

## APÉNDICE D

### MICROBIOLOGÍA Y ESEM

En este apéndice se presentan algunas microfotografías de varias muestras de LM realizadas a una ampliación entre  $\times 100$  y  $\times 4000$  con un microscopio electrónico de barrido ambiental (environmental scanning electron microscope ESEM) modelo Electroscan 2020, que está instalado en el Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya.

Dicho equipo permite el análisis y visualización de muestras húmedas en estado natural o bajo condiciones ambientales controladas (temperatura y humedad relativa), sin la necesidad de usar técnicas convencionales de preparación de muestras (Collins *et al.*, 1993). La fase de vapor con carga ( $H_2O^+$ ) que rodea a la muestra actúa como película conductora, con lo que se logra una adecuada visualización mediante el bombardeo de electrones sobre la superficie de dicha muestra.

Las muestras líquidas observadas se instalaron en unos portaobjetos cóncavos que se colocaron dentro de la cámara ambiental del equipo. Dentro de esta cámara se puede controlar la temperatura del portaobjetos entre 5 y 40°C mediante un dispositivo termoeléctrico Peltier. Igualmente se puede controlar la presión de vapor dentro de la cámara entre presiones absolutas que usualmente varían entre 1 torr y 20 torr (1 torr  $\approx 1.333 \times 10^2$  Pa). Esto permite que la cámara del microscopio pueda ser utilizada para estudiar los cambios que se generan al secar, humedecer, calentar y enfriar la muestra.

Para las observaciones en modo ambiental se utilizó una temperatura variable entre 8 y 9°C y una presión de vapor absoluta entre 4.9 y 5.7 torr, con la finalidad de obtener la mejor resolución de imagen. Las condiciones de presión de vapor y temperatura imponen una humedad relativa dentro de la cámara, cuyo valor se indica en la Figura D.1. Esta humedad relativa  $h_r$  se define como la relación entre la presión de la cámara  $u_c$  y la presión de vapor de saturación  $u_{co}$  a la misma temperatura (Romero, 1999).

Las primeras observaciones sobre una muestra de LM se realizaron a baja ampliación con la finalidad de detectar los elementos a analizar. Posteriormente, se aumentaba la ampliación y se vigilaba el tiempo de exposición con la finalidad de evitar la desecación del líquido. El tiempo aproximado de observación de cada muestra se limitaba a un máximo de 10 minutos.

Esta técnica permitió observar muestras líquidas y apreciar la estructura de los flóculos en forma tridimensional, así como la estructura externa de la microfauna y los filamentos existente en el líquido de mezcla (Figura D.2 a y b). Sin embargo, la muestra se secaba muy rápido por efecto del vacío, dañando la estructura de la microfauna (Figura D.2 c y d). Para reducir el efecto de la deshidratación de los microorganismos, se probaron distintos fijadores como glutaraldehído + tampón, Bouin (Salvadó, 1990) y paraformaldehído.

Las muestras con Bouin no tuvieron un buen comportamiento debido a la precipitación de cristales de mercurio, por lo que fue necesario realizar un lavado de la mezcla para reducir el número de cristales. Las muestras con glutaraldehído + tampón también presentaron la precipitación de cristales (Figura D.3 a). Las muestras con

paraformaldehído dieron mejores resultados, al no observarse precipitación de cristales y permitir una fijación más clara de los microorganismos (Figura D.3 d).

