

EMPLEO DE INDICES GEOQUIMICOS EN EL ESTABLECIMIENTO DEL MONITOREO DE CULTIVOS DE MICROALGAS.

Ma. del C. Espinosa, P. González, J.R. Fagundo, M. Suárez, G. Benítez, J. Ramírez, R. Mayarí. Lab. Analítica y Lab. Hidrogeoquímica. División de Estudios sobre Contaminación Ambiental (DECA), Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Apartado Postal 6990. Tlf. 21-8897. Fax (537) 336321. E.mail: deca@infomed.sld.cu.

RESUMEN.

Numerosas investigaciones relacionadas con el control automatizado de cultivos algales se llevan a cabo por diferentes laboratorios y grupos de investigación, tratando de contar con sistemas que permitan un monitoreo continuo, en línea, de todas las variables del proceso, abarcando la dinámica del mismo en toda su complejidad, así como las interrelaciones entre el sistema biológico y su ambiente físico y químico. A la vez, se trata de que los sistemas implementados no sean costosos, de manera que no encarezcan los procesos.

*El medio de cultivo de algunas microalgas como la *Arthrospira* sp., se puede considerar como un agua altamente mineralizada, debido al alto contenido de sales disueltas que posee. En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos al aplicar algunos índices geoquímicos, como la Conductividad Eléctrica, los cuales permiten sentar las bases para implementar un sistema de monitoreo de los cultivos de estas microalgas.*

INTRODUCCION.

Hoy en día, dentro del desarrollo de la biotecnología de las microalgas, existe una tendencia creciente a lograr un monitoreo y control automatizado de los cultivos, ya que para utilizar favorablemente las propiedades de estos microorganismos se requiere un control adecuado y confiable de las principales variables del proceso para obtener una biomasa con las características deseadas.¹

Diferentes laboratorios y grupos de investigación realizan trabajos encaminados a lograr el control automatizado de los cultivos de microalgas como *Spirulina*², *Dunaliella*³ y otras⁴, lo que permite describir el estado del bioproceso, en detalle, en cualquier etapa de su desarrollo, y realizar un registro más exacto del mismo, facilitando su modelación, optimización y control.

Algunas de las referencias que aparecen en la literatura, utilizan para la automatización de estos procesos, sensores altamente sofisticados y costosos como los aplicados en sistemas de inyección a flujo utilizando el efecto de campos enzimáticos, para el monitoreo simultáneo de componentes del medio de cultivo.⁵ Sin embargo, también aparecen referencias del empleo de sensores físico-químicos tradicionales, para la medición y control del ambiente físico-químico que prevalece en el medio, como es, acidez (pH), oxígeno disuelto (pO₂), dióxido de carbono disuelto (pCO₂), potencial redox⁶ y, en este mismo sentido, el empleo de la medición de la conductividad eléctrica (CE) como indicador en el monitoreo de las principales variables de control de cultivos de la microalga *Arthrospira*, ya que se ha comprobado⁷ que aquella resulta un excelente indicador para la estimación de otros parámetros de este medio de cultivo. Esto permitiría utilizar una celda de conductividad apropiada como sensor.

La CE es uno de los parámetros más frecuentemente medido y utilizado en el control de la calidad de las aguas⁸. Este parámetro correlaciona con la suma de las concentraciones de los iones mayoritarios disueltos y, a menudo, con la de un ion disuelto específico, por lo que suple la determinación analítica de los iones principales.

El empleo de las mediciones de CE como índice geoquímico para el control de la calidad de las aguas naturales se fundamenta en el hecho de que la litología es el factor que controla la

