (±0,1 µL) respectivamente.

Rango volumétrico	Volumen	Desviación sistemática		Desviación aleatoria	
0,1-2	0,1	± 6%	0,006 µL	± 5%	0,005 µL

Tabla 15. Error sistemático y error aleatorio de las pipetas Socorex Acura 825

En la tabla 15 se observa que el error sistemático y el error aleatorio de la pipeta Socorex Acura 825 0,1-2 µL para la dosificación de 0,1 µL (mínimo volumen) es del ± 6% (± 0,006 µL) y de ± 5% (± 0,005 µL) respectivamente.

En la tabla 16 se muestran los errores sistemáticos (exactitud) y errores aleatorios (precisión) para cada pipeta utiliza en el método:

PIPETAS	Volumen	Desviación sistemática		Desviación aleatoria	
SYTOX	0,1	± 6%	± 0,006 µL	± 5%	±0,005 µL
MUESTRA+SYTOX	10	± 3%	±0,3 µL	± 1%	±0,1 µL
MUESTRA	50	± 1%	±0,5 µL	± 0,3%	±0,15 µL

Tabla 16. Error sistemático y error aleatorio causado por las pipetas

b) Error de la cámara Neubauer

Según la casa comercial (LO – Laboroptik) el error de la cámara Neubauer es del $\pm 2\%$, que corresponde a un volumen de $\pm 0,2 \mu\text{L}$.

c) Error debido a la repetitividad

Para el cálculo de la incertidumbre causada por la repetitividad, se han realizado 10 repeticiones con muestra procedente del FBR 4.

A continuación se muestran las pruebas realizadas para el cálculo de la incertidumbre causada por la repetitividad.

Muestras	Cel/Microlitro		
	TOTALES VIVAS	TOTALES MUERTAS	TOTAL
1	4530	445	4975
2	3680	565	4245
3	3190	505	3695
4	3340	355	3695
5	4280	475	4755
6	3700	530	4230
7	3410	545	3955
8	3130	545	3675
9	2980	605	3585
10	4000	540	4540
Promedio	3624	511	4135
Desviación Típica	514	71	495
% Coef. Variación (%CV)	14	14	12
Varianza	263893	5032	245428

Tabla 17. Pruebas realizadas para el cálculo de la incertidumbre causada por la repetitividad

En la tabla 17 se observa que la desviación típica del total de células es de 495 por tanto la incertidumbre típica causada por la repetitividad es de $\pm 495 \text{ cel}/\mu\text{L}$

Error total: El error en este caso viene dado por la incertidumbre típica causada por la repetitividad. El resto de errores nombrados (error sistemático y aleatorio producido por el uso de las pipetas y la cámara Neubauer) están incluidos dentro del error debido a la repetitividad ya que éstos se utilizan para el cálculo de las repeticiones realizadas.

En la tabla 18 se muestran los errores (sistemáticos y aleatorios) producidos a lo largo del proceso de medición.

	Volumen	Exactitud		Precisión	
		Desviación sistemática		Desviación aleatoria	
SYTOX	0,1	± 6%	±0,006 µL	± 5%	±0,005 µL
MUESTRA+SYTOX	10	± 3%	±0,3 µL	± 1%	±0,1 µL
MUESTRA	50	± 1%	±0,5 µL	± 0,3%	±0,15 µL
CÁMARA	10µL	± 2%	±0,2 µL		
ERROR METODO (REPETITIVIDAD)				± 12%	±495 cel/µL

Tabla 18. Errores producidos a lo largo del proceso de medición

En este caso, el error total del método viene dado por la incertidumbre típica causada por la repetitividad, por tanto el error del método puede llegar a ser del 12 %.

También se han calculado los porcentajes de error producidos a lo largo de todo el proceso de medición. Estos errores están incluidos dentro del cálculo de la incertidumbre causada por la repetitividad.

Cabe destacar que los errores sistemáticos (exactitud) se pueden reducir mediante el calibrado periódico de pipetas y los errores aleatorios (precisión) se pueden reducir mediante el uso adecuado de los materiales (pipetas), reduciéndose este error hasta un 12%. La incertidumbre típica causada por la repetitividad puede reducirse aumentando el número de repeticiones realizadas de una misma muestra. Aunque a priori estos errores pueden parecer elevados, están dentro del rango de errores de otros métodos de cuantificación similares.

Al carecer de un patrón de viabilidad, no se ha podido calcular la precisión del método.

4.4. Relación entre método de cálculo de viabilidad mediante Sytox y recuentos por epifluorescencia en membranas de policarbonato

Como el objetivo es comparar los dos métodos se calculan los parámetros estadísticos que describen los resultados para cada uno de los principales grupos de microalgas encontrados en las muestras tanto para los recuentos realizados en cámara Neubauer (1) como en membranas de policarbonato (2).

	Diatomeas 10 ⁶ (cel/L)		<i>Scenedesmus</i> 10 ⁶ (cel/L)		<i>Monoraphidium</i> 10 ⁶ (cel/L)		ET (Eucariotas Totales) 10 ⁶ (cel/L)	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Media	63	9	5623	5709	1086	1241	6772	6846
Desviación típica	44	13	4231	4061	2371	2308	3825	3568
CV	69	154	75	71	218	186	56	52
P50	56	0	4815	5429	48	136	6141	6118

Tabla 19. Media, desviación típica, coeficiente de variación (CV) y percentil 50 (P50) para los recuentos de los distintos organismos presentes en las muestras con la cámara Neubauer (1) y las membranas de policarbonato (2).