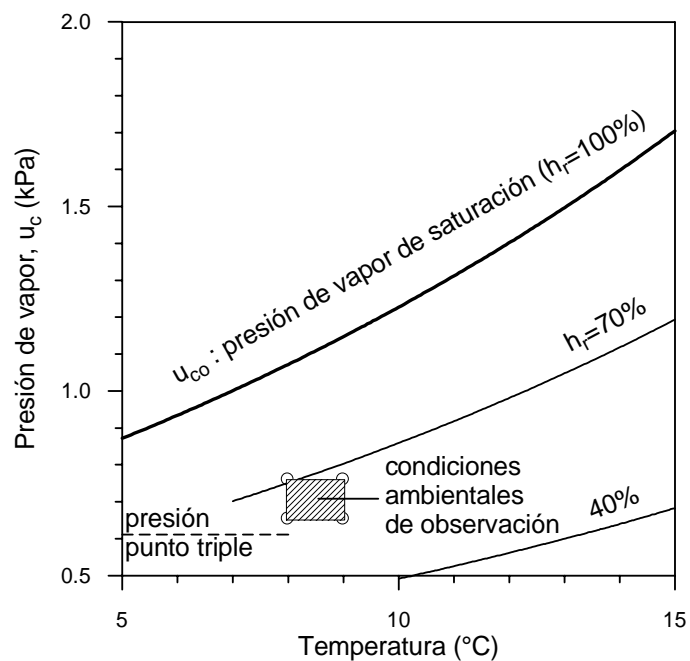


Figura D.1 Condiciones ambientales de observación de las muestras líquidas a una humedad relativa cercana al 70%.

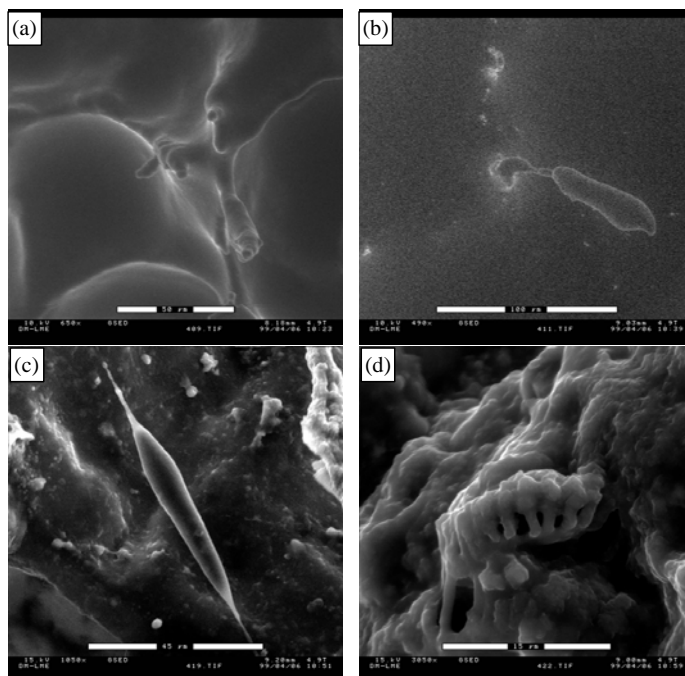


Figura D.2 Fotografías en microscopía ambiental (ESEM). (a) y (b) muestra líquida; (c) y (d) muestra seca.

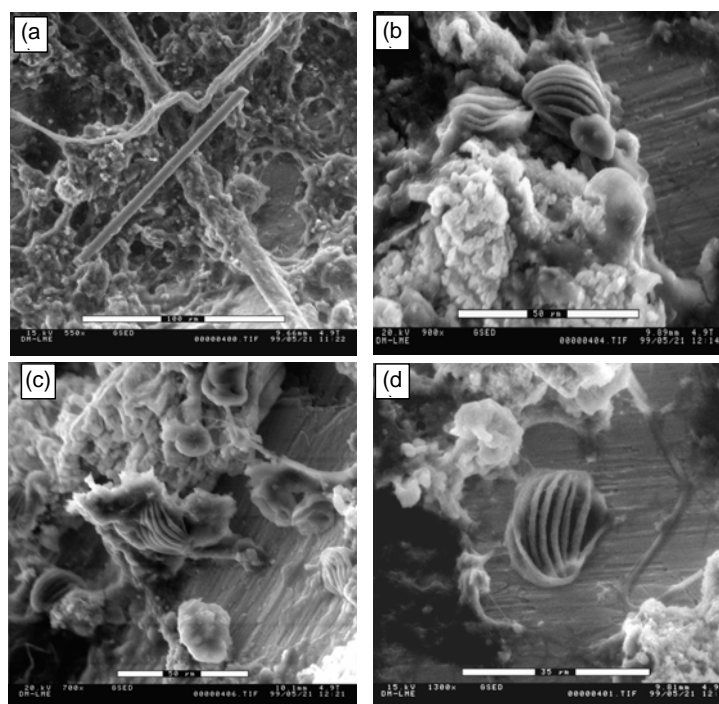


Figura D.3 Fotografías en microscopía ambiental (ESEM). (a) Flóculo de estructura abierta con presencia de filamentos, muestra tratada con Bouin; (b), (c) y (d) flóculo compacto con presencia de microfauna (*Aspidisca*).

