

CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA POBLACIÓN BACTERIANA DE BIOMASA ALGAL CRECIDA EN AGUAS RESIDUALES



AUTORA:

María Maté González

TUTORAS:

Silvia Bolado Rodríguez

Sonia Martínez Páramo

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del
Medio Ambiente

JULIO 2018

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA	4
1.2 OBJETIVO	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.1 PRETATAMIENTOS.....	11
2.1.1 PRETRATAMIENTO TÉRMICO	12
2.1.2 PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO CLORHÍDRICO	12
2.1.3 PRETRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO	12
2.1.4 PRETRATAMIENTO ALCALINO-PERÓXIDO	13
2.1.5 PRETATAMIENTO CON MOLINO DE BOLAS.....	13
2.1.6 PRETRATAMIENTO DE EXPLOSIÓN DE VAPOR	14
2.1.7 PRETATAMIENTO CON ULTRASONIDO	14
2.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	15
2.3 EXTRACCIÓN DE ADN	16
2.3.1 Reactivo PMA	18
2.3.2 Control positivo	18
2.4 ELECTROFORESIS SOBRE UN GEL DE AGAROSA.....	19
2.5 qPCR - quantitative polymerase chain reaction	22
2.6 Cuantificación de ADN.....	24
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS y DISCUSIÓN	26
3.1 PRETRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y PRETRATAMIENTO TÉRMICO.....	26
3.1.1 Pretratamiento con peróxido de hidrógeno.....	28
3.1.2 Pretratamiento térmico.....	33
3.2 PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO CLORHÍDRICO	33
3.3 PRETRATAMIENTO CON MOLINO DE BOLAS Y PRETRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO.....	36
3.3.1 Pretratamiento con molino de bolas	38
3.3.2 Pretratamiento con hidróxido de sodio	41
3.4 PRETRATAMIENTO DE EXPLOSIÓN DE VAPOR	42
3.5 PRETRATAMIENTO CON ULTRASONIDOS	47

4. CONCLUSIONES	51
5. BIBLIOGRAFÍA.....	55

RESUMEN

En este trabajo se analiza el efecto esterilizante sobre las poblaciones de bacterias presentes en la biomasa microalgal crecida en fotobiorreactores de tratamiento de aguas residuales. Así, se ha estudiado la presencia de bacterias vivas en biomasa sin pretratar, biomasa pretratada aplicando distintas alternativas y biomasa sometida a hidrólisis enzimática. Los pretratamientos evaluados han sido físicos, químicos y combinados: térmico, ácido, básico, alcalino-peróxido, molino de bolas, explosión de vapor y ultrasonidos; seguidos en todos los casos por hidrólisis enzimáticas. Para ello, se ha extraído el ADN de todas las muestras y se ha evaluado la supervivencia de bacterias. Esta evaluación se ha realizado de forma cualitativa mediante una electroforesis en un gel de agarosa y, cuando ha sido posible, de forma cuantitativa, mediante una qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) utilizando PMA (Propidio Monoazida). Los pretratamientos con un mayor efecto esterilizante resultaron térmico, ácido, básico, y molino de bolas. La hidrólisis enzimática degrada el ADN de las bacterias.

Palabras Clave: bacteria, microalga, agua residual, pretratamiento, viabilidad.

ABSTRACT

This work studies the sterilization of bacteria of algal biomass cultivated in photobioreactor with residual water. Therefore, the presence of live bacteria in biomass without pretreatment, biomass pretreated by applying different alternatives and biomass subjected to enzymatic hydrolysis has been studied. The pretreatments evaluated were physical, chemical and combined: thermal, ball mill, ultrasound, alkaline-peroxide, acid, basic, and steam explosion, followed in all cases by enzymatic hydrolysis. For this, the DNA of all the samples has been extracted and the survival of bacteria has been evaluated. This evaluation has been carried out qualitatively by means of electrophoresis in an agarose gel and, when possible, quantitatively, by means of a qPCR (quantitative polymerase chain reaction) using PMA (Propidium Monoazide). The pretreatments with a greater sterilizing effect were acid, basic, thermal and ball mill. Enzymatic hydrolysis degrades the DNA of bacteria.

Keywords: Bacteria, microalgae, wastewater, pretreatment, viability.

1. INTRODUCCIÓN

En este apartado del trabajo se desarrollan tanto la presentación del problema que se busca solventar en este Trabajo de Fin de Grado como los objetivos que se deben cumplir.

1.1 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA

En la sociedad actual existe una demanda creciente de materias primas y de energía debido al aumento de la población mundial y al gran desarrollo de actividad industrial. Los recursos naturales disponibles son escasos y las principales fuentes de energía tradicionales, los combustibles fósiles, presentan una serie de desventajas como su alto impacto ambiental y su aumento de precio de forma continua. Es necesario buscar nuevas materias primas y fuentes de energía alternativas, renovables y viables económicamente que permitan un desarrollo sostenible.

En contraposición, otro de los retos a los que se enfrenta la sociedad es la generación de una importante cantidad de residuos. Estos desechos contienen unas elevadas concentraciones de materia orgánica y nutrientes, difíciles de depurar y gestionar, que los convierte en una materia prima idónea para la obtención de bioproductos y para la producción de energía.

Este trabajo se enmarca en un proyecto que trata de buscar una solución conjunta de los dos problemas, planteando obtener materia prima y energía a partir de aguas residuales que, además, permita la recuperación de las sustancias con alto valor añadido y de agua de calidad suficiente para ser reutilizada.

Las aguas residuales contienen una alta concentración de carbono orgánico, y de nutrientes como el fósforo, P, y el nitrógeno, N. Es necesario depurar el agua residual debido al importante impacto ambiental que conlleva el vertido de estos compuestos. Las técnicas convencionales para eliminar estos nutrientes requieren de varias etapas que suponen una gran inversión de tiempo, elevados gastos de funcionamiento y el uso de ciertos productos químicos, como el metanol, que suponen un elevado gasto de energía. Como alternativa, se han propuesto algunas otras soluciones biológicas como el tratamiento de aguas residuales utilizando fotobiorreactores basados en microalgas. En estos reactores crecen consorcios de microalgas y bacterias que trabajan simbióticamente en la acumulación de materias orgánicas y nutrientes.

Las microalgas son organismos microscópicos, unicelulares y eucariotas. Existen diversos tamaños y tipos de microalgas. Las microalgas se desarrollan en medios acuáticos y son inocuas. En sus procesos metabólicos requieren alto

contenido de sustancias inorgánicas lo que las convierte en una solución muy interesante para tratar las aguas residuales. Dichas microalgas fijan CO₂, N y P, utilizando como fuente de energía el sol, por medio de la fotosíntesis. Se convierten así en un elemento muy eficiente, utilizando la energía solar para producir biomasa. La biomasa algal utilizada en este trabajo está compuesta mayoritariamente por la especie *Scenedesmus*.

Una vez absorbidos CO₂, N y P, se almacenan dentro de las células de las microalgas en forma de carbohidratos, proteínas y lípidos. Las microalgas consiguen eliminar aproximadamente un 80% del nitrógeno del agua residual lo que evita que sean necesarios los procesos de desnitrificación y decantación aplicados tradicionalmente a estas aguas.

Para conseguir liberar y recuperar los diferentes componentes acumulados en la biomasa, es necesario aplicar distintos pretratamientos que rompan su pared celular. Con un adecuado pretratamiento de la biomasa algal se podrían obtener proteínas, carbohidratos y lípidos que son sustancias con un alto valor añadido. La composición de la biomasa algal varía mucho en función de las condiciones de operación del fotobiorreactor, y de la época del año, hallándose en muy amplios rangos, de entre un 6 y un 52 % de proteínas; entre un 5 y un 23 % de lípidos; y entre un 7 y un 50 % de carbohidratos (Tijani et al., 2017).

Los pretratamientos a utilizar en la ruptura de la pared celular de biomasa algal no han sido muy estudiados, pero podrían aplicarse algunos similares a los utilizados con otros materiales como la biomasa lignocelulósica o los lodos activados y primarios. Estos pretratamientos se pueden clasificar como mecánicos (ultrasonidos, molienda, lisis - centrifugación, cizalla líquida, placa de colisión, trituración, etc.), biológicos, hidrólisis térmica y química (oxidación, tratamientos alcalinos, etc.). Además, una vez rota la pared celular es necesario realizar una hidrólisis enzimática que permita liberar los componentes acumulados en la biomasa (Isabel et al., 2013).

Las microalgas se convierten de este modo en una biomasa, fuente de energía verde de gran interés para ser utilizadas en el tratamiento de aguas residuales. Sus ventajas sobre otros tratamientos son que las microalgas se pueden cultivar en tierras no cultivables; no compiten, por tanto, con los cultivos destinados a la nutrición humana; y su tasa de crecimiento es más rápida que la de las plantas convencionales.

Se están llevando a cabo en la actualidad investigaciones sobre la potencialidad del cultivo masivo de microalgas y su conversión en fuente de energía vía biomasa. Ello conlleva la necesidad de desarrollar diversos campos tecnológicos tales como la genómica y selección de estirpes más productivas y con mayor resistencia a los agentes externos. Además de estudiar los medios de cultivo y nutrientes más aptos para el crecimiento de las microalgas, y en

especial el papel del CO₂, también es necesario alcanzar grandes productividades con inversiones reducidas. Para ello hay que estudiar la aplicación de las mejores tecnologías disponibles para cosechar y tratar las microalgas cultivadas en grandes volúmenes de medio líquido hasta obtenerlas a precios razonables. En definitiva, se trata de que las microalgas puedan ser potencialmente utilizadas como materia prima y para producir energía y biocombustibles. No obstante, debe señalarse que el proceso se encuentra aún en fase de investigación, aunque con buenas perspectivas. Las investigaciones sobre microalgas están, pues, en continuo desarrollo.

En relación con lo anteriormente comentado, desde los años 60 existe el concepto de biorrefinería (Honglay Chen and Oswald, 1998). Una biorrefinería es una planta que engloba los procesos de conversión de biomasa en bioproductos, biocombustibles y energía. A partir de la biomasa algal se podrían obtener en las biorrefinerías productos de alto valor añadido como proteínas, ácidos grasos y carbohidratos, además de biogás que actúa como biocombustible. Con la construcción de biorrefinerías, se hace sostenible la depuración de aguas residuales, se recuperan los nutrientes y se obtiene una fuente de materia prima y energía verde a diferencia de los combustibles fósiles (Morero and Campanella, 2013).

En relación con todo lo comentado, este trabajo parte de los problemas que surgen al utilizar diferentes pretratamientos para procesar la biomasa algal cultivadas en un biorreactor con aguas residuales. Tales pretratamientos tienen como objetivo la obtención de proteínas, lípidos y carbohidratos, además de metano. Durante el proceso de obtención surgen también subproductos, tales como ácido succínico, ácido butírico, ácido acético y ácido fórmico. El porcentaje de degradación de azúcares que generan estos subproductos es aproximadamente el 30 % (Martín Juárez et al., 2016). Dichos subproductos son perjudiciales ya que disminuyen el rendimiento en el objetivo final del proceso (se obtienen menores cantidades de proteínas, lípidos y carbohidratos, y metano de las deseadas) y pueden actuar como inhibidores en posteriores etapas de proceso. Presumiblemente la aparición de estos subproductos está ligada a la presencia de bacterias en la biomasa algal, que degradan los componentes valiosos que son liberados tras la ruptura celular. Debido a sus efectos perjudiciales, resulta conveniente conocer el grado de esterilización de los diferentes pretratamientos. Aquellos pretratamientos que, además de romper la pared celular de las microalgas, eliminan más bacterias, serán considerados como idóneos para recuperar y valorizar las proteínas, lípidos y carbohidratos presentes en la biomasa.

Conocer la capacidad esterilizante de los distintos pretratamientos no es algo sencillo. Las técnicas habitualmente utilizadas para determinar viabilidad celular utilizan colorantes fluorescentes, detectados generalmente mediante

microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. En las muestras analizadas en este trabajo la autofluorescencia de las microalgas interfiere directamente con los colorantes utilizados en las técnicas habituales, dificultando la cuantificación de la viabilidad bacteriana. Además los consorcios alga bacteria forman agregados que impiden la cuantificación de las bacterias. Resulta un desafío importante encontrar una buena técnica que permita la distinción entre bacterias vivas y muertas presentes en la biomasa algal. Recientemente, se han utilizado técnicas de biología molecular con este fin, en concreto, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, qPCR, que en combinación con el reactivo Propidio Monoazida (PMA), permite cuantificar el porcentaje de bacterias viables en una muestra (Desneux et al., 2015). No obstante, presenta un serio inconveniente; se encuentra limitado por la dificultad de extraer ADN de alta calidad de las microalgas pretratadas. Ello es debido a que han sido sometidas a pretratamientos para romper la pared celular de las microalgas que han podido producir una degradación del ADN. A pesar de sus limitaciones, con este método se pueden cuantificar tanto la población total bacteriana en la biomasa algal como la población bacteriana viable en la misma. Es posible, de este modo, cumplir con el objetivo de este Trabajo de Fin de Grado: evaluar la capacidad esterilizante de los distintos pretratamientos y de la hidrólisis enzimática.

1.2 OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es desarrollar una metodología de análisis y analizar cualitativa y cuantitativamente la presencia de bacterias viables y no viables en la biomasa algal cultivada en agua residual, en cuatro puntos del proceso de valorización: (i) la biomasa algal cruda, recién cosechada; (ii) después de ser pretratada; (iii) después de someter la biomasa pretratada a una hidrólisis enzimática durante 6 horas; (iv) tras someter la biomasa algal pretratada a una hidrólisis enzimática durante 12 horas.

Con este objetivo general, se plantean unos objetivos más específicos.

- Desarrollar una metodología de análisis que permita evaluar cualitativa y/o cuantitativamente las bacterias viables presentes en un consorcio de bacterias y microalgas. Para evaluar el grado de esterilización se realiza una extracción de ADN que permite mostrar la cantidad tanto de forma cualitativa como de forma cuantitativa.
- Para la evaluación cualitativa se realiza una electroforesis en un gel de agarosa. Mediante la electroforesis se puede comprobar si la extracción de ADN se ha realizado de forma correcta y si la cantidad de ADN de las muestras es acorde con los resultados esperados. La evaluación cuantitativa se realiza con una qPCR (quantitative polymerase chain

reaction), que permite cuantificar el número real de bacterias viables y no viables.

- Estudiar el efecto del tipo de pretratamiento en la viabilidad de las bacterias presentes en la biomasa algal. Los pretratamientos como ya se ha citado anteriormente sirven para romper la pared celular de las microalgas y conseguir extraer las sustancias de alto valor añadido absorbidas del agua residual: proteínas, lípidos y carbohidratos. Los pretratamientos a los que se somete la muestra son los siguientes:
 1. Pretratamiento térmico
 2. Pretratamiento con ácido clorhídrico
 3. Pretratamiento con hidróxido de sodio
 4. Pretratamiento con peróxido de hidrógeno
 5. Pretratamiento con molino de bolas
 6. Pretratamiento de explosión de vapor
 7. Pretratamiento con ultrasonidos

- Evaluar el efecto de la intensidad del pretratamiento en la viabilidad de las bacterias presentes en la biomasa algal. Los 7 tipos de pretratamientos indicados se han realizado en dos condiciones de muy diferente severidad. Teniendo en cuenta los estudios previos publicados, se ha trabajado con las condiciones más extremas entre las habitualmente empleadas y, con unas condiciones más moderadas.

- Evaluar el efecto de la etapa de hidrólisis enzimática en la viabilidad de las bacterias presentes en la biomasa algal. La realización de la hidrólisis enzimática tiene dos fines. Por un lado, seguir con la ruptura celular debido a que los carbohidratos están atrapados dentro de la pared celular, intracelularmente, en forma de almidón y celulosa. Y, por otro lado, la descomposición de almidón y celulosa, polisacáridos, a glucosa y fructosa, monosacáridos.

- Evaluar el efecto del tiempo de hidrólisis enzimática en la viabilidad de las bacterias presentes en la biomasa algal. Generalmente, un aumento en el tiempo de hidrólisis enzimática, consigue incrementar considerablemente los rendimientos de liberación y recuperación de los azúcares, lípidos y proteínas acumulados en la biomasa. Sin embargo, en las condiciones en las que se realiza la hidrólisis enzimática, es posible que exista un crecimiento apreciable de las poblaciones de bacterias presentes en la biomasa. Para evaluar el posible aumento de las bacterias viables durante la hidrólisis, los ensayos se han realizado a 6 y 12 horas.

- Evaluar el efecto de posibles residuos existentes en el líquido de pretratamiento en la viabilidad de las bacterias durante la etapa de hidrólisis enzimática.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado del trabajo se describen todos los materiales y métodos utilizados en el laboratorio para cumplir los distintos objetivos de la experimentación. La biomasa utilizada en este trabajo procede de fotobiorreactores de tratamiento de agua residual doméstica de las plantas de la Fundación Cajamar y la Universidad de Almería en Las Palmerillas (Almería). Se trata de biomasa fresca enviada refrigerada para su análisis. La especie de microalga predominante en esta biomasa es *Scenedesmus Almeriense*. Para algunos ensayos, para comprobar que las medidas se referían únicamente a poblaciones de bacterias, se ha trabajado con alga fresca *Scenedesmus Almeriense* pura. Esta alga ha sido cultivada de dos formas distintas una, en un reactor tubular la Universidad de Almería en Las Palmerillas y otra, en medios estériles en los laboratorios la Universidad de Valladolid. Se espera de ambas que estén libres de bacterias.