En la tabla 19 se observa que los grupos de microalgas de *Scenedesmus*, *Monoraphidium* y ET no muestran muchas diferencias en sus valores descriptivos. No sucede lo mismo para las diatomeas, que en el caso de los recuentos con membrana de policarbonato los valores son inferiores.

Tras el análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados proporcionados por un método y el otro se obtienen los siguientes resultados (tabla 20):

ANOVA	F	Sig
Diatomeas	44,31	0,000
<i>Scenedesmus</i>	0,01	0,932
<i>Monoraphidium</i>	0,07	0,792
Eucariotas Totales (ET)	0,02	0,889

Tabla 20. Resultados obtenidos del análisis de la varianza (ANOVA)

Para la variable diatomeas el nivel de significatividad es menor que 0,05 con lo cual se rechaza la hipótesis de igualdad de grupos. Para el resto de variables (*Scenedesmus*, *Monoraphidium* y ET) el nivel de significatividad es mayor de 0,05 con lo cual se acepta la hipótesis nula de igualdad de varianza. Esto evidencia que no hay diferencias significativas en los resultados proporcionados por los recuentos realizados con la cámara Neubauer y aquellos procedentes de membranas de policarbonato.

Respecto a las diatomeas, el hecho de que no se observe igualdad de grupos puede ser debido a que aparecen muy pocas células en este tipo de muestras y quizá el número de diatomeas totales recontado no llega al mínimo para que sea representativo de la población de la muestra.

Una vez obtenidos los resultados puede decirse que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos tras realizar la viabilidad mediante Sytox y aquellos procedentes del método de epifluorescencia. Puesto que con el método de viabilidad mediante Sytox se proporciona más información (valores sobre la viabilidad de los distintos grupos de microalgas presentes en una muestra), se recomienda el uso de ésta.

4.5. Aplicación de la metodología desarrollada

Una vez puesto a punto el método de análisis de viabilidad se procede a aplicar la técnica, para comprobar si esta herramienta permite hacer un seguimiento del FBR y relacionar abundancia y viabilidad con los parámetros operacionales y la eliminación de nutrientes. Para ello se analizan 74 muestras del FBR 4 correspondientes al periodo comprendido entre el 10/04/2014 y el 14/07/2014.

En cuanto a las condiciones del FBR 4, la temperatura media es de 24°C, oxígeno disuelto de 9 mg/L y pH medio de 7,5. Los mayores valores de intensidad lumínica se registran al comienzo del periodo de estudio (29,14 E/m²), a partir de entonces se produce una disminución gradual

de la luz hasta valores medios de 17 E/m² al final del periodo de estudio. El agua afluyente muestra valores de P_PO₄ de 5 a 8 mg/L y de N_NH₄ de 40 a 60 mg/L.

Las condiciones de operación en la planta a lo largo del periodo de estudio son:

El TRC y el TRH al comienzo del periodo de estudio es de 5,5 días; el día 09/05/2014 se aumenta a 10 días, y posteriormente, a partir del 24/05/2014 se mantiene el TRC en 10 días y se va modificando el TRH hasta valores de 6 días. Estos parámetros se mantienen hasta el final del periodo de estudio. (Figura 58).

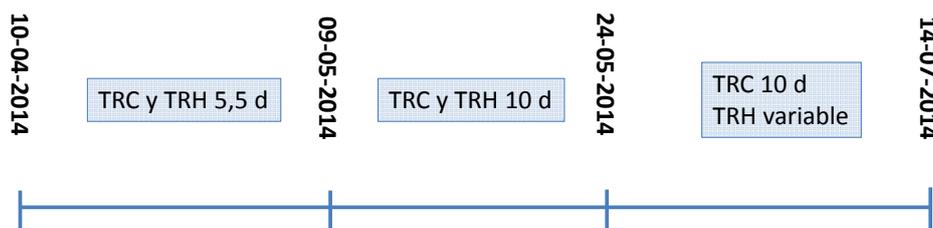


Figura 58. TRC y TRH en el FBR 4 para el periodo de estudio comprendido entre el 10/04/2014 y el 14/07/2014