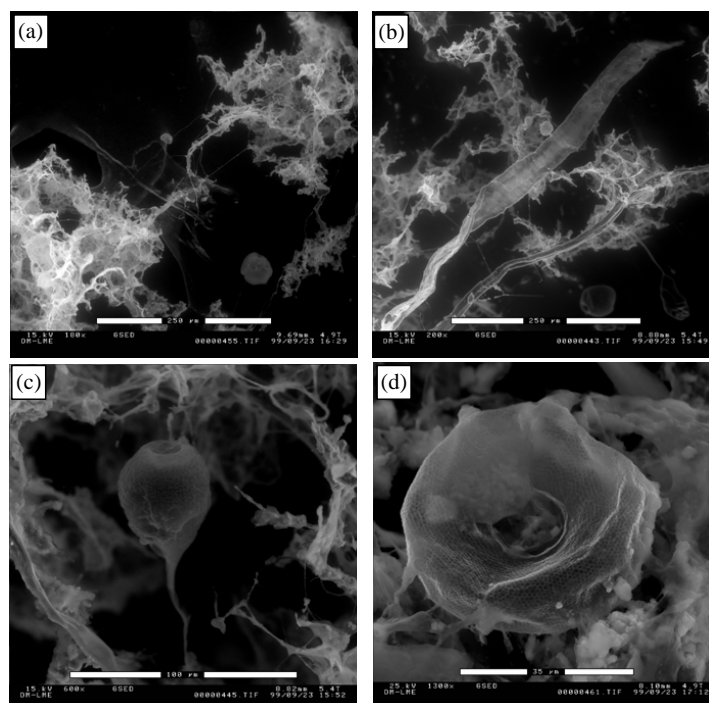


Figura D.4 Fotografías en microscopía ambiental (ESEM). (a) conexión entre flóculos de estructura abierta, (b) detalle de filamento, (c) detalle de ciliado (*Epistylis* sp) y (d) detalle de protozoario.

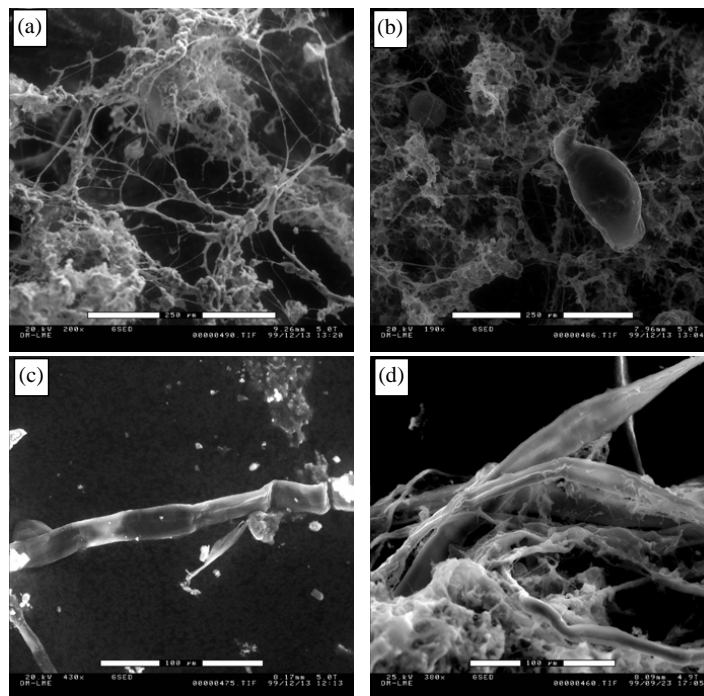


Figura D.5 Fotografías en microscopía ambiental (ESEM). (a) y (b) Flóculo de estructura abierta con abundancia de filamentos (días con bulking), (c) y (d) detalle de filamento.