Los pasos realizados en el laboratorio son los siguientes:

- Primero, se toma una muestra del alga fresca, biomasa microalgal sin pretratar.
- Segundo, se pretrata la biomasa algal con alguno de los siete pretratamientos descritos más adelante en este apartado, en las condiciones de operación indicadas.
- Tercero, tanto del alga fresca como del alga pretratada se realizan dos hidrólisis enzimáticas, una con 6 horas de duración y otra con 12 horas de duración.
- Cuarto, se realizan dos extracciones de ADN tanto del alga fresca sin pretratar como de la biomasa algal pretratada y de todas las muestras sometidas a hidrólisis enzimática de 6 y 12 horas de duración. Se realizan dos extracciones de ADN de cada muestra debido a que una se realiza sin ningún reactivo añadido mientras que la otra lleva añadido Propidium Monoazide (PMA).
- Quinto, se realiza una electroforesis del ADN extraído sin PMA añadido sobre un gel de agarosa. De esta forma se puede observar de manera cualitativa el resultado de las extracciones de ADN.
- Sexto, se realiza una qPCR (quantitative polymerase chain reaction) de las extracciones con PMA y de las sin PMA. Esta técnica permite contabilizar el número de bacterias viables y el número de bacterias totales (viables y no viables).
- Por último, se cuantifica el ADN extraído en unidades de ng/ μ l utilizando un equipo denominado NanoDrop.

A continuación, se describen con mayor detalle los pasos que acaban de enumerarse.

2.1 PRETATAMIENTOS

En este subapartado se desarrollan los distintos pretratamientos realizados sobre la biomasa algal. Estos pretratamientos se utilizan para romper la pared celular de las microalgas, pudiéndose así extraer los distintos componentes macromoleculares atrapados en ellas, como son carbohidratos, lípidos y proteínas. Los pretratamientos llevados a cabo son:

1. Pretratamiento térmico:
 - 121 °C durante 1 hora
2. Pretratamiento con ácido clorhídrico:
 - HCl 0,5 M : 121 °C durante 1 hora
 - HCl 2 M: 121 °C durante 1 hora
3. Pretratamiento con hidróxido de sodio:
 - NaOH 0,5 M: 121°C durante 1 hora
 - NaOH 2 M: 121 °C durante 1 hora
4. Pretratamiento alcalino-peróxido:
 - H₂O₂ 0,5%: 50 °C 1 hora pH 11,5
 - H₂O₂ 7,5%: 50 °C 1 hora pH11,5
5. Pretratamiento con molino de bolas:
 - Bolas pequeñas (d=1,25 mm) durante 5 minutos
 - Bolas grandes (d=2,50 mm) durante 60 minutos
6. Pretratamiento de explosión de vapor:
 - 130 °C y 2,7 bar durante 5 minutos
 - 170 °C y 7,9 bar durante 20 minutos
7. Pretratamiento con ultrasonidos
 - 343 W durante 5 minutos
 - 155 W durante 21 minutos

Para llevarlos a cabo dichos pretratamientos se tienen en cuenta las siguientes consideraciones:

- Se preparan considerando un 5 % de microalga de peso seco, teniendo en cuenta la humedad de la biomasa de partida.
- Se preparan 250 g de cada condición de pretratamiento, a excepción de la explosión de vapor que la cual se utilizan 800 g, que por las condiciones de la técnica requiere un volumen mayor de muestra.
- Una vez finalizado el pretratamiento se obtiene una muestra sólido-líquida de la cual se conservan 75 ml. El resto de la muestra se centrifuga a 10.000 rpm, durante 10 minutos para separar la fracción sólida de la fracción líquida.

- La extracción de ADN se realizará de la fracción sólida.

2.1.1 PRETRATAMIENTO TÉRMICO

Este pretratamiento permite romper las paredes de las algas sin utilizar un agente químico como en los pretratamientos siguientes. El autoclave es un equipo que trabaja con calor húmedo. Para ello utiliza vapor de agua saturado de manera que permite trabajar a una temperatura concreta prefijando una presión durante un tiempo determinado.

Para llevarlo a cabo se pesan 57,5 g de microalga y se enrasa hasta los 250 g con agua destilada, en una botella de borosilicato. Esta mezcla se homogeneiza utilizando un agitador magnético. Una vez homogeneizada se introduce en el autoclave durante 60 minutos a 121°C (Martín Juárez et al., 2016). Las condiciones son las mismas que en el pretratamiento con ácido y el pretratamiento con base, permitiendo la comparación entre pretratamientos, con y sin agente químico. Es decir, sirve como referencia para los dos pretratamientos descritos a continuación.

2.1.2 PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO CLORHÍDRICO

Este pretratamiento se realiza utilizando ácido clorhídrico (HCl), que al tratarse de un ácido fuerte es capaz de romper la membrana celular, permitiendo la salida de los compuestos de interés intracelulares. El pretratamiento se realiza con dos concentraciones de ácido: 0,5 M y 2 M.

Para llevar a cabo el pretratamiento, como se ha citado con anterioridad, es necesario pretratar 250 g de suspensión. Como se sabe que el porcentaje en seco de esta biomasa es del 5 % de peso seco, es necesario pesar 57,5 g de alga. Como se hace en dos condiciones, se pesa esta cantidad en dos botellas de borosilicato de 500 ml distintas. El resto de la mezcla hasta los 250 g en la primera botella, es la disolución de HCl a 0,5 M; y en la segunda, es la disolución de HCl a 2 M, las concentraciones indicadas anteriormente. Ambas disoluciones se agitan para conseguir una mezcla homogénea, utilizando un agitador magnético. Una vez obtenidas las mezclas homogéneas se introducen en el autoclave durante 60 minutos a 121°C (Martín Juárez et al., 2018).

2.1.3 PRETRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO

La base seleccionada para realizar este pretratamiento es hidróxido de sodio (NaOH). Al igual que el ácido se trata de una base fuerte lo que la convierte en adecuada para romper la pared celular. Las dos condiciones usadas son las mismas que en el pretratamiento con ácido: 0,5 M y 2 M.

De manera exacta al ácido clorhídrico se pesan, en dos botellas de borosilicato de 500 ml, 57,5 g de microalga. Ambas botellas se rellenan hasta los 250 g cada una con la disolución de NaOH; una, con NaOH 0,5 M y otra con, NaOH

2M, concentraciones citadas. Ambas disoluciones se agitan para conseguir una mezcla homogénea, con un agitador magnético. Una vez obtenidas las mezclas homogéneas se introducen en el autoclave durante 60 minutos a 121°C (Martín Juárez et al., 2016).

2.1.4 PRETRATAMIENTO ALCALINO-PERÓXIDO

Al igual que en los pretratamientos con ácido y con base, el fin último del pretratamiento con peróxido es la ruptura de la pared celular. Para el pretratamiento se utiliza peróxido de hidrógeno, H₂O₂, a dos concentraciones: 0,5 % y 7,5 % (Bolado-Rodríguez et al., 2016).

Para preparar el pretratamiento se utilizan dos botellas de borosilicato de 500 ml y se añaden 57,5 g de microalga en cada una para cumplir la condición de 5 % en peso seco en 250 g de disolución. Para proseguir, se vierte en cada botella de borosilicato una de las dos disoluciones de peróxido de hidrógeno con las concentraciones de H₂O₂ correspondientes a las condiciones citadas, hasta alcanzar 250 g. Es necesario añadir unas gotas de antiespumante debido a que se produce gran cantidad de espuma en la reacción entre la microalga y el peróxido. Ambas disoluciones se agitan para conseguir una mezcla homogénea utilizando un agitador magnético. A continuación, se ajusta el pH, de ambas, hasta el valor de 11,5; para ello se utiliza una disolución de 2 M de NaOH. Para finalizar el pretratamiento, se introducen las botellas de borosilicato, cada una con su concentración correspondiente de peróxido, en la incubadora a 50 °C y 120 rpm durante 60 minutos. La incubadora es un equipo que permite agitar a una temperatura determinada durante un tiempo prefijado.

2.1.5 PRETRATAMIENTO CON MOLINO DE BOLAS

Un molino de bolas es un equipo cilíndrico que gira sobre su eje de manera horizontal, se llena parcialmente de bolas. Estas bolas impactan de manera brusca con las células rompiendo su pared celular y liberando el contenido intracelular. Al igual que en el resto de tratamientos se lleva a cabo en dos condiciones. Por un lado una, bolas pequeñas (d=1,25 mm) durante 5 minutos y por otro lado, bolas grandes (d=2,50 mm) durante 60 minutos (Postma et al., 2017).

Para comenzar se pesan 57,5 g de microalga y se mezclan con agua destilada hasta los 250 g. Esto se hace por duplicado para utilizar cada disolución en una condición diferente. Las dos mezclas se agitan con un agitador magnético hasta que estén homogéneas. Primero se coloca una de las mezclas en el molino y se añaden las bolas pequeñas dejándolo girar durante 5 minutos como ya se ha explicado anteriormente. Antes de someter a la muestra a la otra condición es necesario limpiar totalmente el molino. Para la segunda condición, se utiliza la otra mezcla preparada y se introduce en el molino. Se deja girar con las bolas grandes durante 60 minutos.

2.1.6 PRETRATAMIENTO DE EXPLOSIÓN DE VAPOR

La explosión de vapor consiste en un pretratamiento que engloba un proceso térmico, mecánico y químico (Bouchard et al., 1991). Esto se debe a que engloba: la ruptura de la pared celular producida por vapor de agua (térmico), la existencia de fuerzas de cizallamiento debidas a la explosión de la humedad (mecánico) y la hidrólisis de los enlaces glicósidos (químico). Por tanto, la explosión de vapor permite romper la estructura celular y extraer las sustancias químicas intracelulares. Al igual que en el resto de pretratamientos, se realiza en dos condiciones, una más fuerte y otra más débil. El tratamiento débil se realiza a 130 °C y 2,7 bar durante 5 minutos. El tratamiento fuerte se realiza a 170 °C y 7,9 bar durante 20 minutos.

Para llevar a cabo la explosión de vapor se utiliza vapor de agua saturado. Para comenzar, se fija la presión de trabajo en una caldera llena de agua al tratarse de vapor de agua saturado la temperatura viene dada por el equilibrio con esa presión. El equipo donde se realiza la explosión es un reactor de acero de 5 l (Alzate et al., 2012). La disolución que se introduce en el reactor es de 800 g para ambas condiciones. Para ello, considerando el 5 % en peso seco de microalga y el 22% de humedad, se pesan 184 g de biomasa algal y el resto, hasta 800 g es agua destilada. Esta disolución se agita hasta conseguir una mezcla totalmente homogénea con agitador magnético. Una vez que la presión fijada en la caldera llega al reactor este comienza a funcionar, y deja de entrar vapor de agua. Cuando transcurre el tiempo de operación, 5 minutos para la condición débil o 20 minutos para la condición extrema, el reactor se despresuriza de manera instantánea, abriéndose la electroválvula, lo que genera la explosión de vapor (Marcos et al., 2013). Esta disminución de presión provoca la condensación repentina de vapor de agua. Salen a través de la parte inferior del reactor, donde está situada la electroválvula, tanto la muestra introducida como el agua condensada por diferencia de presiones. Se concluye que la concentración de biomasa algal es menor debido a que se ha aumentado el volumen de muestra.

2.1.7 PRETRATAMIENTO CON ULTRASONIDO

El pretratamiento de ultrasonido se realiza en un equipo denominado UIP1000hdT. Se trata de un dispositivo ultrasónico potente y flexible, tanto para realizar pruebas en el laboratorio como para procesar líquidos a escala industrial. Se emplea en procesos de emulsión, dispersión y pulverización de partículas, lisis, extracción, disolución y reacciones sonoquímicas (Hielscher, 2018). El pretratamiento con ultrasonido se realiza a dos condiciones: por un lado, 343 W durante 5 minutos y por otro lado, 155 W durante 21 minutos. El objetivo de someter a la muestra a esta intensidad sónica es la lisis, es decir, se persigue romper partes de la pared celular o la célula completa para liberar las sustancias químicas de interés.

El proceso comienza con la preparación de dos mezclas de 57,5 g de microalga más 192,5 g de agua destilada. Ambas mezclas se dejan agitar con un agitador magnético hasta obtener una mezcla homogénea. Se introduce la primera en

la máquina de ultrasonidos, durante 5 minutos a 343 W. Este valor corresponde al porcentaje máximo de amplitud. Es necesario controlar la temperatura durante el proceso para evitar que la muestra se caliente. Para ello, se introduce el recipiente con la muestra en otro recipiente de mayor volumen que contenga agua fría. Pasados los 5 minutos de operación se apaga el equipo de ultrasonidos y se prepara todo de nuevo para la siguiente condición. La otra mezcla preparada se trata con las otras condiciones mencionadas, 155 W y 21 minutos. Este valor de potencia corresponde con un porcentaje de amplitud medio en torno al 50%.

2.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Se desarrolla en este apartado la hidrólisis enzimática de carbohidratos de biomasa de microalgas cultivadas en aguas residuales. Las microalgas pretratadas y no pretratadas se someten a una hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo en dos fases. La primera, consiste en la ruptura de la pared celular de las microalgas. Esta ruptura es necesaria debido a que los carbohidratos están atrapados dentro de la pared celular, intracelularmente, en forma de polisacáridos. La segunda se corresponde con la propia hidrólisis. Se trata de la descomposición de los polisacáridos, a glucosa y fructosa, monosacáridos.

Previamente a los ensayos de hidrólisis enzimática, las muestras de biomasa se introducen en la estufa a 105 °C durante 24 horas y se determina gravimétricamente su contenido en sólidos totales.

Se realiza la hidrólisis enzimática tanto de la fracción sólida como de la suspensión sólido-líquida del pretratamiento, con el objetivo de conocer la influencia de los posibles compuestos presentes en la fracción líquida sobre la viabilidad de las bacterias.

La hidrólisis se realiza en Erlenmeyers de 100 ml, a los que se añade la biomasa y el agua necesarias para tener 20 g de una suspensión que contenga 1,5 g sólido seco, teniendo en cuenta el contenido en sólidos totales de la biomasa, determinado previamente.

A esta suspensión se le añaden 1,25 ml de Buffer de citrato 1M y 102 µl de la enzima Celluclast 1,5 (Enzymes for education, 2018). Celluclast 1,5 l se produce por fermentación de una cepa del hongo *Trichoderma reesei*. Esta enzima se encarga de catalizar la descomposición de la celulosa y el almidón en glucosa y fructosa. El buffer citrato tiene poder anticoagulante. Tras añadir el buffer y la enzima Celluclast 1,5 l se ajusta el pH de las muestras con NaOH 5M y HCl 5M hasta que el valor sea $4,8 \pm 0,1$. Este valor es el pH óptimo de actuación de la enzima. Una vez alcanzado este valor de pH se añade agua destilada hasta los 25 g. Esto se realiza dos veces por cada muestra sin pretratar y pretratada, para que una réplica esté en la incubadora durante 6 horas y la otra réplica durante 12 horas. Las condiciones de hidrólisis que se introducen en la incubadora (OPTIC ivymen SYSTEM. 2012) son 50 °C y 300 rpm (Martín Juárez et al., 2016). La temperatura es la óptima de activación

para la enzima con la que se trabaja. La velocidad de giro sirve para mantener la mezcla homogénea y que la enzima actúe de manera uniforme sobre toda la muestra.

Una vez finalizada la hidrólisis se separa el producto en tres fracciones: sólida, líquida y sólida-líquida. Esto se consigue mediante una centrifugación, en tubos Falcon a 5.000 rpm durante 10 minutos.

2.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Para contabilizar y comparar las bacterias vivas y muertas que posee la microalga sin pretratar, una vez pretratada con alguno de los pretratamientos detallados en el apartado anterior, e hidrolizada es necesario realizar la extracción de ADN. Las mencionadas extracciones de ADN se realizan a la fracción sólida de las muestras debido a que en esta fracción es donde se encuentra la mayor población bacteriana. Además, esta fracción no contiene ninguna disolución añadida como podrían ser el ácido o la base o el peróxido añadidos para realizar el pretratamiento.

Para efectuar esta extracción se aplica el protocolo propuesto por MP Biomedicals (MP Biomedicals, 2013). En concreto el protocolo descrito en FastDNA® SPIN Kit for Soil. Este consiste en aislar de la forma más eficiente posible el ADN genómico de bacterias, hongos, plantas y animales del suelo y otras muestras ambientales. Este aislamiento eficiente permite que el ADN genómico obtenido esté listo para realizar una qPCR, método explicado posteriormente.

El FastDNA® SPIN Kit for Soil consta de:

- Lysing Matrix E, 50 x 2ml.
- Buffer de fosfato de sodio, 60 ml.
- MT Buffer, 8 ml.
- Solución PPS, 25ml.
- SEWS-M concentrado, 12ml.
- Binding Matrix, 2 x 30 ml.
- Certificado de Análisis.
- Columna SPIN™ con filtro, 50 x 2ml.
- Manual de uso

Con todo este material se realizan los pasos detallados en el protocolo anteriormente mencionado.

Primero, a la botella que contiene 12 ml de SEWS-M concentrado se le agregan 100 ml de etanol al 100%. Se marca la botella con la fecha en la que se realiza este acto. Hay que asegurarse de que la botella está bien cerrada para que no se evapore la mezcla.

Segundo, se agregan 460 mg de muestra sólida al tubo Lysing Matrix E. Este tubo contiene pequeñas esferas que romperán eficazmente las paredes de las células, proporcionando los mayores rendimientos de ácidos nucleico cuando el tubo sea introducido en la agitadora Mini-Beadbeater (BSP, 2016).