Al comienzo del periodo de estudio se llena el FBR 4 con 100 L de cultivo procedentes del FBR 2 en el que aparecen diatomeas, *Scenedesmus sp.* y *Monoraphidium sp.* (con porcentajes de abundancia de <1%, 32% y 68% respectivamente), y los 400 L restantes con efluente de la planta de membranas anaerobia. Durante 5 días no se introduce alimento (efluente de la planta de membranas anaerobia) en el tanque, hasta el día 16/04/2014, momento en que se ponen en marcha los TM y se procede a alimentar el tanque diariamente. Al observar visualmente que el contenido del FBR 4 está empeorando (aumento de turbidez, cambio de coloración, aparición de flóculos,...), el día 02/05/2014 se vacía dejando 150 L de algas y se rellenan los 350 L restantes con efluente de la planta de membranas anaerobia. Al ver que el aspecto visual no mejora, el 05/05/2014 se vacía completamente el FBR 4 y se llena con efluente de la planta de membranas anaerobia, para el día 06/05/2014 añadir 3 L de algas procedentes el reactor de laboratorio (la composición está formada en su mayoría por *Scenedesmus sp.* (93%) diatomeas (6%) y *Monoraphidium sp.* (1%)). No se alimenta hasta el día 09/05/2014, momento a partir del cual se purga y se alimenta en discontinuo, manteniendo un TRC de 10 días. El 22/05/2014 se conecta el FBR en continuo con un TRC y TRH de 10 días, a partir del 24/05/2014 se fija el TRC y se modifica el TRH hasta valores de 6 días. Estas condiciones se mantienen hasta el final del periodo de estudio. En la Figura 59 se muestra un esquema del proceso de operación de FBR 4.

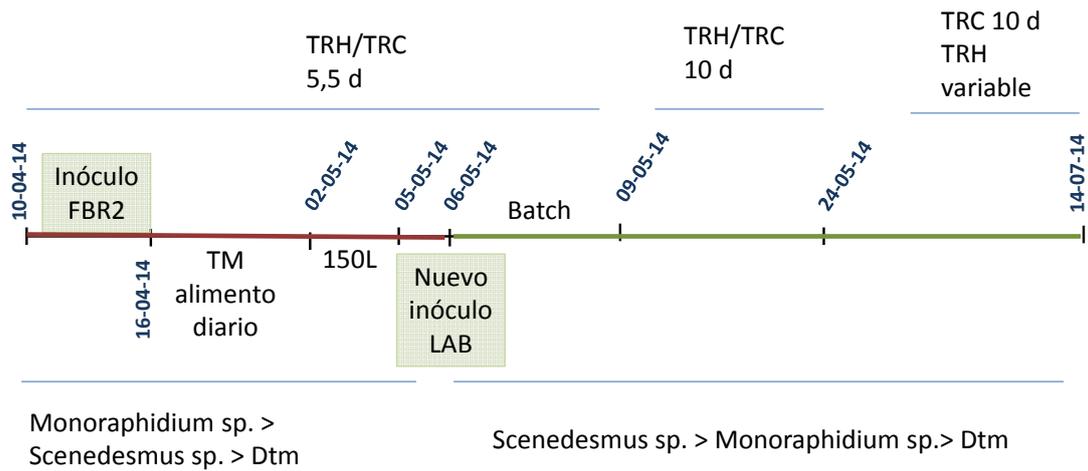


Figura 59. Esquematzación del proceso de operación del FBR 4.

Respecto a la composición de la comunidad de microalgas del FBR 4 obtenida mediante el método desarrollado en el presente trabajo, los principales grupos taxonómicos encontrados son diatomeas, *Scenedesmus sp.* y *Monoraphidium sp.*, estos dos últimos pertenecientes a la clase Chlorophyceae.

La Figura 60 describe los cambios encontrados para cada periodo de estudio.

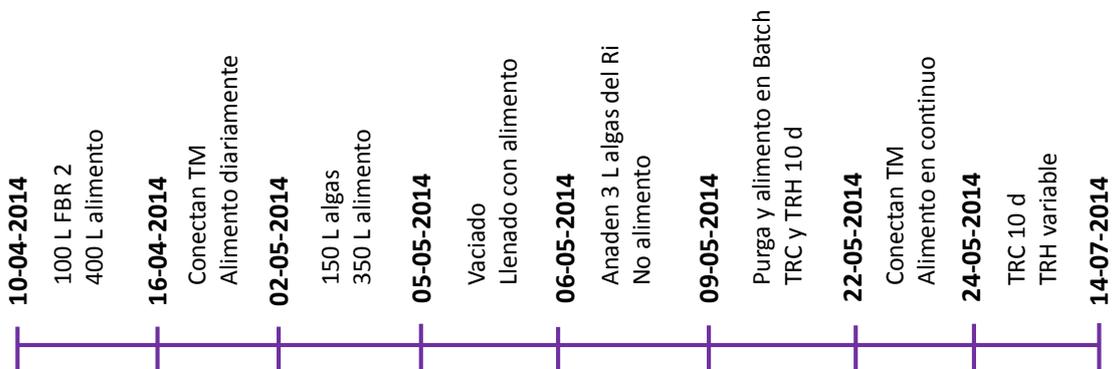


Figura 60. Periodos y condiciones de operación observados

A continuación se muestran los gráficos que representan la densidad celular (Figura 61 a), el porcentaje de abundancia (Figura 61 b) y el porcentaje de Viabilidad (Figura 62) en el FBR 4 para el periodo de estudio comprendido entre el 10/04/2014 y el 14/07/2014.