composición química de las mismas. Sin embargo, en el caso de los medios de cultivo de las microalgas, hay que sustentar esta utilización, tomando como litología la biomasa como tal. Se debe tener en cuenta que el medio de cultivo de esta microalga posee altas concentraciones de hidrógeno carbonato de sodio (del orden de 16 g/L), así como otras sales (nitrato de sodio 2,5 g/L, etc.) lo que hace que posea una elevado contenido de Sólidos Disueltos Totales así como una alta alcalinidad, pudiendo considerarse como un agua de elevada mineralización. Y es en el caso de las aguas con elevada mineralización donde cabe destacar, que para el uso de las mediciones de CE en la obtención de ecuaciones de correlación matemática con las concentraciones de los iones mayoritarios y de las CE teóricas para el chequeo de la calidad de los datos analíticos antes de su procesamiento estadístico, se debe tener en cuenta la influencia de los iones complejos los cuales traen consigo la disminución de las concentraciones molales de los iones libres y por tanto su contribución a la CE total. Para esto en este trabajo se aplican modelos matemáticos y programas de computación adecuados, teniendo en cuenta los valores de fuerza iónica y contenidos de Sólidos Disueltos Totales propios de este medio.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en busca de las bases que permitan sentar un método de monitoreo y control automatizado de cultivos de microalgas como *Arthrospira* sp, teniendo en cuenta la alta mineralización del medio de cultivo correspondiente.

MATERIALES Y METODOS.

La microalga utilizada fue la cianobacteria *Arthrospira* sp. La cepa provino de la Colección de Microalgas del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana.

Experiencias de Laboratorio. Los cultivos se realizaron en cubetas plásticas de 30 L de volumen y 15 cm de profundidad. La agitación se realizó mediante paletas acopladas a un motor, a 15 rpm, iluminándose con 4 lámparas de neón de 40 W cada una, situadas a 40 cm por encima de la superficie del líquido. La temperatura de los cultivos se equilibró con la temperatura ambiente, la cual fue de 35 a 37°C.

Se utilizó el medio de cultivo Zarrouk⁹, cuya composición se muestra en la tabla 1.

Monitoreo de los Cultivos. Diariamente se registraron la Conductividad Eléctrica (CE) (equipo ECCA-2 CNIC), pH (pHmetro MPH-4B CNIC) y temperatura. Los análisis de los iones hidrógeno carbonato (HCO_3^-), carbonato (CO_3^{2-}), cloruro (Cl^-), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}) (empleando métodos volumétricos), y sodio (Na^+) (mediante fotometría de llama) así como los de Clorofila a y Absorbancia a 750 nm (A_{750}) (fotocolorímetro digital Spekol modelo 210) se realizaron por duplicado, según aparecen en los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales¹⁰. A partir del sexto día se mantuvo el pH en un rango adecuado (9,3 - 9,7)¹¹, con un suministro de CO_2 .

Procesamiento matemático. Los datos experimentales fueron procesados mediante el programa EXCEL¹², el paquete de programas estadístico Statistica¹³, y los programas para cálculos hidrogeoquímicos HYDROWIN (versión 3.0)¹⁴ y PHREEQM^{15, 16}.

Para el cálculo de la Conductividad Eléctrica teórica (CE_t) se aplicó el modelo de Miller⁸.

$$\text{CE}_t = \sum_i^n (\alpha_i C_i S_i)^f$$

Donde α_i = Fracción molar del ion libre i ; C_i = Concentración del ion i ; S_i = Conductividad Eléctrica Específica del ion i .

La fuerza iónica (μ) según la ecuación de Lewis y Randall¹⁷:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i^n m_i Z_i^2$$

Donde m_i = Conc. molal del ion y Z_i = Carga del ion

RESULTADOS Y DISCUSION.

En la Tabla 2 se muestra la matriz de correlación obtenida al procesar los datos experimentales del monitoreo de los cultivos de *Arthrospira*, con el fin de definir cuál de las variables cuyas mediciones se realizan por métodos instrumentales pudiera servir como indicador mediante el cual estimar las demás y sentar las bases para un método de monitoreo y control automatizado de dichos cultivos.

Como puede observarse, las mejores correlaciones se obtuvieron entre la CE y las otras variables, con coeficientes de correlación altamente significativos. Sin embargo, resaltó la ausencia de correlación entre el ion hidrógenocarbonato (HCO_3^-) y los restantes parámetros. Siendo este ion uno de lo más importantes a medir y controlar, ya que es la fuente de Carbono de este tipo de microalgas, es importante profundizar en los fenómenos que pueden dar lugar a este comportamiento.

A continuación, se comprobó si los datos de CE provenían de una población normal, premisa indispensable para poder aplicar los diferentes test estadísticos, con posterioridad. Para ello, se construyeron los histogramas de frecuencias y se aplicaron los test de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilks, a los datos de las diferentes corridas. experimentales. En la figura 1 se muestra uno de los histogramas de frecuencia obtenidos.