Tercero, se añaden 978 µl buffer de fosfato de sodio y 122 µl de MT buffer al tubo Lysing Matrix E donde se encuentra la muestra. El buffer de fosfato de

sodio sirve como agente estabilizante de la lisis celular. El MT buffer se encarga de proteger y solubilizar los ácidos nucleicos y proteínas tras la lisis celular, permitiendo así la extracción de ADN sin contaminación de ARN.

Cuarto, para homogenizar por impacto la mezcla del tubo Lysing Matrix E se introduce en la agitadora Mini-Beadbeater, durante 2 minutos y 40 segundos. La Mini-Beadbeater rompe la pared celular mediante la agitación violenta de las pequeñas esferas que contiene el tubo Lysing Matrix E.

Quinto, se introduce el tubo Lysing Matrix E en la centrífuga durante 10 min a 14,000 x g de velocidad para sedimentar el material más pesado y que pueda ser retirado.

Sexto, el sobrenadante, se transfiere con ayuda de una micropipeta a un tubo Eppendorf esterilizado de 2 ml y se añaden 250 µl de solución de PPS (Protein Precipitate Solution). Esta solución hace que las proteínas precipiten. Tras asegurarse de que el tubo Eppendorf esté bien cerrado, este se agita manualmente 10 veces para que quede bien mezclado el sobrenadante con la solución de PPS.

Séptimo, se centrifuga a 14,000 x g durante 5 minutos para precipitar las proteínas gracias a la solución de PPS utilizada.

Octavo, se transfiere el sobrenadante a un falcon de 50 ml y se añade 1 ml de Binding Matrix, previamente agitado, para que la mezcla sea homogénea. Binding Matrix es una suspensión de sílice que se une al ADN para poder aislarlo posteriormente.

Noveno, se coloca el falcon en un agitador durante 60 min para que el ADN se una al Binding Matrix, consiguiendo una fijación estable.

Décimo, se transfieren 800 µl de la mezcla a una columna SPIN™ con filtro SPIN™ y se centrifuga a 14,000 x g durante 1 minuto. Esta centrifugación sirve para que se produzca la filtración. Se desecha el volumen de muestra filtrado y se vierten otros 800 µl de la muestra sobre el filtro de la columna. Se repite la centrifugación y se vuelve a retirar el volumen filtrado. Esto se repite hasta que se haya filtrado toda la muestra. El ADN queda en el filtro unido al Binding Matrix.

Undécimo, al filtro retenido en la columna se le añaden 500 µl del SEWS-M concentrado preparado, en el primer paso, y se centrifuga a 14,000 x g durante 1 minuto. El SEWS-M se usa para eliminar las impurezas una vez que el ADN está unido al Binding Matrix. El líquido filtrado se desecha.

Duodécimo, para secar el filtro, donde se encuentra el ADN unido a Binding Matrix de la muestra, se centrifuga a 14,000 x g durante 2 minutos sin ninguna adición de sustancia.

Decimotercero, se saca el filtro con la matriz del tubo y se coloca en un tubo Eppendorf esterilizado de 1,5 ml. Se deja secar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Este tubo Eppendorf debe estar marcado correctamente porque es donde se va a guardar el ADN de forma definitiva.

Decimocuarto, se vierten sobre el filtro 50 μ l de agua destilada ultrapura y se centrifuga a 14,000 x g durante 2 minutos.

Por último, cuando sale de la centrifuga se desecha el filtro y se guarda el ADN extraído. Es necesario que el ADN extraído se conserve en el congelador para que no se deteriore y perdure en el tiempo.

2.3.1 Reactivo PMA

La extracción de ADN se realiza en las muestras por duplicado. Por un lado se utiliza una la muestra sin nada añadido y, por otro lado, la muestra con un reactivo denominado Propidium Monoazide (PMA). El PMA es un colorante fotorreactivo que se une al ADN de doble cadena. El colorante es débilmente fluorescente por sí mismo, pero se vuelve más fluorescente después de unirse a los ácidos nucleicos. Se usa para detectar bacterias viables por qPCR, explicado el método posteriormente.

Al igual que en las muestras sin PMA, la extracción se realiza sobre la fracción sólida. El problema de esto es que el PMA no se puede añadir directamente sobre la muestra sólida. Para añadir el reactivo a las muestras es necesario disolverla con agua. Por este motivo, a los 460 mg se le añaden 2 ml de agua destilada. Esta es la cantidad de agua destilada necesaria para mantener la concentración de los pretratamientos, considerando un 5 % de peso seco y un 22 % de humedad en la biomasa algal. En estas disoluciones de las muestras se añaden 2 μ l de PMA al 20 mM de concentración para que los 2 ml de muestra estén a una concentración de 20 μ M. Las muestras con PMA añadido se sitúan en una zona oscura durante 20 minutos. Para conseguir esta oscuridad se meten en un armario cerrado y cubiertas por papel de aluminio. Justo después de haber pasado este periodo en oscuridad se colocan a la luz de una lámpara Floodlight LED 100W 4000K (Ledvance Proyector LED, 2017) durante 30 minutos (Desneux et al., 2015). La luz de esta lámpara induce a que se produzca una fotorreacción de la sustancia química. Esta fotorreacción promueve a la formación de un enlace covalente entre el reactivo PMA y el ADN de bacterias no viables. El PMA puede introducirse en las bacterias muertas debido a que su membrana está deteriorada. El PMA no forma enlace con las bacterias vivas debido a que tienen la membrana celular intacta por lo que no puede entrar en ellas. Una vez extraído el ADN de las muestras con y sin PMA, se realiza una qPCR. El enlace covalente de PMA no es amplificable por qPCR. Es decir, el PMA tiene un efecto inhibitor de modo que el ADN amplificado sea únicamente de organismos vivos.

Se concluye que de las muestras de partida se obtienen dos extracciones de ADN; una con PMA en la que al realizar la qPCR solo se amplificarán las bacterias vivas, y otra sin PMA en la que se amplificarán todas las bacterias, tanto viables como no viables.

2.3.2 Control positivo

El objetivo de realizar este control positivo es, a la hora de realizar la qPCR, se pueda comparar el alga fresca con el control positivo. De este modo se puede

observar que el número de bacterias totales (bacterias viables y no viables) sea muy parecido, pero el porcentaje de no viables sea mucho mayor en el control positivo que en el alga fresca.

Las microalgas sin pretratar contienen bacterias. La manera de conseguir que la biomasa algal fresca esté estéril se describe a continuación.

Se pesan 460 mg de microalga sin pretratar en un Eppendorf de 2 ml y se añaden hasta los 2 ml de agua destilada. Esto se realiza por duplicado de forma que, posteriormente en uno, se añadirá PMA y en el otro, ninguna sustancia química antes de realizar la extracción de ADN.

Se deja calentar en un baño hasta que alcance una temperatura igual a 90 °C. Cuando el equipo alcanza esta temperatura se introducen los dos Eppendorf de 2 ml preparados. El baño permite fijar el tiempo de 15 minutos durante los cuales el equipo se mantiene a la temperatura constante de 90 °C. Los baños utilizados son húmedo y seco para poder comparar y conocer cuál es más efectivo.

2.4 ELECTROFORESIS SOBRE UN GEL DE AGAROSA

El gel de agarosa, polímero lineal de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa (Checa Rojas, 2017), sirve para realizar una electroforesis del ADN extraído de las muestras sin PMA añadido. Se separan las muestras según tamaño, forma y carga eléctrica. Se comprueba con esta técnica si la extracción se ha realizado correctamente de forma cualitativa, viendo a su vez el grado de degradación que muestra el ADN extraído en las muestras pretratadas.

Para comenzar, se prepara el gel de agarosa. Siguiendo la secuencia que se explica a continuación de pasos a seguir:

Primero, se coloca el molde donde va a solidificar el gel sobre un soporte. Este soporte se nivela con ayuda de un nivel de ojo de buey. Es necesario que el molde esté horizontal en su totalidad para que cuando se corra el gel las muestras estén rectas y paralelas entre ellas.

Segundo, se prepara una disolución del 1,6% de agarosa en TAE 1x. La disolución TAE está formada por trishidroximetilaminometano, acetato y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); este último evita que el ADN sea degradado por las enzimas nucleasas. El tamaño del gel que se prepara está en función de la cantidad de muestras que se desean correr, existiendo dos tamaños uno de 50 ml y otro de 100 ml. La concentración que se busca es de 1.6 % de agarosa. Para ello, si se trabaja con el gel de 50 ml de TAE 1x se pesan en la balanza 0,8 g de agarosa y si se prepara el de 100 ml de TAE 1x se pesan 1,8 g de agarosa en la balanza. El volumen de TAE 1x se mide con una ayuda de una probeta.

Tercero, una vez preparada la disolución en un matraz Erlenmeyer, es necesario disolver completamente la agarosa en el TAE 1x. Esto no se puede conseguir a temperatura ambiente así que se calienta la disolución en el microondas. El aumento de temperatura aumenta la solubilidad de la agarosa

en TAE 1x, y se agita hasta que la agarosa se disuelva consiguiéndose una disolución homogénea y transparente.

Cuarto, a la disolución obtenida se le añade GelRed® (Crisafuli et al., 2015). El GelRed® es un colorante fluorescente de ácido nucleico ultra sensible, extremadamente estable y ambientalmente seguro diseñado para reemplazar el bromuro de etidio (EB), altamente tóxico. Se utiliza para tinción de ADN de doble cadena o ARN en geles de agarosa. GelRed® es mucho más sensible que EB sin requerir un paso de decoloración. La cantidad de GelRed® añadida depende del tamaño del gel de agarosa; si se trabaja con 50 ml de TAE 1x se añaden 4 µl y si se trabaja con 100 ml de TAE 1x se añaden 6 µl.

Por último, se vierte la disolución en el molde previamente preparado en el primer paso. Se le coloca un peine que creará los pocillos posteriormente utilizados para introducir el ADN extraído de las muestras en el gel. Se deja enfriar la disolución el molde hasta que solidifique. Esta solidificación se debe a la polimerización de la agarosa que aproximadamente tarda 30 minutos.

Una vez preparado el gel de agarosa, se preparan las muestras de ADN que se van a introducir en los pocillos del gel. Para ello, se necesitan 5 µl de muestra de ADN que se mezclan en un Eppendorf de 1,5 ml con 2 µl de buffer de carga (SIGMA-ALDRICH, 2016) y 3 µl de TAE 1x. El buffer contiene 0,25 % de azul de bromofenol, 0,25 % de cianol de xileno y 40% de sacarosa. El buffer sirve para hacer posible la carga, aumentando la densidad de la muestra, y la visualización de las muestras en el gel, lo cual tiñe las muestras de color azul.

Cuando el gel solidifica se prepara la cubeta donde se lleva a cabo la electroforesis. Se coloca en la cubeta el molde donde está el gel, con el peine retirado. Esta retirada del peine da paso a la creación de distintos pocillos. Se añade hasta la marca indicada en la cubeta de TAE 1x. El TAE 1x proporciona las condiciones de pH óptimas para el proceso.

Una vez preparada la cubeta, se cargan las muestras de ADN en los distintos pocillos. Se deja el primer pocillo libre para introducir un marcador de peso molecular, HyperLadder™ 50bp (ECOGEN, 2018). Este marcador produce un patrón de 15 bandas espaciadas regularmente, que van desde 50 a 2000 pb como se ve representado en la figura 1. Este marcador permite una fácil identificación y orientación del tamaño del ADN extraído.

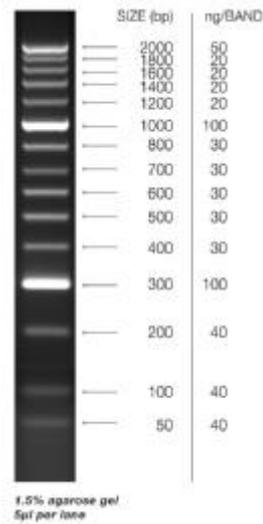


Figura 1. Marcador peso molecular HyperLadder™ 50bp.

Cuando el gel tiene cargadas todas las muestras, se cierra la cubeta y se conecta a la corriente eléctrica para que comience la electroforesis. El ADN es una molécula con carga negativa, por tanto, al aplicar una carga eléctrica el ADN migra de forma diferencial desde el polo negativo de la cubeta al polo positivo. El colorante del buffer permite ver dónde está el ADN en cada momento y así saber cuándo parar la corriente. Al igual que el ADN, el colorante también tiene una ligera carga negativa que le hace migrar en su misma dirección. La electroforesis aplicada a las muestras de ADN de microalgas dura 30 minutos con una corriente de 100 V.

Todo el procedimiento descrito hasta ahora se representa en la figura 2 (Checa Rojas, 2017)

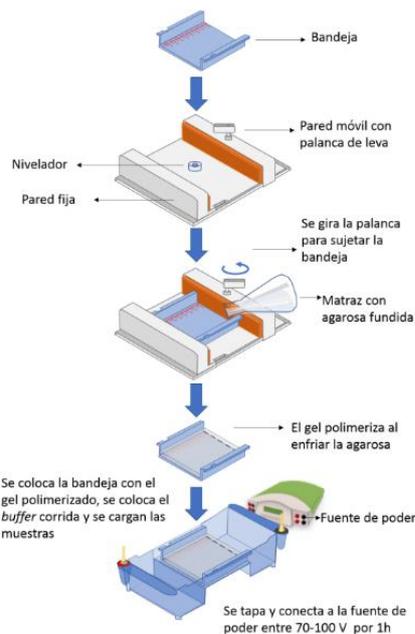


Figura 2. Procedimiento electroforesis en gel de agarosa.

Para poder visualizar el resultado de la electroforesis se saca el gel de la cubeta y se lleva a una lámpara de luz ultravioleta. Como al preparar el gel se ha añadido GelRed®, este se ha intercalado entre las bases del ADN de forma que, al irradiar el gel con luz ultravioleta, se puede ver la altura a la que han corrido las bandas de ADN.

Para estimar el tamaño de las bandas de las muestras de ADN se compara su tamaño con la banda generada por el marcador de peso molecular, cuyo tamaño es conocido. La velocidad de migración de las bandas de ADN es inversa al tamaño de las bandas.

Para finalizar, se hace una foto a los resultados obtenidos, guardándose la captura en el ordenador.

2.5 qPCR - quantitative polymerase chain reaction

La qPCR (quantitative polymerase chain reaction) o PCR cuantitativa en tiempo real es una técnica que se utiliza para amplificar y, de manera simultánea, cuantificar el ácido desoxirribonucleico extraído en el paso *Extracción de ADN* anteriormente descrito. La polimerasa es una enzima capaz de transcribir los ácidos nucleicos. Para ello se utiliza la muestra extraída de ADN, un par de cebadores específicos (Oligo F (E1052F) y Oligo R (E1193R)) y agua ultrapura (Bayer et al., 2014). Además, a esta mezcla se le añade Sybr-green (BIO RAD, 2018), colorante fluorescente verde que contiene la enzima ADN polimerasa purificada de organismos termófilos para que sea capaz de soportar altas temperaturas. El termociclador es el equipo en el que se lleva a cabo la qPCR. El modelo más común de termociclador consiste en un bloque de resistencia eléctrica que distribuye una temperatura homogénea a través de una placa durante tiempos programables, con rangos de temperaturas entre los 4 °C y los 96 °C, donde ocurre la desnaturalización, el cebado y la polimerización de la molécula de ADN. El termociclador, a su vez, posee sensores capaces de medir fluorescencia al excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada. Se puede así medir la tasa de generación de productos específicos. Por esta razón se añade Sybr-green anteriormente citado.

Para cuantificar el número de bacterias es necesario añadir 1,0 µl de la muestra de ADN extraído con o sin PMA, 0,8 µl de Oligo F (E1052F), 0,8 µl de Oligo R (E1193R), 10 µl de Sybr-green y 7,4 µl de agua ultrapura. Además de las muestras de ADN también se cargan determinados patrones de los cuales se conocen sus números de bacterias. A estos patrones se les añade la misma cantidad de Oligo F (E1052F), Oligo R (E1193R), Sybr-green y agua ultrapura que a las muestras de ADN. Estos sirven para realizar la recta de calibrado. Según el número de bacterias (Copy Number) los patrones en el termociclador dan un determinado número de ciclos (Threshold) lo que permite la representación de la recta de calibrado. Con esta recta se puede relacionar el número de ciclos que realizan las muestras en el termociclador con el número de bacterias de dichas muestras.

Tanto las muestras de ADN con y sin PMA como los patrones, se insertan en el termociclador por triplicado debido a que la qPCR es una técnica muy

meticulosa en la que es muy fácil cometer errores. Para que una muestra sea válida no deben diferir los tres números de ciclos obtenidos más de 0,5 unidades. En el caso en que dos sean parecidos y otro difiera más de la cantidad citada este último se descarta. El valor final de bacterias considerado es la media entre los valores válidos.

La medición se realiza en determinados ciclos de amplificación. Estos ciclos alternan ciclos de bajas y altas temperaturas en diferentes tiempos. En este caso se alternaron las condiciones que se sintetizan en la tabla 1:

Tabla 1. Temperatura, tiempo y etapas del termociclador

Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Etapas
95,0	15	Desnaturalización
63,5	20	Cebado
72,0	20	Polimerización
81,0	15	Adaptación

Las etapas recogidas en la tabla 1 se describen a continuación:

- 1) Desnaturalización - En este periodo de incubación se rompen los puentes de hidrógeno que unen a los nucleótidos de la cadena de ADN, separándose así las hebras de ADN.
- 2) Cebado - Los cebadores se unen a los fragmentos de ADN específicos amplificados presentes en la muestra.
- 3) Polimerización - Se da a la temperatura óptima de actuación de polimerasa. La enzima se une a los extremos de los cebadores y comienza a copiar los fragmentos de ADN.
- 4) Adaptación - Es el tiempo y la temperatura óptima para que se vuelva a repetir el ciclo. Sirve para adaptarse a la nueva etapa de desnaturalización.