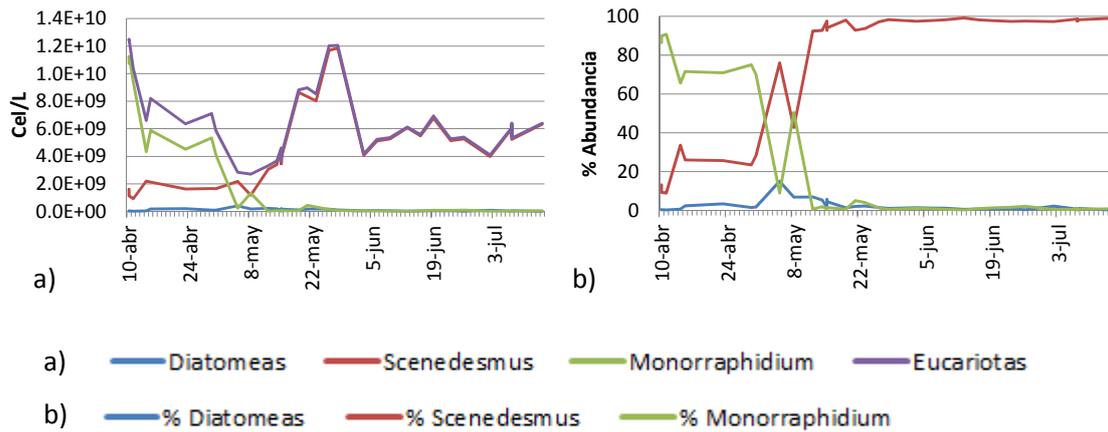


Figura 61. a) Densidad celular y b) % de abundancia en el FBR 4 para el periodo de estudio comprendido entre el 10/04/2014 y el 14/07/2014

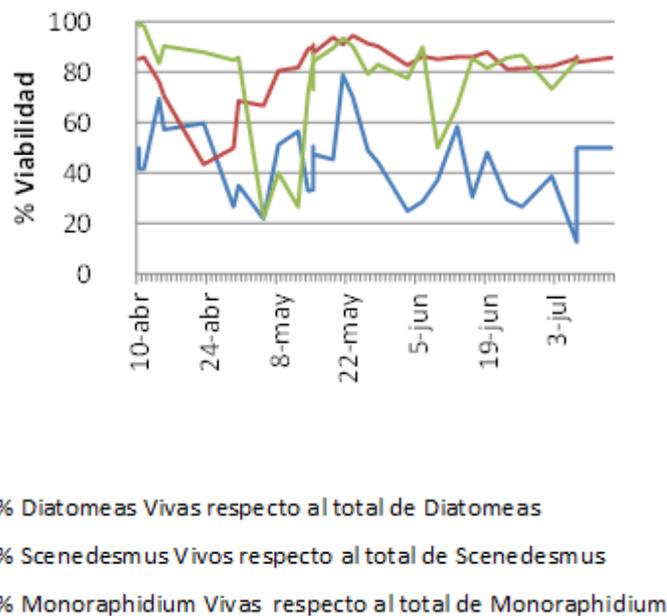


Figura 62. % Viabilidad en el FBR 4 para el periodo de estudio comprendido entre el 10/04/2014 y el 14/07/2014

En los primeros días del seguimiento (10-16/10/2014) (Figura 61) el grupo que domina la comunidad es *Monoraphidium sp.* ($1,0 \cdot 10^{10}$ Cel/L que corresponde al 87% de abundancia). La abundancia de *Scenedesmus sp.* es del 11% y de diatomeas del 2 %. En este periodo la viabilidad de cada especie es del 98% para *Monoraphidium sp.* 85 % para *Scenedesmus sp.* y 50 % para Diatomeas. Respecto a la eliminación de nutrientes, se encuentran valores del 50% de eliminación para N_T y valores del 60 % para PO_4 y NH_4 .

A partir del 16/04/2015 se conectan los TM y se procede a alimentar el tanque diariamente. En este periodo (16/04/2014 a 02/05/2014) la abundancia de *Monoraphidium sp.* disminuye a valores del 75% mientras que la abundancia de *Scenedesmus sp.* aumenta a 23% y diatomeas se mantiene constante (2 % abundancia). La viabilidad de *Monoraphidium sp.* y *Scenedesmus sp.* desciende a valores de 85% y 44% respectivamente mientras que la viabilidad de diatomeas aumenta a 70%. Respecto a la eliminación de nutrientes, esta disminuye al 40% para PO_4 y N_T y aumenta al 75% para NH_4 .

En el periodo del 02/05/2014 al 09/05/2014 se produce una inversión y son los organismos del género *Scenedesmus sp.* los que comienzan a dominar la comunidad. Esto es debido a que se vacía completamente el FBR 4 y se llena con efluente de la planta de membranas anaerobia, para posteriormente el día 06/05/2014 añadir 3 L de algas procedentes el reactor de laboratorio (valores de abundancia de *Scenedesmus* cercanos al 100%), por tanto el cambio de población es debido a la adición del nuevo inculo, aumentando el género *Scenedesmus sp.* (90% abundancia) en detrimento de *Monoraphidium sp.* (2% abundancia). En relación con las diatomeas, se produce un aumento de población hasta valores de $4,0 \cdot 10^8$ Cel/L (8% abundancia) en el momento del cambio de población. La viabilidad de *Monoraphidium sp.* y diatomeas desciende a 22% en ambos casos, mientras que la viabilidad de *Scenedesmus sp.* aumenta a valores de 80%. En cuanto a la eliminación de nutrientes, los niveles de eliminación de PO_4 y N_T descienden al 20% y aumenta al 90% para NH_4 .