Tabla 2. Matriz de Correlación entre los diferentes parámetros medidos

Parámetro	Coeficientes de Correlación (r)							
	pH	C.E.	HCO_3^-	CO_3^{2-}	Cl	Ca^{2+}	Clorofila <i>a</i>	A_{750}
pH	1	0.82**	-0.37	0.80**	0.63	-0.65	0.75	0.76
C.E.	0.82**	1	0.04	0.93**	0.86**	-0.75*	0.91**	0.92**
HCO_3^-	-0.37	0.04	1	0.01	0.35	-0.05	0.28	0.23
CO_3^{2-}	0.80**	0.93**	0.01	1	0.86**	-0.78*	0.95**	0.98**
Cl	0.63	0.86**	0.35	0.86**	1	-0.86**	0.91**	0.97**
Ca^{2+}	-0.65	-0.75*	-0.05	-0.78*	-0.86**	1	-0.73	-0.86*
Clorofila <i>a</i>	0.75	0.91**	0.28	0.95**	0.91**	-0.73	1	0.96**
A_{750}	0.76	0.92**	0.23	0.98**	0.97**	-0.86*	0.96**	1

Leyenda: Aparecen en **negritas** aquellos coeficientes significativos al 95% de confianza ($p < 0,05$), con un asterisco (*) los significativos para el 99 % de confianza ($p < 0,01$) y con 2 asteriscos (**) los significativos para el 99,9% de confianza ($p < 0,001$).

Como se observa del histograma de frecuencias de las mediciones de CE, éstas se ajustan a una población normal, lo cual se confirmó al aplicar los test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks, comprobándose que efectivamente, se ajustaban a la normalidad. Ambos estadígrafos resultaron estadísticamente no significativos (en el primer caso $D=0.08509$; $p > 0.20$ y, en el segundo caso $W=0.96960$, $p < 0.5998$)

Los valores de fuerza iónica (μ) oscilaron entre 0,2 y 0,3 por lo que para el cálculo de los coeficientes de actividad (γ) de los iones, fue necesario aplicar la ecuación de Davis, la cual se recomienda cuando μ es mayor de 0,1 y menor de 0,5. Esta ecuación viene expresada por:

$$\log \gamma = -A Z_i^2 \left(\frac{\sqrt{\mu}}{1 + \mu} - 0.3 \right)$$

Donde: A = Factor dependiente de la T y Z= Carga del ion.

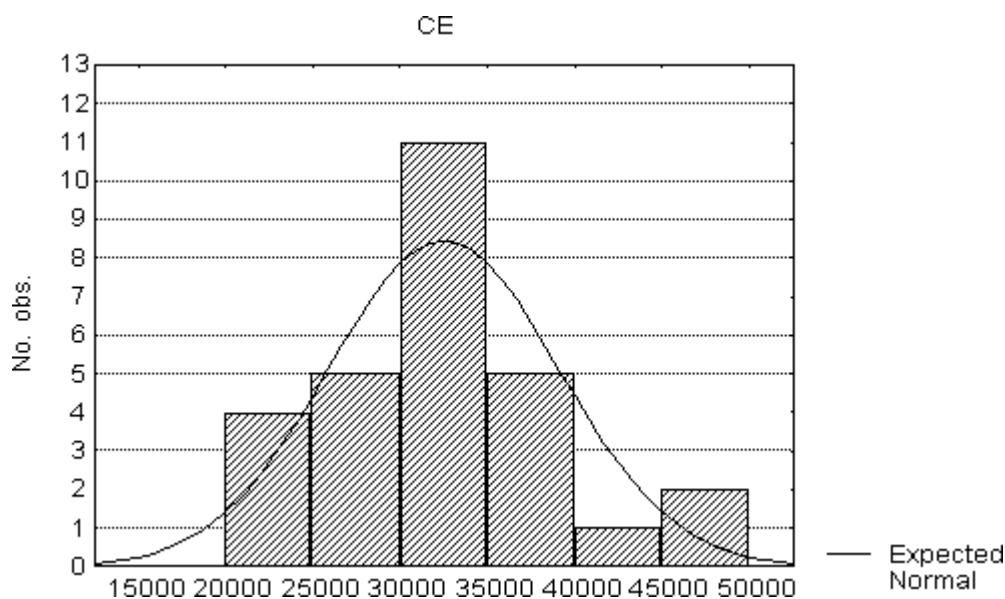


Figura 1. Histograma de frecuencias de las mediciones de CE

Una vez realizadas estas consideraciones, se procedió a aplicar el modelo de Miller, obteniéndose el factor exponencial f , de acuerdo con los rangos de CE, (Tabla 3), comprobándose que aún a estos valores de CE (altas salinidades), se cumple lo expuesto por Miller⁸, que los valores de este factor de corrección se encuentran en un rango estrecho, con una desviación estándar pequeña.