Esta secuencia de cuatro pasos se repite 25 veces, es decir, se hacen 25 ciclos. De manera que, tanto el ADN original como el ADN copiado, sirven para la síntesis del nuevo fragmento de ADN. Aparte de estas cuatro etapas, existen otras tres. La primera, solo se da en el primer ciclo antes de las cuatro etapas citadas, sirve para termostatar el termociclador se realiza a 95°C y dura 5 minutos. La segunda, se da después de los 25 ciclos, manteniéndose el termociclador a 81 °C durante 40 minutos y 30 segundos. Por último, se mantiene a 4 °C hasta que el operario apague el termociclador.

La salida del termociclador es el número de ciclos que realiza cada muestra. Con la recta de calibrado anteriormente citada se puede conocer el número de bacterias. Como ya se ha explicado previamente, de cada muestra se obtienen tres números de ciclos distintos de los cuales el número de bacterias tomado es la media de los válidos.

Como ya se habló en el apartado de *Extracción de ADN* las muestras se hacen por duplicado; una vez con el reactivo PMA añadido y otra sin él. De manera que al realizar la qPCR de las muestras sin PMA se cuantifican tanto las bacterias viables como las no viables (Desneux et al., 2015). Sin embargo, las

muestras que contengan PMA, tienen un enlace covalente entre el PMA y las bacterias no viables, en la qPCR solo se cuantifican las vivas. Esto es debido a que el PMA inhibe la amplificación del ADN por la enzima polimerasa. Con la diferencia del número total de bacterias y el número total de bacterias viables se puede sacar el número de bacterias no viables. Y, de esta forma, se obtiene también el porcentaje de vivas y muertas, pudiendo así evaluar el grado de esterilización en distintas etapas del proceso que es el objetivo principal de este trabajo.

2.6 Cuantificación de ADN

Para realizar la cuantificación de ADN se utiliza un NanoDrop (ThermoFisher SCIENTIFIC, 2018). Este equipo es un espectrofotómetro UV-Visible capaz de determinar la concentración de ADN (ng/μl) en un microvolumen de muestra de alta concentración sin necesidad de dilución. La medida que realiza es rápida, precisa y reproducible.

Para esta cuantificación es necesario partir de un blanco cuya concentración de ADN se toma como nula; en este caso es 2 μl de agua destilada. Posteriormente se limpia el pocillo y se vierte 2 μl de la muestra que se desea conocer su concentración de ADN. Las salidas del NanoDrop son la concentración de ADN en (ng/μl), la absorbancia a 260 nm, la absorbancia a 280 nm, el cociente entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm y el cociente entre la absorbancia a 260 nm y a 230 nm. Por tanto, la concentración de ADN en la muestra se calcula según el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Mientras que las relaciones de absorbancias A260/280 y A260/230 se utilizan para evaluar la pureza de las muestras. Estos parámetros también determinan si el ADN extraído es de calidad según los rangos descritos a continuación.

- La relación A260/280 es muy estable y se clasifica la pureza del ADN según esta relación teniendo en cuenta los valores mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Pureza según la relación A260/280.

	VALOR	PUREZA
A260/280	<1,6	Presencia de compuestos aromáticos
	1,6 – 1,8	Pureza aceptable
	1,8 – 2,0	Pureza óptima
	>2,1	Presencia de ARN

- La relación A260/230 cociente más variable que la relación A260/280, depende de la concentración de ADN. También existe una tabla para relacionarlo con la pureza, tabla 3.

Tabla 3. Pureza según la relación A260/230.

	VALOR	PUREZA
A260/230	<1,5	Presencia de sales, carbohidratos, fenoles
	1,5 - 2,2	Pureza óptima

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este apartado se describen los principales resultados obtenidos durante meses de trabajo en el laboratorio. Dichos resultados pretenden dar respuesta al objetivo que se plantea en este trabajo: determinar la cantidad de bacterias viables y no viables en biomasa algal en diferentes etapas del proceso de valorización. Primero, de la biomasa algal fresca que no ha sido sometida a ningún pretratamiento. Segundo, de la biomasa algal pretratada con los pretratamientos descritos en el apartado *Materiales y Métodos*. Tercero, de las microalgas pretratadas que se han sometido a hidrólisis enzimática durante 6 horas. Por último, de las microalgas pretratadas que han sido sometidas a una hidrólisis enzimática durante 12 horas.

En este apartado se comparan los resultados cualitativos obtenidos mediante la electroforesis del gel de agarosa y los resultados cuantitativos mediante una qPCR. Además de comparar los resultados, se interpretan estos para comparar con los resultados obtenidos en los procesos de extracción de componentes. A continuación se describen los resultados obtenidos de forma detallada para los distintos pretratamientos.

3.1 PRETRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y PRETRATAMIENTO TÉRMICO

El pretratamiento con peróxido de hidrógeno, al igual que los anteriores, también se ha llevado a cabo en dos condiciones: 0,5 % de H₂O₂ y 7,5 % de H₂O₂.

El pretratamiento térmico es el único que se realiza solo a una condición, tal y como se ha explicado de forma detallada en el apartado *Materiales y Métodos*.

Se espera del pretratamiento con H₂O₂ que la esterilización sea mayor para las condiciones más extremas que para las más moderadas.

La figura 3 corresponde con la electroforesis a 100 V durante 30 minutos de un gel de agarosa de las muestras pretratadas con H₂O₂ y en el autoclave. Se muestran, además de estas, los resultados de sus correspondientes hidrólisis a 6 y 12 horas de la fracción sólida y de la suspensión sólido-líquida. También se muestran los resultados del alga fresca que se ha utilizado para realizar el pretratamiento y su correspondiente hidrólisis enzimática a 6 y 12 horas. Además se incluye el control positivo de esta alga fresca. Por último se incluye un marcador de peso molecular que sirve para conocer el peso del ADN extraído de las distintas muestras. La correspondencia de las muestras con sus pocillos se encuentra detallado debajo de la figura 3.

Para interpretar un gel de agarosa hay que considerar lo siguiente. Las muestras de ADN que presentan una integridad aceptable muestran bandas más compactas, nítidas y estrechas. En contraposición, las muestras de ADN que no presentan una banda nítida sino un rastro más largo y difuminado a lo largo del gel son los que están más degradadas.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

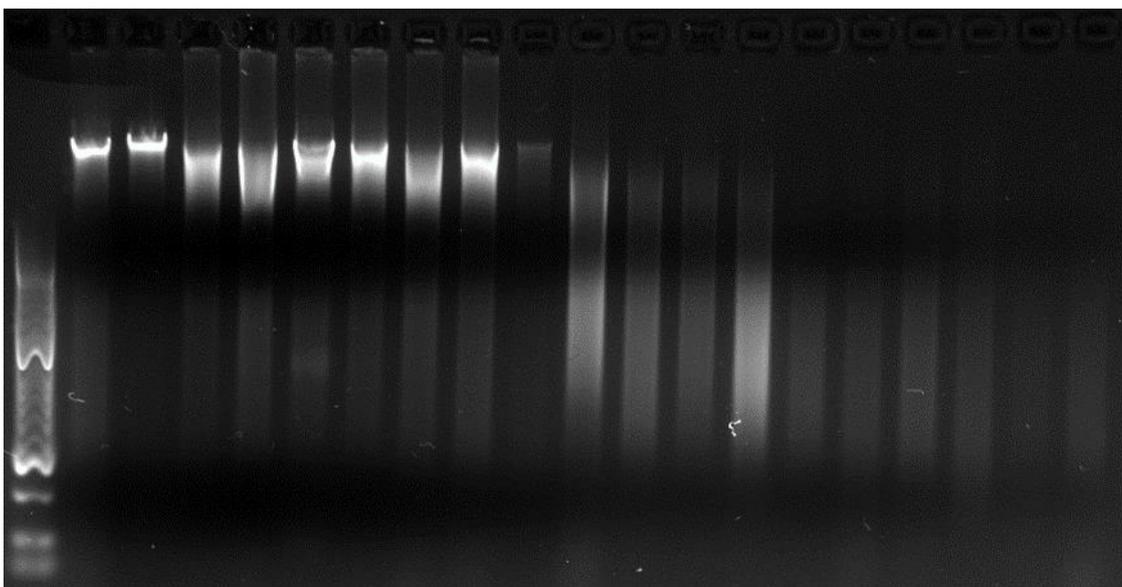


Figura 3. Gel de agarosa: H_2O_2 y autoclave

- 1) Marcador de peso molecular
- 2) Control positivo alga fresca
- 3) Alga fresca
- 4) Alga fresca después de hidrólisis enzimática durante 6 h
- 5) Alga fresca después de hidrólisis enzimática durante 12 h
- 6) Alga pretratada con H_2O_2 al 0,5 %
- 7) Alga pretratada con H_2O_2 al 0,5 % y sometida a hidrólisis enzimática durante 6 h de la fracción sólida
- 8) Alga pretratada con H_2O_2 al 0,5 % y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida
- 9) Alga pretratada con H_2O_2 al 0,5 % y sometida a hidrólisis enzimática durante 6 h de la suspensión sólido-líquida
- 10) Alga pretratada con H_2O_2 al 0,5 % y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida
- 11) Alga pretratada con H_2O_2 al 7,5 %
- 12) Alga pretratada con H_2O_2 al 7,5 % y sometida a hidrólisis enzimática durante 6 h de la fracción sólida
- 13) Alga pretratada con H_2O_2 al 7,5 % y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida

- 14) Alga pretratada con H₂O₂ al 7,5 % y sometida a hidrólisis enzimática durante 6 h de la suspensión sólido-líquida
- 15) Alga pretratada con H₂O₂ al 7,5 % y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida
- 16) Alga suspendida en agua introducida en el autoclave 121 °C durante 1 hora
- 17) Alga suspendida en agua introducida en el autoclave 121 °C durante 1 hora y sometida a hidrólisis enzimática durante 6 h de la fracción sólida
- 18) Alga suspendida en agua introducida en el autoclave 121 °C durante 1 hora y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida
- 19) Alga suspendida en agua introducida en el autoclave 121 °C durante 1 hora y sometida a hidrólisis enzimática durante 6 h de la suspensión sólido-líquida
- 20) Alga suspendida en agua introducida en el autoclave 121 °C durante 1 hora y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida

A continuación se detallan los resultados obtenidos con cada uno de los pretratamientos: el de peróxido de hidrógeno y el térmico.

3.1.1 Pretratamiento con peróxido de hidrógeno

Los principales resultados obtenidos de manera experimental con dicho pretratamiento se resumen en las siguientes líneas.

En lo que se refiere al pocillo 1 correspondiente con el marcador de peso molecular se observa que el desarrollo ha sido peor que el esperado, respecto a la situación ideal representada en la figura 1. Este error no resulta importante para los objetivos de este estudio, que no pretende cuantificar la distribución de tamaños, sino únicamente evaluar el grado de degradación del ADN. Sin embargo, se estudiaron las posibles causas, analizando cambios de pH, agarosa, tiempo, etc. Se llegó finalmente a la conclusión de que el colorante GelRed® interfiere con el marcador, lo que impide su perfecto desarrollo. Esta interferencia no afecta al resto de los experimentos y el perfecto desarrollo del marcador no es necesario para este trabajo. Los pocillos 2 y 3 corresponden con el alga fresca y su correspondiente control positivo. Parece al observar la figura 3 que la cantidad de bacterias en el alga es parecida. El porcentaje de bacterias viables y no viables no se conoce hasta que, posteriormente, se haga el estudio cuantitativo.

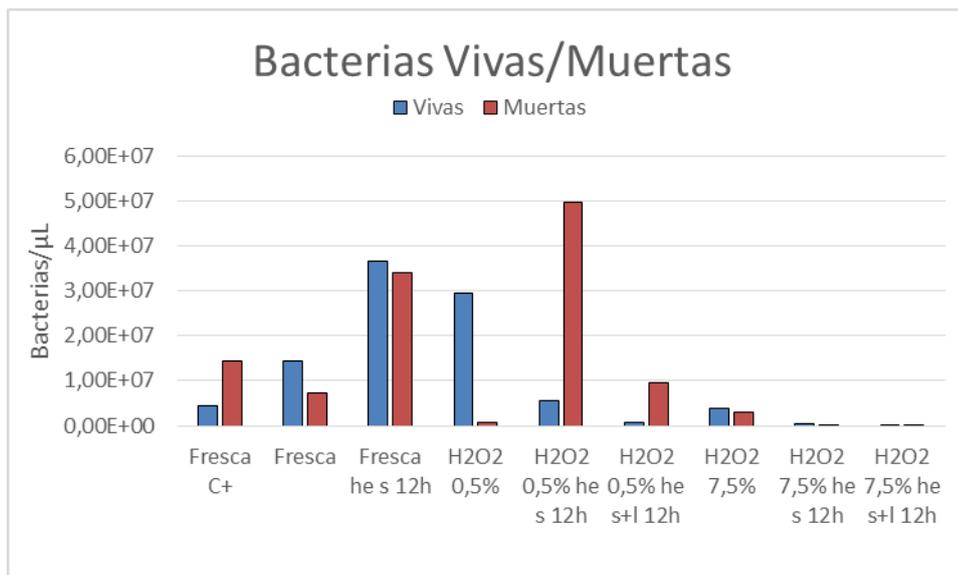
Los pocillos 4 y 5 contienen las hidrólisis enzimáticas de la biomasa algal fresca; la del pocillo 4 de 6 horas y la del pocillo 5 de 12 horas. La muestra de 12 horas está más degradada que la de 6 horas. Por lo tanto, se entiende que

la hidrólisis enzimática degrada el ADN. Al tratarse del primer resultado de hidrólisis obtenido hay que comprobar que en el resto de pretratamientos ocurre de igual manera para confirmar esta teoría.

Los pocillos 6, 7, 8, 9 y 10 contienen todas las muestras pretratadas con peróxido de hidrógeno al 0,5 %. La diferencia entre ellas es que la 6 solo ha sido pretratada y el resto, además, han sido sometidas a hidrólisis enzimática. Si se compara el ADN de la fresca, pocillo 3, con la pretratada, pocillo 6, se observa que el empleo de H_2O_2 al 0,5 % produce una degradación en el ADN. La 7 y la 8 corresponden a la fracción sólida. La 7 ha sido sometida a hidrólisis enzimática durante 6 horas y la 8 durante 12 horas. La muestra 9 y la 10 corresponden a la suspensión sólido-líquida. La 9 ha sido sometida durante 6 horas a hidrólisis enzimática y la 10 durante 12 horas. Como se observa en la figura 3 el ADN de bacterias extraído se degrada con la hidrólisis enzimática. Si se mira con detalle se concluye que las hidrólisis de 12 horas están más degradadas que las de 6 horas. Esto concuerda con el resultado esperado: cuanto más tiempo en hidrólisis más degradación del ADN.

Los pocillos del 11 al 15 contienen todas las muestras pretratadas con H_2O_2 al 7,5 %. Esta es la condición más fuerte por lo tanto la cantidad de ADN de bacterias extraído tiene que estar más degradado debido a que la cantidad de bacterias muertas debe ser mayor. Esto concuerda con los resultados proporcionados por la figura 3. Además se observa cómo la muestra que solo ha sido pretratada tiene el ADN más integro que las muestras que además de pretratadas han sido sometidas a una hidrólisis enzimática. Aun así todas las muestras tienen el ADN extraído muy degradado debido a la concentración de H_2O_2 .

Como existe ADN en los pocillos que contienen las muestras pretratadas, es posible realizar un estudio cuantitativo gracias a la técnica PMA-qPCR. De esta forma se puede distinguir entre las bacterias vivas y muertas. Los resultados se representan en la gráfica 1.



Gráfica 1. Número de bacterias en las muestras pretratadas con peróxido de hidrógeno.

El gráfico 1 proporciona el número de bacterias vivas y muertas de las muestras introducidas en el termociclador para realizar la qPCR. Todos estos resultados se han tomado por triplicado para asegurarse de que los resultados experimentales son válidos.

Las dos primeras muestras representadas en el gráfico se corresponden, respectivamente, con el alga fresca, utilizada para realizar el pretratamiento con H_2O_2 , y su correspondiente control positivo. Los resultados obtenidos son los esperados debido a que ambas muestras contienen prácticamente el mismo número de bacterias. Por otra parte, por lo que se refiere a la viabilidad de estas bacterias, el alga fresca contiene mayor número de bacterias viables y el control positivo mayor número de bacterias no viables. Esto concuerda a la perfección con lo se buscaba a la hora de realizar el control positivo.

En la tercera muestra se aprecia cómo han aumentado tanto el número de bacterias viables como el número de bacterias no viables. Parecen coexistir dos efectos contrapuestos. Por un lado, las bacterias vivas que entran en la etapa de hidrólisis consiguen reproducirse inicialmente. Por otro lado, con la hidrólisis las bacterias que tenían su viabilidad comprometida en etapas iniciales acaban muriendo durante la hidrólisis.

La cuarta muestra ha sido pretratada con H_2O_2 al 0,5 %. Se ve en la gráfica 1 que la cantidad de bacterias vivas es mucho mayor que la de bacterias muertas. Ello quiere decir que este pretratamiento no sirve para esterilizar la biomasa, y su aplicación podría ir acompañada de degradación de los componentes extraídos, apareciendo de subproductos tales como ácido

succínico, ácido acético, ácido butírico o ácido fórmico (Martín Juárez et al., 2016).