En el periodo del 09/05/2014 al 22/05/2014 el FBR se encuentra en discontinuo con un TRC y TRH de 10 días. En este caso la abundancia de *Monoraphidium sp.* y *Scenedesmus sp.* se mantiene constante y la abundancia de diatomeas desciende a valores similares a los del comienzo del estudio ($5,0 \cdot 10^7$ Cel/L que corresponde al 1% de abundancia). Los valores de viabilidad aumentan para los tres taxones (80% *Monoraphidium sp.*, 90% *Scenedesmus sp.* y 80% diatomeas). La eliminación de N_T continúa al 20%, la eliminación de NH_4 desciende al 50% y la eliminación de PO_4 aumenta al 40%.

Del 22 al 24/05/2014 se conectan los TM y se alimenta en continuo. La abundancia de *Monoraphidium sp.* y diatomeas se mantiene constante, mientras que la abundancia de *Scenedesmus sp.* continúa aumentando hasta alcanzar el máximo el día 24/05/2014 ($1,2 \cdot 10^{10}$ Cel/L, 95% abundancia). La viabilidad de *Monoraphidium sp.* y *Scenedesmus sp.* es del 90% y para diatomeas desciende al 50%. Respecto a la eliminación de nutrientes, aumenta en el caso de N_T y NH_4 al 40% y 80% respectivamente, mientras que disminuye en el caso de PO_4 a 35%.

Del 24/05/2014 al final del periodo de estudio (14/07/2014) se mantiene constante el TRC en 10 días y se modifica el TRH hasta 6 días. En este periodo la abundancia de *Monoraphidium sp.* y diatomeas continúa constante y los *Scenedesmus sp.* se estabilizan en valores de densidad celular en torno a $5,5 \cdot 10^9$ Cel/L que corresponden a valores cercanos al 100% de abundancia. En cuanto a la viabilidad, tanto *Monoraphidium sp.* como *Scenedesmus sp.* continúan con una viabilidad del 90% y las diatomeas mantienen una viabilidad variable de 25% a 60%. La eliminación de PO_4 y N_T es de 40%, y la eliminación de NH_4 es del 90%.

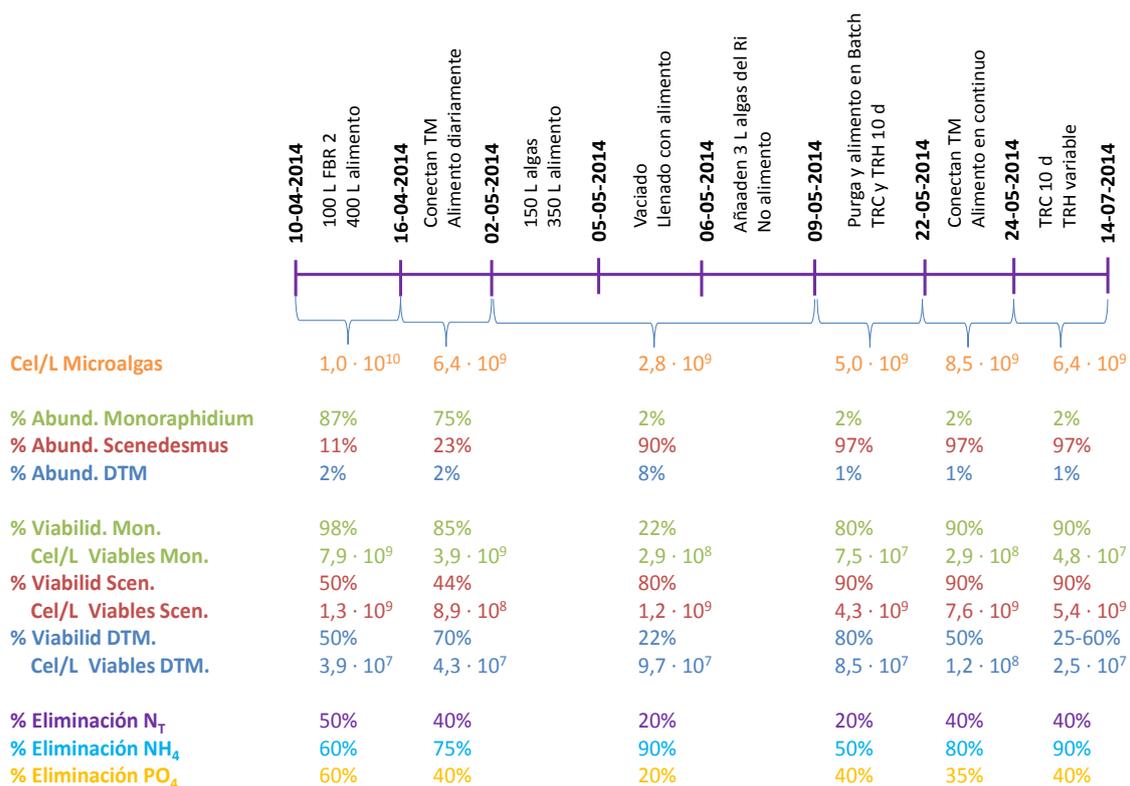


Figura 63. Periodos de similares condiciones de operación y resultados obtenidos.