Tabla 3. Factor exponencial f calculado.

CE(μ S/cm)	Rango f		Media	D.S.
	Min	Max		
20000 - 25000	0.9812	1.0147	0.9973	0.0182
25000 - 29000	1.0089	1.0390	1.0196	0.0125
29000 - 35000	1.0129	1.0266	1.0193	0.0046
35000 - 39000	1.0004	1.0273	1.0169	0.0089
39000 - 45000	1.0167	1.0673	1.0364	0.0271

A continuación se determinó la CE teórica, comparándose con la CE experimental, como forma de realizar un control de calidad analítico, tal y como se recomienda en la literatura^{8, 10, 18}, para el caso de las aguas naturales. En primer lugar, se pudo observar, que en este caso, el modelo de Miller predice la CE con una aproximación de 19%, a diferencia de un 8% en aguas naturales (0-600 μ S/cm). Por otra parte, el valor promedio de la relación entre CE teórica y CE real (medida) fue de 0,84, diferente a lo recomendado en la literatura para aguas naturales (0,9-1,1), pero bastante cercano al límite inferior de este rango, y que pudiera ser un valor adecuado para casos como el de este trabajo.

Al calcular las concentraciones de los iones libres, se pudo observar que la relación de las concentraciones de iones libres de los iones HCO_3^- y CO_3^{2-} con respecto a la de los iones totales, resultaron las menores de los analizados (como promedio 15 y 21%, respectivamente) si se comparan, por ejemplo, con las de los iones cloruro y sodio (100 y 93%, respectivamente).

Resalta, además, la gran variabilidad de dichas concentraciones, encontrándose que en el caso del ion HCO_3^- el coeficiente de variabilidad fue de 79% y 116% para el ion CO_3^{2-} , mientras que fue de 3 y 0%, en el caso de los iones Na^+ y Cl^- , respectivamente.

Todo este análisis demuestra que son aquellos iones cuya concentración guarda una estrecha relación con el pH del medio de cultivo, es decir, los iones HCO_3^- y CO_3^{2-} , (cuyas concentraciones, además, van a estar interrelacionadas a través del equilibrio de los carbonatos) los que precisamente presentan mayor variabilidad en las concentraciones de iones libres. O sea, que hay que tener en cuenta, no sólo la CE, sino también el pH y la temperatura (T) (por su influencia, además, en las constantes de equilibrio correspondientes).

Por otra parte, el cálculo de la CE teórica permitió conocer cuáles de los iones presentes eran los que más contribuían a la CE, pudiendo determinarse que el ion HCO_3^- aporta un 3% de la CE como promedio, el ion Ca^{2+} 0,1 % solamente, mientras que el ion Na^+ contribuye en un 58% a la CE. Esto hace evidente que es imprescindible la determinación de este último ion, con métodos precisos y confiables.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, se desarrolló un modelo matemático para el caso específico de la estimación del ion HCO_3^- . Este modelo involucra los valores de pH, CE, T (determinados instrumentalmente) y los valores de concentración del ion CO_3^{2-} , estimado, a su vez, a través de su ecuación de correlación con la CE, según se muestra a continuación:

$$[\text{HCO}_3^-] = [\text{CO}_3^{2-}] * 10^{\frac{\text{pK}_1 - \text{pH} - \frac{\alpha}{[\text{CE}]^n}}{n}}$$

Donde: a y n son factores empíricos cuyos valores se hallan, mediante sucesivas iteraciones, a partir de los datos experimentales.