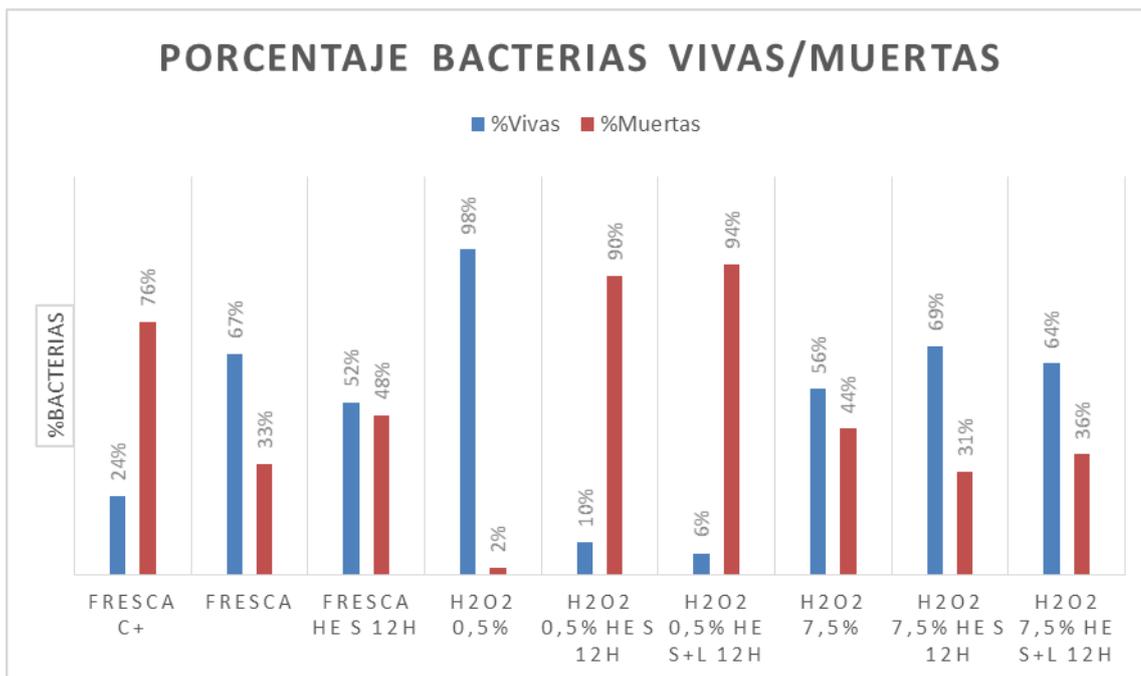
Las muestras quinta y sexta de la gráfica 1 corresponden a la hidrólisis enzimática de las muestras pretratadas con H_2O_2 al 0,5 %. El pocillo 5 contiene la de menos duración y el 6 la más duradera. Se observa como en ambos casos mueren las bacterias. Por tanto, la hidrólisis enzimática sirve como esterilizante para las muestras pretratadas con H_2O_2 al 0,5 %. La diferencia entre la hidrólisis de 12 horas sobre la fracción sólida y sobre la suspensión sólido-líquida recae principalmente en el número de bacterias muertas. Esto se asocia a que la presencia de H_2O_2 durante la hidrólisis promueve la degradación de las bacterias muertas. Esta degradación se atribuye probablemente a la presencia de componentes tóxicos en el líquido de pretratamiento.

La séptima muestra representa la cantidad de bacterias vivas y muertas de biomasa algal pretratada con la condición más fuerte de peróxido, H_2O_2 al 7,5 %. Se infiere que la cantidad de bacterias vivas es mucho menor que en el pretratamiento de 0,5 %, Este resultado parece lógico ya que a mayor concentración de H_2O_2 , cabe esperar mayor grado de esterilización.

La octava y la última corresponden a las hidrólisis de la biomasa algal pretratada con H_2O_2 al 7,5 %. La población bacteriana de estas muestras es mínima debido a que la qPCR no permite cuantificar muestras de ADN tan degradadas. Por tanto, la esterilización de estas muestras es prácticamente completa.

Todos los resultados obtenidos de forma cuantitativa concuerdan a la perfección con los resultados obtenidos de manera cualitativa.

Para conocer el porcentaje de bacterias vivas y muertas se hacen los cálculos con respecto a la población bacteriana total. Se elabora a partir de dichos cálculos el gráfico 2.



Gráfica 2. Porcentaje de bacterias vivas y muertas en las muestras pretratadas con H₂O₂.

Con este porcentaje se comprueba cómo ha variado el porcentaje de bacterias vivas: ha disminuido del 67% en el alga fresca al 24% en el control positivo.

Los datos que aparecen en el gráfico 2 demuestran que el pretratamiento con H₂O₂ al 0,5 % no esteriliza la biomasa algal. El efecto de este pretratamiento parece lento y no se pone de manifiesto hasta la etapa de hidrólisis enzimática como se puede ver en el aumento del porcentaje de bacterias muertas.

Por lo que respecta a la muestra pretratada con H₂O₂ al 7,5 % parece que no esteriliza lo suficiente debido al alto porcentaje de bacterias vivas, 56%. No obstante, este resultado debe interpretarse con precaución. Se debe a que la qPCR no ha cuantificado todas las bacterias muertas presentes en la biomasa algal porque el ADN estaba muy deteriorado. Esto explica, también, el alto porcentaje de bacterias vivas en las hidrólisis del alga pretratada con este pretratamiento. En realidad el número de bacterias ha disminuido con respecto al alga solamente pretratada.

Se concluye, por tanto, que el pretratamiento con H₂O₂ al 0,5 % no es capaz de esterilizar la biomasa algal. Sin embargo el alga pretratada con H₂O₂ al 7,5 % es algo más efectivo para la esterilización. Con lo que respecta al gel de agarosa, se sabe que el GelRed® interfiere en la migración del marcador de peso molecular en la electroforesis lo que hace que este no corra adecuadamente, impidiendo cuantificar correctamente el tamaño de las bandas obtenidas. Sin embargo, este hecho no se considera relevante para el objetivo que nos ocupa ya que lo que se pretende ver es cuál es el grado de

degradación del ADN, independientemente del tamaño de las bandas obtenidas. Tanto de los resultados cualitativos como cuantitativos se deduce que con la hidrólisis se pueden degradar las bacterias ya muertas.

3.1.2 Pretratamiento térmico

El ADN de las muestras pretratadas en el autoclave se encuentra en el gel representado en la figura 3, en los pocillos del 16 al 20. La muestra situada en el pocillo número 16 solo ha sido pretratada y las demás, aparte de pretratadas, han sido sometidas a una hidrólisis enzimática. La diferencia entre todas es imperceptible, como se puede ver en la figura 3, debido a la poca cantidad de ADN de bacterias extraído. Sólo se ve un pequeño rastro de ADN en todas las muestras.

Con todo lo recién explicado se concluye que la esterilización de este pretratamiento es prácticamente completa dado que no hay casi restos de ADN de bacterias. Como se dijo en la *Introducción* no se puede realizar la qPCR si el ADN que está muy deteriorado. Por ello, estas muestras no se han estudiado de forma cuantitativa.

3.2 PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO CLORHÍDRICO

Como ya se ha citado en el apartado *Materiales y Métodos* en este pretratamiento se utiliza ácido clorhídrico 0,5 M y 2 M.

Las muestras de ADN que se corren en el gel corresponden a (i) alga fresca sin pretratar, y tras la hidrólisis durante 6 y 12 horas, y (ii) alga pretratada con HCl 0,5 M o HCl 2 M antes y después de la hidrólisis durante 6 y 12 horas. Por último, se introduce el marcador de peso molecular para conocer el peso molecular aproximado de todas las muestras extraídas.

Se espera que el pretratamiento con mayor concentración de HCl tenga más capacidad esterilizante, y por tanto, que el ADN extraído aparezca más degradado.

El resultado obtenido tras realizar una electroforesis a 100 V durante 30 minutos es el mostrado en la figura 4. Para saber qué muestra se encuentra en cada pocillo, se han numerado y debajo de la figura hay un índice donde se indica la correspondencia del número de pocillo con la muestra de ADN correspondiente.

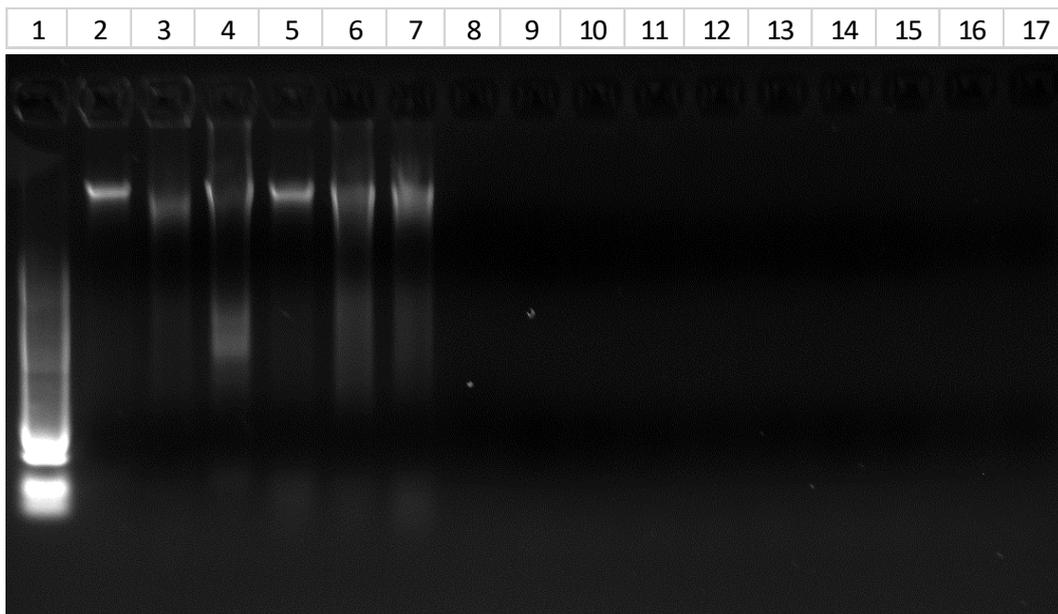


Figura 4. Gel de agarosa: HCl

- 1) Marcador de peso molecular
- 2) Alga fresca pura
- 3) Control positivo alga fresca pura
- 4) Alga fresca
- 5) Control positivo alga fresca
- 6) Alga fresca después de hidrólisis enzimática durante 6 h
- 7) Alga fresca después de hidrólisis enzimática durante 12 h
- 8) Alga pretratada con HCl 0,5 M
- 9) Alga pretratada con HCl 0,5 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 6 h de la fracción sólida
- 10) Alga pretratada con HCl 0,5 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida
- 11) Alga pretratada con HCl 0,5 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 6 h de la suspensión sólido-líquida
- 12) Alga pretratada con HCl 0,5 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida
- 13) Alga pretratada con HCl 2 M
- 14) Alga pretratada con HCl 2 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 6 h de la fracción sólida
- 15) Alga pretratada con HCl 2 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida
- 16) Alga pretratada con HCl 2 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 6 h de la suspensión sólido-líquida
- 17) Alga pretratada con HCl 2 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida

El resultado de esta electroforesis es, en términos generales, el esperado. Se refieren a continuación los resultados obtenidos en los distintos pocillos.

En el pocillo 1, donde se encuentra el marcador de peso molecular, ocurre el mismo problema descrito anteriormente para el caso del gel de peróxido de hidrógeno.

Los pocillos 2 y 3 contienen el alga fresca pura. La biomasa algal se denomina fresca pura cuando no ha sido cultivada en el biorreactor con agua residual. En vez de eso ha sido cultivada en un reactor tubular en una planta piloto. Esta biomasa algal puede contener cierta cantidad de población bacteriana. Por lo tanto de momento no se puede afirmar que todo el ADN extraído sea únicamente de bacterias, es decir, que no se extraiga nada de ADN de microalgas. La diferencia entre el 2 y el 3, es que la microalga del pocillo 3 ha sido sometida a un control positivo como el descrito en el apartado *Materiales y Métodos*. El resultado obtenido es el correcto. Se observa que hay mayor cantidad de ADN en la muestra que no ha sido sometida al control positivo, justamente lo que se esperaba.

Los pocillos 4 y 5 contienen alga fresca; esto quiere decir que no han sido sometidas a ningún pretratamiento pero que sí han sido cultivadas en un biorreactor con aguas residuales. En este caso el resultado no es el esperado debido a que si se observan los pocillos se demuestra que la muestra 4 está más degradada que la 5. Este error puede ser debido a que en el momento que se realizó la esterilización del control positivo se calentó a la muestra en un baño húmedo en el que no se consiguió alcanzar la temperatura de 90 °C buscada debido a que se evaporaba el agua. Por esa razón, en todos los ensayos posteriores se ha vuelto a usar el baño seco. En cualquier caso ha existido algún problema en la extracción de estas muestras porque la cantidad de ADN en la muestra 4 es menor que en la 2 que es la pura.

Por lo que respecta a los resultados obtenidos de los pocillos 6 y 7 los cuales han sido sometidos a hidrólisis enzimática con las mismas condiciones exceptuando el tiempo de duración de la hidrólisis. Se ve que siguen existiendo, en ambos, bacterias. Los resultados en dichos pocillos de forma cualitativa coinciden en que ambos tienen el ADN más degradado que el alga fresca. Pero la hidrólisis de 12 horas está más degradada que la de 6 horas. Esto confirma lo planteado anteriormente en el pretratamiento con peróxido de hidrógeno.

Por último, del pocillo 8 al 17 son las muestras pretratadas con ácido clorhídrico y las que después del pretratamiento han sido sometidas a una hidrólisis de 6 horas o de 12 horas. Como se ve en la figura 4 ninguna de estas extracciones tiene rastro de ADN de bacterias. Esto significa que con el pretratamiento con HCl en las dos condiciones explicadas se esterilizan de forma completa las muestras. En consecuencia, es mejor pretratar las

muestras con HCl 0,5 M que con HCl 2 M. Ello se debe a que una menor concentración de HCl implica un pretratamiento más económico y menos impacto medioambiental. De cara a futuras investigaciones sería interesante evaluar a partir de qué concentración mínima se logra la esterilización completa de las muestras mediante el pretratamiento con HCl. Ha de tenerse en cuenta, también, que un tratamiento que resulta tan agresivo con el ADN, podría degradar los componentes extraídos de la biomasa. Es necesario comprobar, por tanto, la calidad de los productos extraídos.

Se concluyen, por lo tanto, en lo que respecta a la figura 4 tres aspectos importantes. Primero, el GelRed® interfiere en la migración del marcador de peso molecular en la electroforesis como ya se dedujo en el pretratamiento anterior. Segundo, el método de baño húmedo para realizar el control positivo no es idóneo debido a que no se obtiene el grado de esterilización de la muestra requerido. Por lo tanto, después de esto se realizó la esterilización mediante un baño en seco. Por último, el pretratamiento con ácido clorhídrico elimina todas las bacterias de la muestra independientemente de la concentración de HCl utilizada, como demuestra la ausencia de ADN en la extracción. Por lo tanto, no hace falta realizar la qPCR debido a que no existe ADN de bacterias viables en ninguna de las muestras pretratadas con HCl.

3.3 PRETRATAMIENTO CON MOLINO DE BOLAS Y PRETRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO

En este subapartado se desarrollan los resultados obtenidos de las extracciones de ADN de la fracción sólida de las muestras citadas a continuación. Primero, la biomasa algal fresca y su correspondiente hidrólisis enzimática durante 12 horas. Segundo, la biomasa algal pretratada en el molino de bolas en dos condiciones distintas y la hidrólisis tanto de la fracción sólida como de la suspensión sólido-líquida, de estas microalgas pretratadas en el molino, durante 12 horas. Tercero, las microalgas pretratadas con hidróxido de sodio en dos condiciones distintas y las que además de este pretratamiento han sido sometidas a hidrólisis de enzimática durante 12 horas. Esta hidrólisis se ha realizado tanto de la fracción sólida como de la sólido-líquida. Para este pretratamiento solo se muestran resultados de hidrólisis enzimática de 12 horas debido a un error en la realización de los ensayos de 6 horas. Por último, también se ha introducido un marcador de peso molecular para saber el peso aproximado de las muestras de ADN extraído.

Las dos condiciones distintas en las que se lleva a cabo el pretratamiento con el molino de bolas son las ya citadas en el apartado *Materiales y Métodos*. La primera, bolas pequeñas girando durante 5 minutos y la segunda, bolas grandes girando durante 60 minutos.

El pretratamiento en el que se utiliza el hidróxido de sodio para romper la pared celular de las microalgas se lleva a cabo en dos condiciones: NaOH 0,5 M y NaOH 2 M.

El resultado obtenido tras realizar una electroforesis a 100 V durante 30 minutos es el mostrado en la figura 5. Para saber qué muestra se encuentra en cada pocillo, se han numerado y debajo de la figura hay un índice donde se indica la correspondencia del número de pocillo con la muestra de ADN correspondiente.