Como se observa en la Figura 63, con respecto al N_T, disminuye la eliminación al disminuir la abundancia de *Monoraphidium sp.* Parece ser que esta disminución se ve favorecida con la disminución de la viabilidad de *Monoraphidium sp.* ya que al comienzo del periodo de estudio la viabilidad de *Monoraphidium sp.* es elevada (98%, que se corresponde con $7,9 \cdot 10^9$ Cel viables/L), al igual que la eliminación de N_T (50%). Al disminuir la viabilidad de *Monoraphidium sp.* (22% viables y una abundancia de $7,5 \cdot 10^7$ Cel viables/L) disminuye a su vez la eliminación de N_T (20%), y al aumentar la viabilidad de *Monoraphidium sp.* aumenta la eliminación de N_T. También puede observarse que la eliminación de N_T disminuye al disminuir la concentración de microalgas (Cel/L) totales en el FBR.

Con respecto al NH₄, se observa que aumenta su eliminación a mayores abundancias de *Scenedesmus sp.* En este caso parece ser que la eliminación se ve favorecida al aumentar la viabilidad de *Scenedesmus sp.* A mayores porcentajes de viabilidad de *Scenedesmus sp.* (80-90%) y mayores abundancias de Cel viables/L se producen mayores porcentajes de eliminación de NH₄ (75-80%), aunque en este caso la evolución de ambas no se encuentra tan ligada como en el caso de la viabilidad de *Monoraphidium sp.* y la eliminación de N_T, ya que en el periodo del 09 al 22/05/2014 la viabilidad de *Scenedesmus sp.* es elevada (90%, y $4,3 \cdot 10^9$ Cel viables/L) mientras que la eliminación de NH₄ ha descendido (50%).

Con respecto al PO₄, se observa que sigue una relación similar a los *Monoraphidium sp.*, es decir, disminuye la eliminación de PO₄ al disminuir la viabilidad de *Monoraphidium sp.* Al comienzo del periodo de estudio la viabilidad de *Monoraphidium sp.* es elevada (98%, que se corresponde con $7,9 \cdot 10^9$ Cel viables/L), al igual que la eliminación de PO₄ (60%), al disminuir la viabilidad de *Monoraphidium sp.* (22% viables y una abundancia de $7,5 \cdot 10^7$ Cel viables/L)

disminuye a su vez la eliminación de PO_4 (20%), y al aumentar de nuevo al final del periodo de estudio la viabilidad de *Monoraphidium sp.* (90%, y $5,4 \cdot 10^9$ Cel viables/L) aumenta la eliminación de PO_4 (40%).

Por tanto, con respecto a la viabilidad de las microalgas en este FBR, después del estudio realizado puede decirse que la eliminación de N_T y PO_4 se ven favorecidas al aumentar la viabilidad de *Monoraphidium sp.*, mientras que la eliminación de NH_4 se ve favorecida al aumentar la viabilidad de *Scenedesmus sp.*

Aunque los valores medios de viabilidad celular en este FBR son del 90 % para *Scenedesmus sp.* y 80% para *Monoraphidium sp.* parece ser que *Monoraphidium* se ve más afectada a las condiciones de operación del FBR 4, produciéndose mayores fluctuaciones en su viabilidad.

En cuanto a las diatomeas, aunque no son un taxón dominante en este FBR, se observa que aumenta su abundancia en el momento del cambio de población de *Monoraphidium sp.* a *Scenedesmus sp.*, manteniendo una viabilidad variable en todo el periodo de estudio (de 22% a 80%). Parece ser que en condiciones cambiantes (cambio de población) se produce un mayor crecimiento de este tipo de microalgas, mientras que en cultivos estables su abundancia es menor.

Tras los recuentos se ha visto que estas dos especies (*Monoraphidium sp.* y *Scenedesmus sp.*) van alternándose la dominancia de la comunidad de microalgas y son las principales especies responsables de las fluctuaciones en la eliminación de nutrientes en el FBR. Este mismo comportamiento ha sido descrito por otros autores, los cuales indican que ambos organismos son de crecimiento rápido (Rodrigo et al. 2007).

5. Conclusiones

Tras realizar las distintas pruebas para determinar la viabilidad de las algas en muestras de agua residual mediante Sytox Green, se obtienen las siguientes conclusiones.

Respecto al tiempo de incubación se considera 5 minutos el tiempo adecuado para muestras con un rango de SST entre 250-400 mg/L.

En relación a los SST se considera que la concentración óptima, para evitar el solapamiento de los organismos o la falta de ellos, se encuentra en un rango entre 250-400 mg/L. Teniendo en cuenta que el porcentaje de SSV en las muestras objeto de estudio es del 90 %, el rango de concentración de SSV será desde 225 mg/L a 360 mg/L.

Respecto a la relación volumen de muestra-Volumen de Sytox óptima, teniendo en cuenta las concentraciones de SST de 250-400 mg/L, se considera que la relación 50:0,1 (50 μ L muestra y 0,1 μ L Sytox) es la más adecuada porque garantiza la tinción de todos los organismos de la muestra y evita la sobretinción que impide una buena visualización. Además esta concentración optimiza el uso del Sytox (menos residuo).