En la tabla 4 se encuentran resumidos los resultados de la aplicación del test de Student a los datos de las experiencias de laboratorio y piloto, en la que se denota que, no se encontró diferencia significativa entre los valores de concentración del ion hidrógeno carbonato ofrecidos por el modelo y los hallados analíticamente, demostrándose la factibilidad de la aplicación de este modelo para la estimación de las concentraciones de HCO_3^- , en cultivos de *Arthrospira* sp a partir de las mediciones de pH, CE y temperatura

Tabla 4. Resultados del test de Student del ajuste del modelo.

DATOS	n	X mod	s mod	X anal	s anal	t crít.	t tabla.	p
Laboratorio	14	136	21	134	9	0,364	2,160	0,3608

Leyenda: test de 1 cola, $\alpha = 0,05$

De esta forma, se puede implantar un sistema de monitoreo de los principales parámetros de control de los cultivos de *Arthrospira* sp, mediante mediciones de pH, CE y temperatura (usando equipos comúnmente asequibles, sin el uso de sensores costosos), una vez estudiadas las regularidades de los diferentes parámetros, sus interrelaciones y el modo en que influyen sobre los parámetros que se medirán en el sistema implementado.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten recomendar la aplicación de las mediciones de CE, pH y temperatura como los indicadores fundamentales para la implementación de un sistema automatizado de monitoreo y control de cultivos de microalgas como *Arthrospira* sp, usando equipos comúnmente asequibles, sin el uso de sensores costosos, pero teniendo en cuenta la alta mineralización del medio de cultivo correspondiente.

BIBLIOGRAFIA

1. Richmond A. Mass Culture of Cyanobacteria. In Photosynthetic Prokaryotes. Edited by Nicholas H. Mann and Noel G. Carr. Plenum Press, New York, 181-210, 1992
2. Rodríguez Lope, A. Continuous biomass production of *Spirulina platensis* in a laboratory air-lift photobioreactor. Internal Report. King's College. Univ. of London. Division of Life Sciences, 1997.
3. Ben-Amotz A. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. *J. of Applied Phycology*, 7, 65-68, 1995.
4. Hilaly A., Karim M. and Guyre D. Optimization of an Industrial Microalgae Fermentation. *Biotech. and Bioeng.*, 43, 314-320, 1994.
5. Kullick T. and Schuger K. Application of enzyme-field effect transistor sensor arrays as detectors in a flow-injection analysis system for simultaneous monitoring of medium components. 2. Monitoring of cultivation. *Anal. Chim. Acta*, 300 (1-3), 25, 1994.
6. Christensen L. et al. Semi-on-line analysis for fast and precise monitoring of bioreaction processes. *Biotech. and Bioeng.*, 52, 237-247, 1996.
7. Espinosa M. Monitoreo y control automatizado del cultivo de *Arthrospira* sp. Tesis de Maestría. La Habana, 1996.
8. Miller, R., Bradford, W. y Peters, N. Specific Conductance: Theoretical considerations and application to analytical quality control. U.S. Geological Survey Water-supply Paper, 231, 1980.
9. Borowitzka M.A. Appendix: Algal growth media and sources of algal cultures. In: *Microalgal Biotechnology*. Eds. M.A. Borowitzka and L. Borowitzka. Cambridge University Press, 456-464, 1988.
10. -APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17th. Ed., USA. 1989.
11. Santillán C., Soriano P., Luna J., Craules M. y Sandoval E. Manual de Control para el cultivo industrial de *Spirulina*. Sosa Texcoco, S.A., Dpto. de Algas y Proteínas. México, 1980.
12. Microsoft Corporation. Microsoft EXCEL. release 5.0a. USA., 1993.
13. StatSoft, Inc., CSS. Complete Statistical System with data base management and graphics (release 3.0A) USA, 1990.
14. Hydrowin Version 3.0. Lukas Calmbach. Institut de Mineralogie. Laussane. Francia.
15. Appelo, C.A.J. and Postma, D.,. *Geochemistry, groundwater and pollution*, Balkema, Rotterdam, 1993.
16. Parkhurst, D.L., Thorstenson, D.C. and Plummer, L.N., PHREEQE-a computer program for geochemical calculations. *US Geol. Surv. Water Resour. Inv.* 80-96.1980.
17. Glasstone S. *Tratado de Química Física*. Editorial Aguilar. Madrid, 796,1968.
18. Fagundo, J., Valdés, R. y Rodríguez, J. *Hidroquímica del Karst*. Ediciones Osuna. España, 82, 1996.