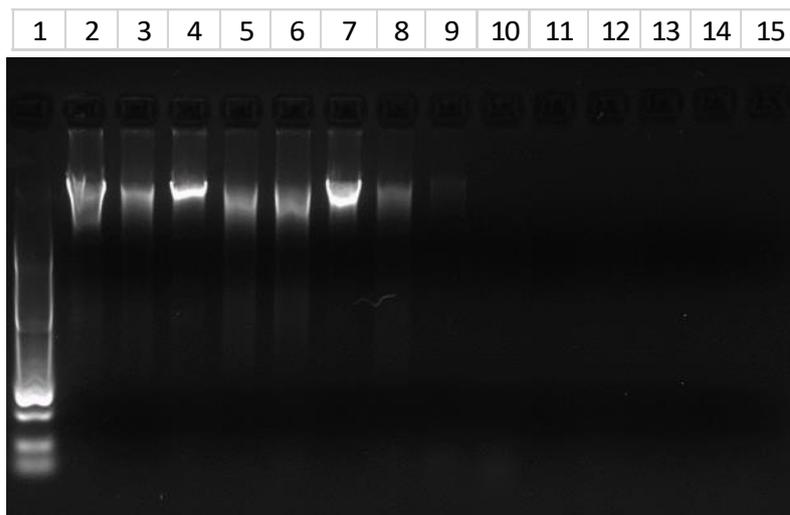


Figura 5. Gel de agarosa: molino de bolas y NaOH

- 1) Marcador de peso molecular
- 2) Alga fresca
- 3) Alga fresca después de hidrólisis enzimática durante 12 h
- 4) Alga pretratada en el molino con bolas pequeñas durante 5 minutos
- 5) Alga pretratada en el molino con bolas pequeñas durante 5 minutos y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida
- 6) Alga pretratada en el molino con bolas pequeñas durante 5 minutos y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida
- 7) Alga pretratada en el molino con bolas grandes durante 60 minutos
- 8) Alga pretratada en el molino con bolas grandes durante 60 minutos y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida
- 9) Alga pretratada en el molino con bolas grandes durante 60 minutos y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida
- 10) Alga pretratada con NaOH 0,5 M
- 11) Alga pretratada con NaOH 0,5 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida

- 12) Alga pretratada con NaOH 0,5 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida
- 13) Alga pretratada con NaOH 2 M
- 14) Alga pretratada con NaOH 2 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida
- 15) Alga pretratada con NaOH 2 M y sometida a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida

3.3.1 Pretratamiento con molino de bolas

La figura 5 pone de manifiesto la siguiente información.

En el pocillo 1 se encuentra el marcador de peso molecular que al igual que, como cabía esperar, no se ha desarrollado perfectamente.

En los pocillos 2 y 3 se encuentran el alga fresca, es decir, que sí que ha sido cultivada en un biorreactor con agua residual, pero que no ha sido pretratada. La diferencia entre el 2 y el 3, es que la muestra situada en el pocillo 3, aunque no haya sido pretratada, sí que ha sido sometida a una hidrólisis enzimática durante 12 horas. Si se observan los pocillos citados en la figura 5, se interpreta, de forma cualitativa, que la muestra sometida a hidrólisis, de nuevo, tiene menos cantidad de ADN. Se vuelve a confirmar la degradación de ADN durante la hidrólisis enzimática.

En los pocillos 4, 5 y 6 se encuentran las extracciones de biomasa algal tratada en el molino de bolas, introducidas en él bolas pequeñas y dejándolo girar durante 5 minutos. En lo que difieren las tres muestras es que la situada en el 4 no ha sido sometida a hidrólisis enzimática y, sin embargo, la 5 y la 6 sí que han sido sometidas a esta hidrólisis durante 12 horas. La diferencia entre la 5 y la 6 es que la hidrólisis de la 5 es de la fracción sólida del alga pretratada, mientras que en la 6, la hidrólisis enzimática es sobre la suspensión sólido-líquida del alga pretratada en el molino de bolas usando bolas pequeñas. Los resultados obtenidos de forma cualitativa indican escasa degradación del ADN con este pretratamiento, de hecho la señal de la muestra pretratada es aún más nítida e íntegra que la del alga fresca. El ADN se degrada con la hidrólisis enzimática tanto para el alga fresca, como para la fracción sólida y la suspensión sólido-líquida de biomasa pretratada. En este caso, no se observa diferencia apreciable entre la hidrólisis de sólido y de suspensión sólido-líquido, probablemente porque, al tratarse de un pretratamiento mecánico, el líquido no contiene tóxicos.

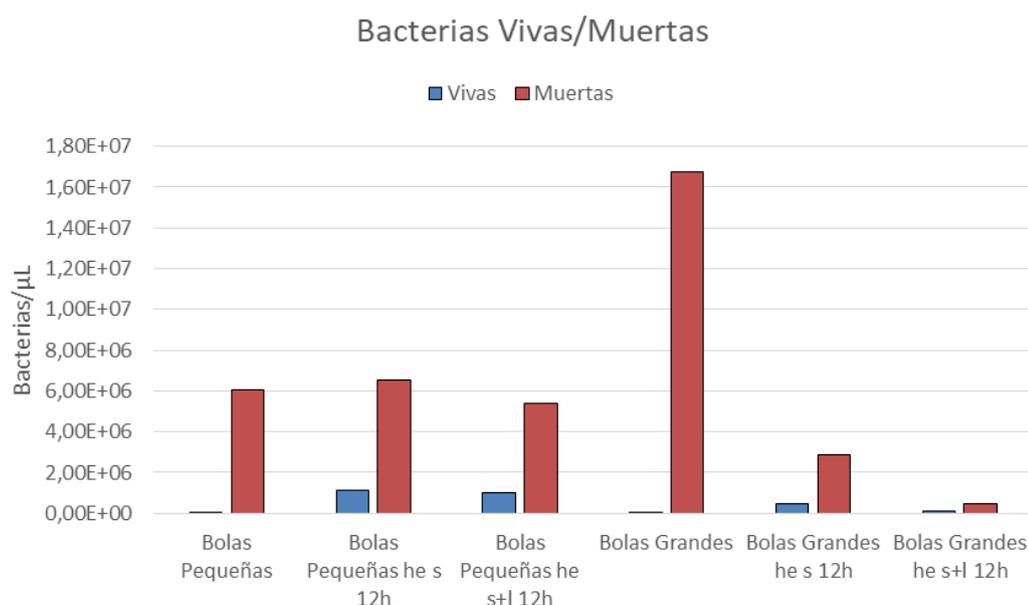
De la figura 5 se pueden obtener otros resultados interesantes. Los pocillos 7, 8 y 9 contienen las muestras pretratadas en el molino lleno de bolas grandes y que ha estado girando durante 1 hora. La diferencia entre ellos es que la

muestra del pocillo 7 no ha sido sometida a hidrólisis enzimática y las muestras de los pocillos 8 y 9 sí. En lo que respecta a las muestras de los pocillos 8 y 9, estas difieren en el estado en el que se encontraba la muestra pretratada. Para el 8 la hidrólisis de 12 horas de duración ha sido de la fracción sólida, mientras que para la 9 ha sido de la suspensión sólido-líquida. Como en el caso anterior, donde las muestras habían sido pretratadas con molino de bolas usando bolas pequeñas, la cantidad de ADN de bacterias disminuye con la hidrólisis. Esto quiere decir que la hidrólisis degrada el ADN. Además, se observa cómo en el pocillo 9 la cantidad de ADN es menor que en el 8. Probablemente los propios compuestos de degradación presentes en el líquido tengan un cierto efecto tóxico.

Se concluye, por lo tanto, del estudio cualitativo lo siguiente. En las dos condiciones, la débil y la fuerte, el número de bacterias en buen estado disminuye cuando el alga pretratada es sometida a hidrólisis enzimática. O, dicho de otro modo, la hidrólisis enzimática degrada el ADN de las bacterias.

Como en este caso sí que hay bacterias en el ADN extraído, se realiza una qPCR para cuantificar el porcentaje de bacterias viables de la muestra. Para poder distinguir entre vivas viables y no viables se utiliza PMA como ya se ha explicado en el apartado dedicado a *Materiales y Métodos*. Como ya se explicó, el PMA sólo se une por enlace covalente al ADN de las bacterias no viables debido a que son estas las que tienen la pared celular deteriorada. El PMA inhibe la cuantificación de bacterias en la qPCR (Guo and Zhang, 2014).

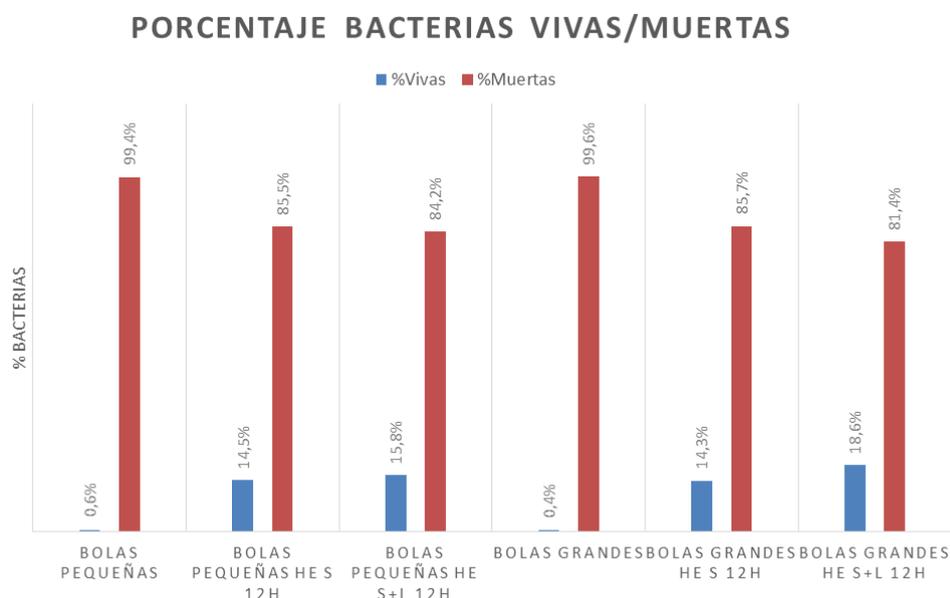
El resultado obtenido de las muestras pretratadas en el molino de la qPCR es el representado en la gráfica 3.



Gráfica 3. Número de bacterias en las muestras pretratadas con el molino de bolas.

Es conveniente destacar que, como se puede apreciar en la gráfica 3, entre las muestras pretratadas con el molino de bolas el grado de esterilización es muy alto. Esto se infiere porque la diferencia entre la barra roja que representa a las bacterias muertas y la barra azul que representa las bacterias viables hay una gran diferencia. La cantidad de bacterias muertas es mucho mayor que la cantidad de bacterias viables en todos los casos de biomasa algal pretratada con el molino de bolas, ya sea utilizando bolas grandes como bolas pequeñas; o habiendo sido sometida a hidrólisis o sin haberlo sido.

Una vez conocido el número de bacterias viables y no viables de cada muestra de ADN extraído, se pueden calcular los porcentajes correspondientes de bacterias viables y de bacterias muertas. Los resultados que se obtienen se representan en la gráfica 4.



Gráfica 4. Porcentaje de bacterias vivas y muertas en las muestras pretratadas en el molino de bolas.

La gráfica 4 confirma lo expuesto con anterioridad: el grado de esterilización en el molino de bolas es muy alto. En todos los casos el porcentaje de bacterias vivas es menor al 20 %.

Con los datos que se recogen en la gráfica 4, se deduce que se utilice el molino con bolas pequeñas o con bolas grandes se obtienen resultados muy similares. Con el pretratamiento de molino con bolas pequeñas el porcentaje de bacterias vivas es igual a 0,6 % y con el pretratamiento con bolas grandes el porcentaje alcanzado es 0,4 %.

Si se observa el porcentaje de bacterias viables, se deduce que es mayor después de la hidrólisis que el de las muestras solo pretratadas. Este resultado

se debe a que las bacterias muertas se degradan al realizar la hidrólisis, como ya se dedujo con anterioridad en el método cualitativo, figura 5 y en la gráfica 3. Al disminuir el número de bacterias totales, debido a que el número de bacterias muertas disminuye, el porcentaje de bacterias vivas aumenta, a pesar de que el número de bacterias vivas se haya mantenido prácticamente igual.

Con lo que respecta a la hidrólisis enzimática de ambas condiciones, bolas pequeñas y grandes, los resultados son prácticamente los mismos para la fracción sólida y para la sólido-líquida. Esto es debido a que el disolvente usado para hacer el pretratamiento es agua destilada por lo que no produce ninguna modificación en el número de bacterias viables. Por lo tanto, al centrifugar para realizar la extracción de ADN a la fracción sólida, la muestra es prácticamente la misma que la de la hidrólisis sólida.

Es conveniente destacar que la diferencia entre el pretratamiento de molino con bolas pequeñas y con bolas grandes es prácticamente inexistente. La hidrólisis también ofrece los mismos resultados, en cualquiera de las condiciones consideradas.

En definitiva, en lo que se refiere al pretratamiento con el molino de bolas, se llega a las siguientes conclusiones. Primero, es conveniente trabajar con bolas pequeñas que con grandes porque las pequeñas están girando 5 minutos mientras que las grandes están una hora y el resultado es prácticamente idéntico, de esta forma se ahorra tiempo y consumo energético. Segundo, no hay diferencia entre la hidrólisis a la fracción sólida y a la suspensión sólido-líquida. Esto es debido a que el disolvente utilizado para la suspensión sólido-líquida es agua destilada. Por último, los resultados de forma cualitativa y cuantitativa coinciden por lo que pueden ser considerados como correctos.

3.3.2 Pretratamiento con hidróxido de sodio

El ADN extraído de las muestras pretratadas con NaOH se encuentra representado en el gel de agarosa de la figura 5.

Todas las muestras pretratadas con NaOH se encuentran entre los pocillos del 10 al 15. La diferencia entre ellas es que la 10, 11 y 12 son pretratadas a la condición más moderada: concentración de NaOH 0,5 M. Estas difieren a su vez entre sí porque la muestra del pocillo 10 no ha sido sometida a una hidrólisis enzimática y las otras dos sí. La hidrólisis de la muestra del pocillo 11 es a la fracción sólida y la del pocillo 12 a la suspensión sólido-líquida. Las muestras de los pocillos 13, 14 y 15 son las pretratadas con la condición fuerte: concentración de NaOH 2 M. Las diferencias entre ellas son las mismas que se han explicado para el caso de la condición moderada.

Como se distingue en la figura 5, todas las muestras pretratadas con NaOH no presentan resto de ADN de bacterias. Por esta razón se deduce que la esterilización que se consigue con este pretratamiento es completa. No existen, pues, en estas muestras bacterias viables. Dado que el resultado final es similar, es aconsejable pretratar las muestras con NaOH 0,5 M en lugar de con NaOH 2 M ya que una menor concentración supone un menor desembolso económico y se consigue un pretratamiento más sostenible. De cara a futuras investigaciones sería interesante evaluar a partir de qué concentración mínima se logra la esterilización completa de las muestras mediante el pretratamiento con NaOH. También es necesario comprobar la posible degradación de los productos de interés con este pretratamiento.

Una vez obtenidos los resultados de los pretratamientos con ácido clorhídrico y con base hidróxido de sodio se comparan con los obtenidos con el pretratamiento térmico. Este pretratamiento como ya se ha citado varias veces a lo largo del trabajo sirve como referencia para los otros dos. Si se comparan los pocillos del 16 al 20 de la figura 3 con los pocillos del 8 al 17 de la figura 4, y con los pocillos del 10 al 15 de la figura 5 se observa que en la referencia hay un mínimo rastro de ADN que no existe en los pretratamientos HCl y NaOH. Esto quiere decir que sí que es precisa una concentración mínima de estos compuestos químicos para conseguir una esterilización completa. Llegar a dar con estas concentraciones de HCl y NaOH haría que se consiguiese un pretratamiento más económico y que causase menos impacto ambiental. Con él podría lograrse una esterilización total de bacterias.

3.4 PRETRATAMIENTO DE EXPLOSIÓN DE VAPOR

En este apartado se desarrollan los resultados obtenidos tras pretratar el alga mediante una explosión de vapor en dos condiciones diferentes: a 2,7 bar y 121°C durante 5 minutos y, explosión a 7,9 bar y 170°C durante 30 minutos.

Se espera que la esterilización, como en el resto de pretratamientos, sea mayor para la condición más extrema que para la más moderada.

Los resultados obtenidos de forma cualitativa mediante la electroforesis en un gel de agarosa a 100 V durante 30 minutos de las muestras correspondientes al alga fresca, los pretratamientos mediante explosión de vapor y sus correspondientes hidrólisis son los que se encuentran representados en la figura 6.

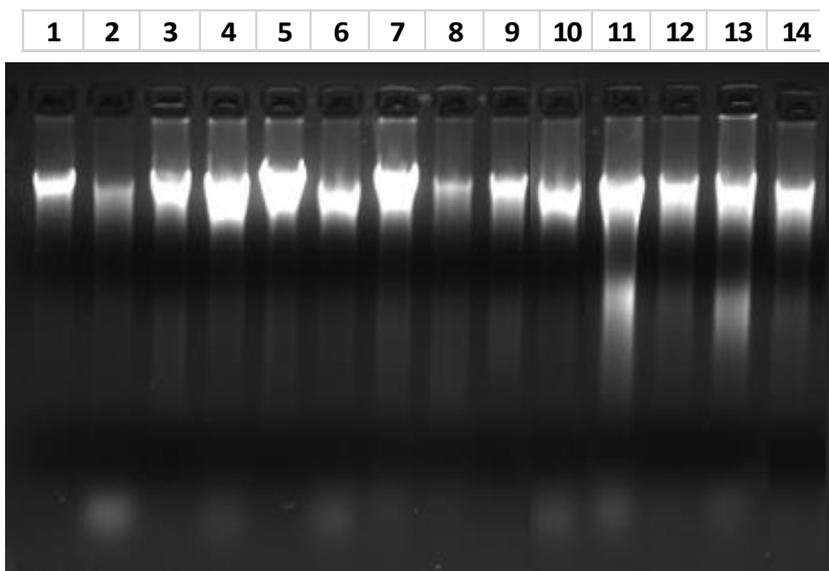


Figura 6. Gel de agarosa: explosión de vapor.