Relacionando la concentración de SST con la concentración de Sytox óptimas elegidas se ha encontrado un rango de 5 μ L Sytox/mg SST a 8 μ L Sytox/mg SST; o de 2000 μ L Sytox/L en ese rango de concentración de SST (250-400 mg/L).

La atenuación de la fluorescencia con el tiempo se puede regular con una intensidad de luz incidente adecuada en el microscopio.

Este método puede utilizarse para distintos tipos de muestra, adecuando la concentración de SST de la muestra al rango descrito anteriormente (250-400 mg/L). Esto ha sido comprobado utilizando distintas muestras procedentes de fangos anaerobios, obteniendo unos resultados satisfactorios.

La medida de la absorbancia no parece ser un método fiable para estimar la concentración de SST en la muestra ya que la correlación estadística obtenida es significativa pero con un valor muy bajo (0,2 aprox.). Por tanto, la medida de SST o SSV es necesaria y no puede ser sustituida por la de absorbancia de la muestra para aplicar el método de la viabilidad con Sytox.

En cuanto al error del método, éste puede llegar a ser del 12% teniendo en cuenta la incertidumbre típica causada por la repetitividad. El error sistemático y aleatorio producido por las pipetas y la cámara Neubauer están incluidos dentro del error causado por la repetitividad debido a que éstos se utilizan para el cálculo de las repeticiones realizadas.

Los errores sistemáticos (exactitud) se pueden reducir mediante el calibrado periódico de pipetas y los errores aleatorios (precisión) se pueden reducir mediante el uso adecuado de los materiales. Además la incertidumbre causada por la repetitividad, puede reducirse aumentando el número de repeticiones realizadas a una misma muestra. Aunque a priori estos errores pueden parecer elevados, están dentro del rango de errores de otros métodos de cuantificación similares.

Al carecer de un patrón de viabilidad, no se ha podido calcular la precisión del método.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos tras realizar la viabilidad mediante Sytox y aquellos procedentes del método de epifluorescencia. Puesto que con el método de viabilidad mediante Sytox se proporciona más información (valores sobre la viabilidad de los distintos grupos de microalgas presentes en una muestra), se recomienda el uso de ésta.

Tras los recuentos se ha visto que *Monoraphidium sp.* y *Scenedesmus sp.* van alternándose la dominancia de la comunidad de microalgas y son las principales especies responsables de las fluctuaciones en la eliminación de nutrientes en el FBR.

Con respecto a la viabilidad de las microalgas en el FBR 4, después del estudio realizado puede decirse que la eliminación de N_T y PO_4 se ven favorecidas al aumentar la viabilidad de *Monoraphidium sp.*, mientras que la eliminación de NH_4 se ve favorecida al aumentar la viabilidad de *Scenedesmus sp.*

6. Bibliografía

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., Ibrahim, I. B. M., 2012. Agricultural importance of algae. *African. J. Biotech.*, 11 (54): 11648-11658
- Allen, J. C., 1988. Sodium and potassium contents and viability of mouse mammary gland tissue and acini. *J. Dairy Sci.*, 71(3): 633-642.
- APHA, AWWA, WEF, 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. American Public Health Association, Washington, D. C.
- Beattie, G. M., Butler, C., Hayek, A., 1994. Morphology and function of cultured human fetal pancreatic cells transplanted into athymic mice: a longitudinal study. *Cell Transplant.*, 3(5): 421-425.
- Carini, R., Autelli, G., Bellomo, G., Dianzani, E., Albano, E., 1995. Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxin. *Biochim Biophys Res Commun.*, 206: 180-185.
- Carini, R., Bellomo, G., De Cesaris, M. G., Albano, E., 1997. Glycine protect against hepatocyte killing by KNC or hypoxia by preventing intracellular Na⁺-overload in the rat. *Hepatology J.*, 26: 107-112.
- Carini, R., De Cesaris, M. G., Splendore, R., Bagnati, M., Bellomo, G., Albano, E., 2000. Alterations of Na⁺-homeostasis in hepatocyte reoxygenation injury. *Biochim Biophys Acta.*, 1500: 297-305.
- Coco-Martin, J. M., Oberink, J. W., Van der Velden-de Groot, T. A., Beuvery, E. C., 1992. Viability measurements of hybridoma cells in suspension cultures. *Cytotechn.*, 8(1): 57-64.
- Da Costa, A. O., De Assis, M. C., Marques De, A., Plotkowski, M. C., 1999. Comparative analysis of three methods to assess viability of mammalian cells in culture. *Biocell.*, 23(1): 65-72.
- De la Noüe, J., Lalibereté, G., Proulx, D., 1992. Algae and wastewater. *J. Appl. Phycol.*, 4, 247-254.
- Fernández-Segura, E., Cañizarez, F. J., Cubero, M. A., Campos, A., Warley, A., 1999. A procedure to prepare cultured cells in suspension for electron probe X-ray microanalysis: application to scanning and transmission electron microscopy. *J. Microscopy.*, 196: 19-25.
- Friemert, C., Erfle, V., Strauss, G., 1998. Preparation of radiolabeled cDNA probes with high specific activity for rapid screening of gene expression. *Methods Mol. Cell Biol.*, 1: 143-153.
- Gerstein, M., Lesk, A. M., Chothia, C., 1994. Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochem.*, 33(22): 6739-6749.
- Giuliano, K. A., Post, P. L., Hahn, K. M., Taylor, D. L., 1995. Fluorescent protein biosensors: Measurement of molecular dynamics in living cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 24: 405-434.