- 1) Alga fresca
- 2) Control positivo alga fresca
- 3) Alga fresca después de hidrólisis enzimática durante 6 h
- 4) Alga fresca después de hidrólisis enzimática durante 12 h
- 5) Alga sometida a explosión de vapor a 2,7 bar y 121°C durante 5 minutos
- 6) Alga sometida a explosión de vapor a 2,7 bar y 121°C durante 5 minutos y a hidrólisis enzimática durante 6 h de la fracción sólida
- 7) Alga sometida a explosión de vapor a 2,7 bar y 121°C durante 5 minutos y a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida
- 8) Alga sometida a explosión de vapor a 2,7 bar y 121°C durante 5 minutos y a hidrólisis enzimática durante 6 h de la suspensión sólido-líquida
- 9) Alga sometida a explosión de vapor a 2,7 bar y 121°C durante 5 minutos y a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida
- 10) Alga sometida a explosión de vapor a 7,9 bar y 170°C durante 30 minutos
- 11) Alga sometida a explosión de vapor a 7,9 bar y 170°C durante 20 minutos y a hidrólisis enzimática durante 6 h de la fracción sólida
- 12) Alga sometida a explosión de vapor a 7,9 bar y 170°C durante 20 minutos y a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida
- 13) Alga sometida a explosión de vapor a 7,9 bar y 170°C durante 20 minutos y a hidrólisis enzimática durante 6 h de la suspensión sólido-líquida
- 14) Alga sometida a explosión de vapor a 7,9 bar y 170°C durante 20 minutos y a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida

Los pocillos 1 y 2, los cuales contienen el alga fresca y su correspondiente control positivo, sí que se corresponden con lo esperado: el control positivo tiene el ADN más degradado y esto se debe a que hay más bacterias muertas, que es exactamente lo que se buscaba al realizar este control.

Los pocillos 3 y 4 que aparecen en la figura 6 y contienen las muestras que han sido sometidas a hidrólisis enzimática del microalga fresca, presentan una banda más ancha debido a un ADN más degradado.

El pocillo 5 contiene la muestra pretratada por explosión de vapor en la condición más suave. En este caso se ve que se ha extraído gran cantidad de ADN bacteriano. La muestra además está un poco más degradada que el alga fresca.

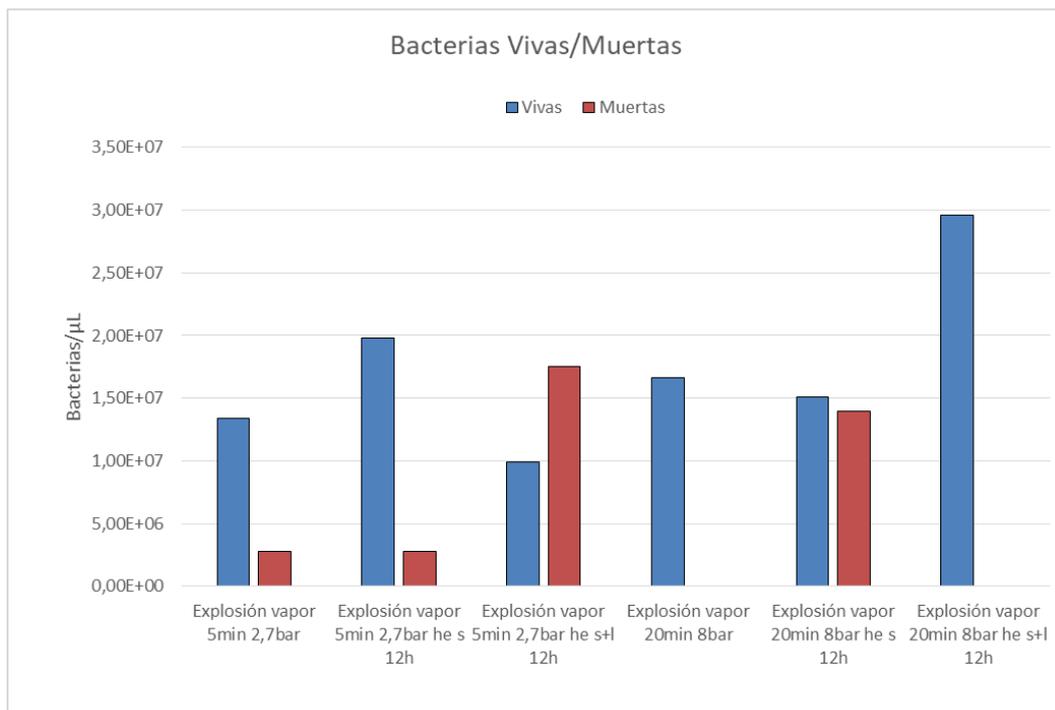
Las muestras introducidas de los pocillos 6 al 9 corresponden a la hidrólisis de la biomasa algal pretratada con la explosión suave del molino de bolas. Por lo general están más degradadas que la muestra de alga solo pretratada. Se observa, como en el resto de los casos, una mayor degradación en las hidrólisis de la suspensión sólido-líquida.

El siguiente pocillo, número 10, corresponde a la muestra pretratada con la explosión en la condición más extrema. El resultado es el esperado ya que parece que la cantidad de población bacteriana es menor que en la condición más suave. Esto concuerda con la lógica, a condiciones más fuertes mayor esterilización.

Los pocillos del 11 al último contienen las hidrólisis de las pretratadas por explosión de vapor a 7,9 bar y 170°C durante 20 minutos. Como se ve en la figura 6, estas muestras están más degradadas; hay más rastro que en la muestra de biomasa que solo ha sido pretratada y no ha sido sometida a hidrólisis. Esto confirma la tendencia hallada en el resto de pretratamientos. La hidrólisis degrada el ADN de las bacterias de las muestras.

Con el objetivo de conocer los resultados cuantitativos se realiza una qPCR. Esto es posible para este pretratamiento porque como se ve en la figura 6 el ADN está bastante íntegro en todas las muestras. Tras realizar esta cuantificación de las muestras por triplicado, para obtener un valor exacto, se comparan los resultados obtenidos con los resultados hallados de forma cualitativa mediante la electroforesis en el gel de agarosa.

Los resultados cuantitativos obtenidos de la qPCR se representan en la gráfica 5. En esta gráfica se exponen dos barras por muestra. La barra azul corresponde a las bacterias viables y la barra roja a las bacterias no viables.



Gráfica 5. Número de bacterias en las muestras pretratadas con una explosión de vapor.

La primera muestra pertenece a la biomasa algal pretratada con una explosión de vapor a 2,7 bar durante 5 minutos. De acuerdo con los resultados obtenidos, este pretratamiento no sirve como esterilizante de la población bacteriana de biomasa algal cultivada en un biorreactor con agua residual. Esto se deduce a partir de la gráfica 5, donde se puede observar que para esta muestra el número de bacterias vivas es mayor que el de bacterias muertas.

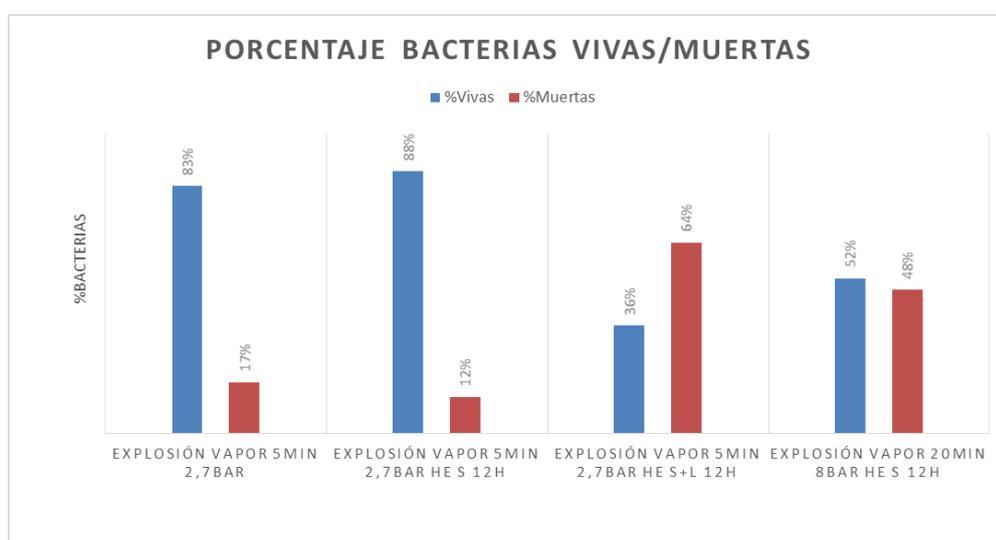
Las dos siguientes muestras hacen referencia a la microalga que, aparte de haber sido pretratada, ha sido sometida a hidrólisis durante 12 horas. El resultado obtenido es el mismo que el obtenido de forma cualitativa. Con lo que respecta a la suspensión sólido-líquida se llega a la misma conclusión que en el resto de pretratamientos. La hidrólisis afecta sobre todo a la materia muerta. En este caso no se ha degradado, pero ha aumentado considerablemente el número de bacterias muertas.

Si la atención se centra en la siguiente muestra, microalga pretratada con las condiciones más extremas, se observa únicamente la cantidad de bacterias viables. Esto se debe a que con la qPCR solo se obtuvieron valores válidos para la muestra con PMA. Como el resultado tiene gran cantidad de bacterias viables, se supone que este pretratamiento tampoco esteriliza.

Las dos últimas muestras se corresponden con la hidrólisis de la biomasa microalgal pretratada en la condición más fuerte de explosión. Una de ellas se realiza a partir de la fracción sólida y otra a partir de la sólido-líquida. Se

observa en la muestra correspondiente a la hidrólisis de la fracción sólida que tiene una cantidad de biomasa algal muy parecida a la muestra pretratada, pero sin hidrólisis. Para la muestra correspondiente a la hidrólisis de la suspensión sólido-líquida no se pueden sacar conclusiones debido a los errores experimentales.

El porcentaje de bacterias vivas y muertas, cuando ha sido posible, se calcula con los datos de la gráfica 5. Todos estos resultados se agrupan en la gráfica 6. Cabe destacar que para las muestras correspondientes a la explosión de vapor en la condición fuerte y a la hidrólisis de la suspensión sólido-líquida de esta, no se ha podido calcular el porcentaje mencionado debido a que no se conoce en ninguna de ellas la cantidad de población bacteriana no viable.



Gráfica 6. *Porcentaje de bacterias vivas y muertas en las muestras pretratadas mediante una explosión de vapor.*

Con estos resultados se observa que la explosión no es un buen método para esterilizar la biomasa algal cultivada en biorreactores con algas residuales. Esto se deduce del gráfico 6 donde se aprecia que el porcentaje de bacterias viables es alto en todas las muestras. Se trata, por tanto, de un resultado generalizado que ocurre en las muestras pretratadas y en las que, además de pretratamiento, han sido sometidas a una hidrólisis enzimática.

Finalmente se concluye del pretratamiento de explosión de vapor que los resultados, obtenidos tanto de forma cualitativa como de forma cuantitativa, coinciden. Además, concuerdan con el resultado esperado. Cabe destacar que la explosión de vapor no sirve para esterilizar las muestras de población bacteriana. Esto quiere decir que las bacterias no mueren con la diferencia de presiones a la que son sometidas en este pretratamiento.

3.5 PRETRATAMIENTO CON ULTRASONIDOS

Como ya se ha citado en el apartado de *Materiales y Métodos*, el pretratamiento con ultrasonidos se usa para romper la pared de las células de las microalgas y se lleva a cabo en dos condiciones que difieren en amplitud, potencia y duración. La primera se lleva a cabo con una potencia aproximadamente de 150 W, esta operación se aplica durante 21 minutos. La segunda, se lleva a cabo a 343 W, esta operación se aplica durante 5 minutos.

Se espera, al igual que el resto de pretratamientos, que el mayor grado de esterilización se dé para el pretratamiento de ultrasonidos con condiciones más fuertes.

El resultado obtenido tras realizar una electroforesis a 100 V durante 30 minutos es el mostrado en la figura 7. Para saber qué muestra se encuentra en cada pocillo, se han numerado y debajo de la figura hay un índice donde se indica la correspondencia del número de pocillo con la muestra de ADN correspondiente. Las muestras introducidas en el gel son la biomasa algal fresca con la que se lleva a cabo este pretratamiento, las muestras pretratadas en ambas condiciones y además las muestras que han sido sometidas a hidrólisis enzimática durante 6 y 12 horas tanto de la fracción sólida como de la suspensión sólido-líquida. Por último, se han introducido el marcador de peso molecular y la biomasa algal pura.

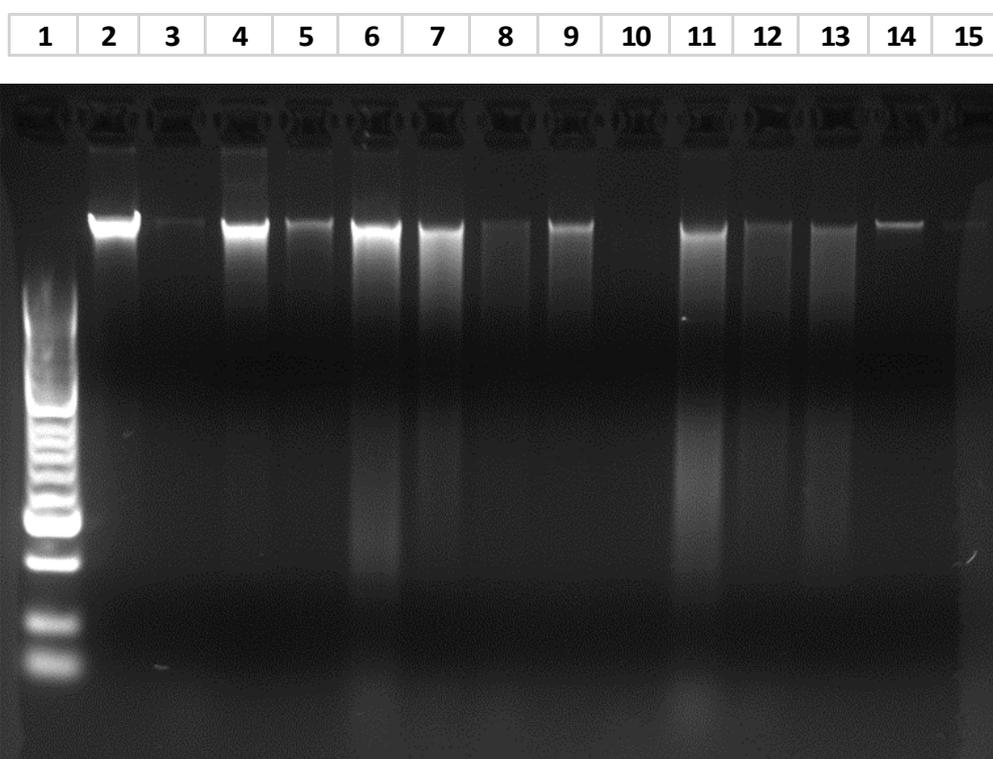


Figura 7. Gel de agarosa: Ultrasonidos.

- 1) Marcador de peso molecular
- 2) Alga fresca
- 3) Control positivo alga fresca
- 4) Alga fresca después de hidrólisis enzimática durante 6 h
- 5) Alga fresca después de hidrólisis enzimática durante 12 h
- 6) Alga sometida a ultrasonidos a 343 W durante 5 minutos
- 7) Alga sometida a ultrasonidos a 343 W durante 5 minutos y a hidrólisis enzimática durante 6 h de la fracción sólida
- 8) Alga sometida a ultrasonidos a 343 W durante 5 minutos y a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida
- 9) Alga sometida a ultrasonidos a 343 W durante 5 minutos y a hidrólisis enzimática durante 6 h de la suspensión sólido-líquida
- 10) Alga sometida a ultrasonidos a 343 W durante 5 minutos y a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida
- 11) Alga sometida a ultrasonidos a 155 W durante 21 minutos
- 12) Alga sometida a ultrasonidos a 155 W durante 21 minutos y a hidrólisis enzimática durante 12 h de la fracción sólida
- 13) Alga sometida a ultrasonidos a 155 W durante 21 minutos y a hidrólisis enzimática durante 12 h de la suspensión sólido-líquida
- 14) Alga pura
- 15) Alga pura

En la figura 7 se pueden percibir los siguientes hechos.

El pocillo 1 contiene el marcador de peso molecular. En este caso el marcador de peso molecular ha corrido en la electroforesis de manera más aproximada a la adecuada, al contrario que en el resto de electroforesis llevadas a cabo. Esto puede asociarse a que en este caso se vertieron en el gel de agarosa 3 μ l para ver si se reducía la interferencia. Como se puede comprobar la interferencia entre el GelRed® y el marcador ha sido menor. Ello se corresponde con un mejor funcionamiento en este caso del marcador de peso molecular.

Si se observan los pocillos 2 y 3 se aprecia una gran diferencia entre ambos. Esta elevada degradación de ADN puede deberse a la muestra empleada, ya que la biomasa va cambiando a lo largo del tiempo y se utilizan diferentes muestras para cada pretratamiento.

Las muestras 4 y 5 se corresponden con las hidrólisis de la microalga cultivada en un biorreactor con agua residual. Se diferencian en el número de horas. Los resultados obtenidos son los esperados. Las dos muestras están más degradadas que el alga fresca, que es lo que ha ocurrido en el resto de pretratamientos. Además se puede observar cómo la microalga sometida a

hidrólisis enzimática durante 12 horas está más degradada que la de 6 horas. Esto, también, concuerda con lo esperado.

La muestra 6 corresponde a la biomasa algal pretratada con ultrasonidos durante menos tiempo, aunque con mayor potencia. Se observa en el gel que sí que hay población bacteriana. No obstante, también se distingue cómo el ADN de esta muestra está bastante degradado. Por tanto, la máquina de ultrasonidos degrada mucho las muestras. Esta degradación es la que permite romper la pared celular y extraer las sustancias de interés de las microalgas.

Los pocillos 7 y 8 contienen la hidrólisis enzimática de la fracción sólida de las muestras pretratadas con ultrasonidos con tiempos cortos. Se diferencian en el número de horas. Se observa el resultado esperado, se degrada el ADN con la hidrólisis enzimática. Además el ADN de la hidrólisis de duración más larga está más descompuesto, lo cual concuerda con el resultado esperado.

Los pocillos 9 y 10 contienen la hidrólisis enzimática de la fracción líquido-sólida de las muestras pretratadas con ultrasonidos con tiempos cortos. Ambas muestras se diferencian en la duración de la hidrólisis. Se observa lo mismo que en las dos muestras anteriores en lo que se refiere a la degradación. Es decir, ambas tienen el ADN más degradado que el ADN de la biomasa algal sin pretratar. Incluso si se observa el pocillo 10 se percibe que prácticamente no hay ADN de población bacteriana. Como en el resto de los casos la hidrólisis de la suspensión tiene un menor número de bacterias viables.

En el pocillo 11 se encuentra la biomasa algal pretratada con ultrasonidos a 155 W durante 21 minutos. Se puede observar en el gel como sí que hay población bacteriana, pero menor que en el pretratamiento con ultrasonidos más breve. Esto concuerda con lo esperado el tratamiento más fuerte esteriliza más que el débil.

Los pocillos 12 y 13 engloban las muestras que, además de haber sido pretratadas, han sido sometidas a hidrólisis enzimática durante 12 horas. Una muestra es de la hidrólisis de la fracción sólida y la otra de la suspensión sólido-líquida. Ambas tienen el ADN más degradado que el ADN de la muestra únicamente sometida al pretratamiento, pocillo 2. Esto lleva a dar por válido el resultado ya que se corresponde con lo esperado.

Los últimos pocillos contienen biomasa algal pura. Estas algas puras han sido cultivadas en un medio sintético estéril en el laboratorio. Estas muestras sirven para comprobar que la técnica únicamente extrae ADN de bacterias y no extrae de las microalgas. Por lo tanto, se espera que no contengan resto ninguno de población bacteriana. Estas algas, supuestamente puras, no debieran dar señal y sirven para comprobar el correcto funcionamiento del método, en el que se observa únicamente ADN procedente de bacterias. La muestra 14 contiene

una cantidad mínima de bacterias, por una contaminación dentro de lo previsible en un alga cultivada en un laboratorio en el que se trabaja con bacterias. La muestra 15 presenta mayor pureza, y muestra que las bandas de ADN son atribuibles únicamente a las bacterias.

Se concluye de este pretratamiento con ultrasonidos lo siguiente. Primero, dado que las microalgas pretratadas con ultrasonidos contienen población bacteriana, se ha intentado realizar una PMA-qPCR para poder contabilizar el número de bacterias vivas y el número de bacterias muertas presentes en la muestra. El resultado obtenido no ha sido válido. Debido a lo expuesto en la *Introducción*, un ADN degradado, como el obtenido de las muestras pretratadas con ultrasonidos, no tiene la calidad suficiente para poder realizar sobre él una qPCR. Segundo, el marcador de peso molecular ha funcionado correctamente. Por ello, es mejor utilizar una menor cantidad de GelRed® siempre que sea suficiente para que permita ver el ADN extraído de las muestras en la lámpara de luz ultravioleta. Tercero, este pretratamiento no sabemos si esteriliza las muestras de población bacteriana, pero parece probable puesto que degrada mucho su ADN. Cuarto, al igual que en el resto de pretratamientos, la hidrólisis enzimática disminuye la población bacteriana, disminuyendo la cantidad de bacterias muertas debido a que estas se degradan durante el proceso.

4. CONCLUSIONES

En este apartado se desarrollan todas las conclusiones obtenidas en la búsqueda del cumplimiento del objetivo del trabajo, que es: estudiar el efecto esterilizante de diferentes pretratamientos de tratamiento de biomasa algal cultivada en agua residual en un biorreactor.

Para analizar la evolución del grado de esterilización en los distintos puntos del proceso es necesario partir de la extracción de ADN de las muestras. Una vez obtenido, se realiza la evaluación de la esterilización de la biomasa algal, tanto de forma cualitativa como de forma cuantitativa, siempre que sea posible. Debe tenerse presente que solo es posible la evaluación cuantitativa si el ADN extraído de las muestras es de alta calidad.

Aplicando la metodología desarrollada en este trabajo, se ha realizado un cuidadoso trabajo de experimentación en el laboratorio que ha proporcionado las siguientes conclusiones:

En primer lugar, se concluye que las técnicas tanto cualitativa como cuantitativa utilizadas para estudiar el efecto esterilizante de los distintos puntos del proceso han resultado exitosas, permitiendo cuantificar diferenciadamente la población de bacterias vivas y muertas en cada muestra. Se ha podido comprobar que la extracción de ADN es únicamente de bacterias, gracias a la utilización de alga pura crecida en un medio estéril. Además los resultados obtenidos con control positivo demuestran la correcta ejecución de la técnica. Se ha conseguido solventar, también, en el análisis cualitativo realizado mediante una electroforesis del gel de agarosa la interferencia existente entre el GelRed® y el marcador de peso molecular. La forma de solucionar este problema ha sido vertir durante la preparación del gel una menor cantidad de GelRed® pero la suficiente para marcar las muestras de ADN extraído de modo que se puedan ver en la lámpara de luz ultravioleta.

En segundo lugar, la microalga fresca cultivada en un biorreactor ha sido estudiada varias veces y en todas ellas se ha obtenido población bacteriana viable y no viable, siendo mayor el porcentaje de viable. El porcentaje medio tras la cuantificación es 67 % de bacterias vivas y 33 % de bacterias muertas.

En tercer lugar, y por lo que se refiere a los pretratamientos estudiados, cabe destacar lo siguiente:

- Para el pretratamiento térmico los resultados más relevantes son los siguientes. Primero, al realizar el estudio cualitativo se sabe que la esterilización de este pretratamiento es prácticamente completa debido a que no hay casi restos de ADN de bacterias en el gel de agarosa. Segundo, cabe destacar que este pretratamiento sirve como referencia

para los pretratamientos de ácido y base, por eso se lleva a cabo en las mismas condiciones de autoclave que estos, pero en lugar de incorporar sustancias químicas como disolventes incluye agua. Si se comparan los tres pretratamientos se llega a la conclusión de que en la referencia sí hay un mínimo rastro de ADN que no existe en los pretratamientos HCl y NaOH. Esto quiere decir que sí que hay una concentración mínima de estos compuestos químicos para conseguir una esterilización completa.

- El pretratamiento con ácido clorhídrico no deja en las muestras población bacteriana viable. Por lo tanto, este pretratamiento esteriliza en su totalidad a las muestras en las dos condiciones en las que se realiza, HCl 0,5 M y HCl 2 M. Para que la inversión económica en pretratar la muestra sea menor así como conseguir un menor impacto ambiental y una menor degradación de los productos de interés, sería conveniente encontrar en futuras investigaciones la concentración de HCl mínima para la cual la esterilización es completa.
- Del pretratamiento con hidróxido de sodio cabe resaltar que los resultados coinciden con los citados en el pretratamiento con ácido clorhídrico. Por lo tanto, este pretratamiento, también, esteriliza en su totalidad a las muestras en las dos condiciones en las que se realiza, NaOH 0,5 M y NaOH 2 M. Al igual que con el ácido, para disminuir la inversión económica y el impacto ambiental sería conveniente encontrar en futuras investigaciones la concentración de NaOH mínima para la cual la esterilización sea completa.
- Cuando se usa el pretratamiento a base de peróxido de hidrógeno el resultado obtenido de forma cualitativa indica que existe más cantidad de bacterias en las muestras pretratadas en la condición más suave, 0,5 % de H₂O₂, que en la condición más fuerte, 7,5 % de H₂O₂. Esto se puede asociar a que hay más bacterias viables en la condición suave que en la condición fuerte porque el ADN que se extrae es el que no está degradado. Esto concuerda con la lógica: cuanto más extrema sea la condición, más esterilización. No obstante, para comprobarlo, se realiza el estudio cuantitativo por qPCR. Los resultados indican que los porcentajes de bacterias viables y no viables para el pretratamiento suave son 98 % y 2 % respectivamente. Mientras que para la condición más fuerte estos porcentajes son 56 % de bacterias viables y 44 % de bacterias no viables. Por lo tanto, los resultados obtenidos de forma cualitativa y de forma cuantitativa coinciden, y concuerdan con lo esperado.

- Si se trabaja con el molino de bolas el resultado obtenido de forma cualitativa indica que en las dos condiciones del molino de bolas (bolas grandes y pequeñas) existe población bacteriana. Además se observó en el gel que el ADN no estaba muy degradado, por tanto, se pudo realizar una qPCR que permitió conocer el grado de esterilización de forma cuantitativa. Los resultados numéricos fueron los siguientes- Para la condición más débil del molino de bolas, 0,6 % de bacterias viables y 99,4 % de bacterias no viables y para la condición más fuerte 0,4 % de bacterias viables y 99,6 % de bacterias no viables. Como la diferencia en los porcentajes es mínima es más conveniente trabajar con bolas pequeñas que con grandes porque las pequeñas están girando durante 5 minutos mientras que las grandes están girando una hora. De esta forma se ahorra tiempo y consumo energético.
- Los resultados obtenidos del pretratamiento de explosión de vapor son los siguientes. Por lo que respecta a los resultados cualitativos, se observa que sí que hay población bacteriana en las dos condiciones en las que se lleva a cabo el pretratamiento (2,7 bar durante 5 minutos y 7,9 bar durante 20 minutos). En cuanto a la experimentación en términos cuantitativos, con la qPCR se obtiene para la muestra pretratada durante 5 minutos un 83 % de bacterias viables y un 17 % de bacterias no viables.
- Del pretratamiento con ultrasonidos cabe destacar los siguientes resultados. Primero, las microalgas pretratadas de este modo contienen población bacteriana como se ha visto de forma cualitativa. Este ADN bacteriano estaba muy degradado. Segundo, no ha sido posible determinar el número de bacterias vivas y muertas por PMA-qPCR debido a que el ADN está muy degradado. Tercero, no es posible determinar si este pretratamiento esteriliza completamente las muestras de población bacteriana, pero sí que degrada mucho su ADN.

En resumen, según el análisis cualitativo y cuantitativo podemos considerar que los pretratamientos con mayor poder esterilizante son: ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, térmico y molino de bolas. De las muestras pretratadas con la explosión de vapor y con peróxido de hidrógeno en la condición suave, se sabe que la esterilización no es completa. Hay un 98 % de bacterias viables en la condición suave de molino y 56 % para la condición fuerte, mientras que para la condición suave del peróxido de hidrógeno el porcentaje es 83 % de bacterias viables. Para la condición fuerte de peróxido de hidrógeno y ultrasonidos no se sabe el porcentaje exacto de esterilización debido a que sí se observa población

bacteriana de forma cualitativa pero el ADN extraído no tiene la suficiente calidad para ser cuantificado.

En quinto lugar, después de analizar los resultados obtenidos de las hidrólisis enzimáticas durante 6 y 12 horas de toda la biomasa algal sin pretratar y pretratada se llega a las siguientes conclusiones. Durante la hidrólisis en el caso de existir bacterias viables se reproducen. Al mismo tiempo, en los casos en los que se han generado compuestos tóxicos, durante la hidrólisis gran parte de las bacterias mueren. En cualquier caso, parece que durante la hidrólisis se degrada el ADN de las bacterias.

Para finalizar este apartado de conclusiones cabe indicar de cara futuras investigaciones que existe la duda de si en todas las extracciones de ADN se ha conseguido la misma eficacia. Deben, pues, los resultados interpretarse con cautela. No se pueden normalizar los resultados obtenidos mediante la cuantificación de ADN del NanoDrop. Para futuras investigaciones sería muy interesante buscar una solución a este problema.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Alzate ME, Muñoz R, Rogalla F, Fdz-Polanco F, Pérez-Elvira SI. 2012. Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresour. Technol.* **123**:488–494.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412010279>.
- Bayer K, Kamke J, Hentschel U. 2014. Quantification of bacterial and archaeal symbionts in high and low microbial abundance sponges using real-time PCR. *FEMS Microbiol Ecol.* <http://www.its.caltech.edu>.
- BIO RAD. 2018. SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix | Investigación Científica | Bio-Rad. <http://www.bio-rad.com/es-sv/product/ssoadvanced-universal-sybr-green-supermix?ID=MH5H1EE8Z>.
- Bolado-Rodríguez S, Toquero C, Martín-Juárez J, Travaini R, García-Encina PA. 2016. Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* **201**:182–190.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415015801>.
- Bouchard J, Nguyen TS, Chornet E, Overend RP. 1991. Analytical methodology for biomass pretreatment. Part 2: Characterization of the filtrates and cumulative product distribution as a function of treatment severity. *Bioresour. Technol.* **36**:121–131.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/096085249190169K>.
- BSP. 2016. BioSpec Products • Mini-Beadbeater-16. <https://biospec.com/product/mini-beadbeater-16>.
- Checa Rojas A. 2017. Método: Gel de electroforesis Agarosa. <http://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>.
- Crisafuli FAP, Ramos EB, Rocha MS. 2015. Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain. *Eur. Biophys. J.* **44**:1–7.
<http://link.springer.com/10.1007/s00249-014-0995-4>.
- Desneux J, Chemaly M, Pourcher AM. 2015. Experimental design for the optimization of propidium monoazide treatment to quantify viable and non-viable bacteria in piggery effluents. *BMC Microbiol.* **15**:1–9.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0505-6>.
- ECOGEN. 2018. HyperLadder II - MARCADORES DE TAMAÑO - ELECTROFORESIS - Genómica - Ecogen · Biología molecular. <http://www.ecogen.com/producto.asp?id=584>.

- Enzymes for education. 2018. Cellulase (Celluclast).
<http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/celluclast.html>.
- Guo F, Zhang T. 2014. Detecting the Nonviable and Heat-Tolerant Bacteria in Activated Sludge by Minimizing DNA from Dead Cells. *Microb. Ecol.* **67**:829–836.
- Hielscher. 2018. UIP1000hdT – Un homogeneizador potente y versátil.
https://www.hielscher.com/es/i1000_p.htm.
- Honglay Chen P, Oswald WJ. 1998. THERMOCHEMICAL TREATMENT FOR ALGAL FERMENTATION. *Pergamon Environ. Int.* **24**:889–897.
https://ac.els-cdn.com/S0160412098000804/1-s2.0-S0160412098000804-main.pdf?_tid=32e5adc6-4c60-49a4-a7a6-5606c9c75665&acdnat=1528898933_222b2222e56442c4fecbdf0521304a67.
- Isabel S, Muñoz E-P-R, Phd T, Andrade MA. PROJECTS: ANAEROBIC DIGESTION OF MICROALGAE OPTIMIZATION OF BIOGAS PRODUCTION FROM ALGAL BIOMASS. <http://www.iqtma.uva.es/envtech/>.
- Ledvance Proyector LED. 2017. Ledvance Proyector LED 100W 4000K 10000lm IP65 Negro | Simétrico - Reemplazo 25 | Lamparadirecta.
<https://www.lamparadirecta.es/ledvance-proyector-led-100w-4000k-10000lm-ip65-negro-simetrico-reemplazo-250w>.
- Marcos M, García-Cubero MT, González-Benito G, Coca M, Bolado S, Lucas S. 2013. Optimization of the enzymatic hydrolysis conditions of steam-exploded wheat straw for maximum glucose and xylose recovery. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **88**:237–246.
<http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.3820>.
- Martín Juárez J, Lorenzo Hernando A, Muñoz Torre R, Blanco Lanza S, Bolado Rodríguez S. 2016. Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresour. Technol.* **218**:265–271.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241630904X>.
- Martín Juárez J, Riol Pastor E, Fernández Sevilla JM, Muñoz Torre R, García-Encina PA, Bolado Rodríguez S. 2018. Effect of pretreatments on biogas production from microalgae biomass grown in pig manure treatment plants. *Bioresour. Technol.* **257**:30–38.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852418302566>.
- Morero B, Campanella EA. 2013. Simulación del Proceso de Absorción Química con Soluciones de Aminas para la Purificación Biogás. *Inf. tecnológica* **24**:25–32.
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642013000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

- MP Biomedicals. 2013. FastDNA ® SPIN Kit for Feces. *Manuf. Protoc.*:1–16.
- OPTIC ivymen SYSTEM. 2012. Orbital shaker incubator. http://www.grupo-selecta.com/images/noticias/adjunto2_91.pdf.
- Postma PR, Suarez-Garcia E, Safi C, Yonathan K, Olivieri G, Barbosa MJ, Wijffels RH, Eppink MHM. 2017. Energy efficient bead milling of microalgae: Effect of bead size on disintegration and release of proteins and carbohydrates. *Bioresour. Technol.* **224**:670–679. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416315929>.
- SIGMA-ALDRICH. 2016. Gel Loading Solution for NA electrophoresis, solution | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g7654?lang=es®ion=ES>.
- ThermoFisher SCIENTIFIC. 2018. Espectrofotómetro NanoDrop™ Lite. <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-LITE-PR>.
- Tijani H, Abdullah N, Yuzir A. 2017. Integration of microalgae biomass in biomethanation systems. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **52**:1610–1622. https://ac.els-cdn.com/S1364032115008266/1-s2.0-S1364032115008266-main.pdf?_tid=7c2ceba8-6e27-4932-a9fe-89145296eeb0&acdnat=1528901707_02f947744f029698974cfccde d104e92.