- Giuliano, K. A., Taylor, D. L., 1998. Fluorescent-protein biosensors: new for drug Discovery. *Trend Biotechnol.*, 16(3): 135-140.
- Gress, T. M., Hoheisel, J. D., Lennon, G. G., Zehetner, G., Lehrach, H., 1992. Hybridization fingerprinting of high-density c DNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome.*, 3(11): 609-619.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J. P., 2012. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass and bioen.*, 40 105-111.
- JCGM 100: 2008. Evaluación de datos de medición: Guía para la expresión de la incertidumbre de medida. Centro Español de Metrología. Edición digital 1 en Español.
- Lund, J.W.G., Kipling, C., Le Cren, ED., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobio.*, 11(2): 143-170.
- Molecular probes, Inc. Invitrogen detection technologies. SYTOX® Green Nucleic Acid Stain. 2006
- Park, C., Moon, D. O., Ryu, C. H., Choi, B., Lee, W., Kim, G. Y., Choi, Y., 2008. Beta-sitosterol sensitizes MDA-MB-231 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Acta Pharmacol Sin.*, 29(3): 341-348.
- Posadas, I., Vellecco, V. Santos, P. Prieto-Lloret, J., Ceña, V., 2007. Acetaminophen potentiates staurosporine-induced death in a human neuroblastoma cell line. *Br. J. Pharmacol.*, 150(5): 577-585.
- Pouneva, I., 1997. Evaluation of algal culture viability and physiological state by fluorescent microscopic methods. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 23(1-2): 67-76.
- Rai, L.C., Gaur, J.P., Kumar, H.D., 1981. Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Rev.*, 56, 99-151.
- Redalje, D.G., Duerr, E.O., De la Noüe, J., Mayzaud, P., Nonomura, A.H., Cassin, R.C., 1989. Algae as ideal waste removers: biochemical pathways. In: Huntley, M.E. (Ed.), *Biotreatment of Agricultural Wastewater*. Press, Boca, Raton, CRC, pp. 91–110.
- Reynolds, C. 2006. *Ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rodríguez-Morata, A., Garzón, I., Alaminos, M., 2008. Cell Viability and Prostacyclin Release in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Ann Vasc Surg.*, 22(3): 440-448.
- Roomans, G. M., 2002. X-ray microanalysis or epithelial cell sinculture. *Methods Mol Biol.*, 188: 273-289.
- Round, F.E., Crawford, RM., Mann, DG., 1990. *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press., 747.
- Sato, M., Murata, Y., Mizusawa, M., Iwahashi, H., Oka, S., 2004. A simple and rapid dual-fluorescence viability assay for microalgae. *Microbiol. Cult. Collect.*, 20: 53–59

Shiah, F.K., Shuh-Ji, Kao., Gwo-Ching, Gong., Kon-Kee, Liu., 1996. Spatial variability of phytoplankton production and the implications of its controlling mechanisms in the coastal zone near the river mouth of the Lanyang Hsi. *Botanical Bulletin of Academia Sinica.*, 37: 9-15.

Sieburth, J., Smetacek, V., Lenz, J., 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.*, 23:1256-1263.

Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1995. Wastewater treatment with microorganisms. The commercial Press (H.K.) Ltd. 2D Finnie St. Quarry Bay, Hong Kong.

Tomas, C.R., 1997. Identifying Marine Phytoplankton. (Eds.) Academic Press.

Vantanouvong, V., Hogman, M., Roomans, G. M., 2003. In vitro and in situ experimental model for X-ray microanalysis of intestinalepithelium. *Microsc Res Tech.*, 62: 211-217

Venrick, E.L., 1978. How many cells to count? En: Sournia, A. (Ed.), *Phytoplankton Manual UNESCO.*, pp.167-180.

Warley, A., 1997. X-ray microanalysis for biologists. Practical methods in electron microscopy. St ed. Cambridge: Portland Press.

Warley, A., Cracknell, K. P. B., Cammish, H. B., Twort, C. H. C., Ward, J. P. T., Hirst, S. J., 1994. Preparation of cultured airway smooth muscle for study of intracellular element concentrations by X-ray microanalysis: comparison of whole cells with cryosections. *J. Microsc.*, 175, 143-153

Wiesel, J. M., Gamiel, H., Vlodaysky, I., Gay, I., Ben-Bassat, H., 1983. Cell attachment, growth characteristics and surface morphology of human upper-respiratory tract epithelium cultured on extracellular matrix. *Eur J Clin Invest.*, 13(1): 57-63.

Wong, D. C., Wong, K. T., Lee, Y. Y., Morin, P. N., Heng, C. K., Yap, M. G., 2006. Transcriptional profiling of apoptotic pathways in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng.*, 94(2): 373-382.

Zierold, K., 1997. Effects of cadmium on electrolyte ions in cultures rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 144: 70-76.