

Desarrollo y aplicación de un modelo matemático en la evaluación de cultivos de *Arthrospira maxima*

María del Carmen Espinosa Lloréns, Juan Reynerio Fagundo Castillo, Griselda Benítez Pacheco y Rogelio Mayarí Navarro.

Dpto. de Estudios sobre Contaminación Ambiental, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 5 de abril de 1999. Aceptado: 19 de enero del 2000.

Palabras clave: microalgas, *Arthrospira maxima*, evaluación, control, modelo matemático.
Key words: microalgae, *Arthrospira maxima*, monitoring, control, mathematical model.

RESUMEN. Los cultivos de microalgas tienen que evaluarse para obtener la máxima productividad y para asegurar constantemente su eficiencia y buen estado, por lo que resulta muy importante obtener información detallada que facilite una evaluación certera y rápida del estado fisiológico del cultivo. Debido a estas razones, en la biotecnología de las microalgas se han desarrollado numerosos trabajos, en los últimos años, con el fin de lograr la evaluación y el control automatizados de los cultivos. En el presente trabajo se desarrolló un modelo matemático para estimar la concentración de los iones hidrógenocarbonato en cultivos de *Arthrospira maxima* a partir de las mediciones de parámetros instrumentales [pH, temperatura y conductividad eléctrica (CE)], así como de la concentración de los iones carbonato obtenida, a su vez, a partir de su correlación con la CE. Este modelo no aparece reportado en la literatura. Se hace un análisis de la influencia de los errores en la medición sobre la respuesta del modelo. Los resultados demostraron la factibilidad de su aplicación, lo cual resulta una gran ventaja, debido a la facilidad de la medición instrumental de estos parámetros, la rapidez de obtención de los resultados y la disminución de los errores experimentales. Estos resultados permiten sentar las bases para el establecimiento de un método de evaluación automatizado para el control de estos cultivos con equipos normalmente asequibles, sin necesidad de utilizar sensores costosos. Este método pudiera ser aplicado en otros cultivos de microalgas similares, por ejemplo *Spirulina*, luego de establecer las correlaciones específicas correspondientes, de acuerdo con el medio de cultivo empleado.

ABSTRACT. Microalgae cultures must be continuously monitored to obtain the maximum productivity and to constantly assure their efficiency and conditions, being very important to obtain detailed information for a quick evaluation of the physiological state of the culture. Due to these reasons, in the last years, as in other fields, microalgal biotechnology researchers have developed different works with the aim of achieving an automated monitoring and control method for the cultures. In this work, a mathematical model to estimate the concentrations of HCO_3^- in *Arthrospira maxima* cultures, in function of the pH, temperature and electrical conductivity (EC) measurements was developed. This model has not been previously reported. A detailed analysis on the influence of the experimental errors over the model response was made. The results demonstrated the possibility of applying this model, which is advantageous, because instrumental methods are easier, faster and more accurate. The results could serve as a basis for an automated monitoring method to control *Arthrospira maxima* cultures using equipment commonly available, without the use of expensive sensors. This method of control could be used in other similar microalgae cultures, for example *Spirulina*, after determining the corresponding specific correlations for the particular culture medium.

INTRODUCCION

La tecnología de medición y control se vuelve cada día un factor más crucial en el desarrollo exitoso de un proceso biotecnológico moderno, debiendo tenerse en cuenta la economía del proceso y el comportamiento fisiológico específico del organismo o célula que se cultivará.¹ La tendencia actual se dirige a lograr una evaluación continua, con sensores en línea (mediante el empleo de computadoras) de todas las variables del bioproceso, para tener una visión de su dinámica en toda su complejidad y de las interrelaciones entre el sistema biológico y su ambiente químico y físico.

El análisis convencional, en el laboratorio, no puede cumplir con estos objetivos, ya que los resultados se obtienen luego de cierto retraso. Además, cuando se necesita evaluar numerosas variables, en los cortos intervalos de tiempo necesarios para un análisis exacto del bioproceso, los costos y el trabajo se incrementan.²

Los cultivos realizados en sistemas cerrados tales como los biorreactores, presentan condiciones más propicias para lograr la automatización de la evaluación y el control. Se conocen diferentes referencias al respecto, relacionadas con el cultivo de células,^{1,3} fermentaciones,^{4,5} cultivos de microalgas⁶ y otros.⁷

Hoy día, dentro del desarrollo de la biotecnología de las microalgas, existe una tendencia creciente a lograr la evaluación y el control automatizado de los cultivos, ya que para utilizar favorablemente las propie-

dades de estos microorganismos se requiere un control adecuado y confiable de las principales variables del proceso para obtener una biomasa con las características deseadas.⁸

Diferentes laboratorios y grupos de investigación realizan trabajos encaminados a lograr el control automatizado de los cultivos de microalgas como *Spirulina*,⁹ *Dunaliella*¹⁰ y otras,¹¹ lo que permite describir el estado del bioproceso, en detalle, en cualquier etapa de su desarrollo, y realizar un registro más exacto del proceso, facilitando su modelación, optimización y control.

En algunos casos en la automatización de estos procesos, se utilizan sensores muy especializados y costosos como los que se aplican en sistemas de inyección a flujo que aprovechan el efecto de campos enzimáticos, para la evaluación simultánea de componentes del medio de cultivo.¹² Sin embargo, también se conoce el empleo de sensores físico-químicos tradicionales, para la medición y el control del ambiente físico-químico que prevalece en el medio, como la acidez (pH), el oxígeno disuelto (pO₂), el dióxido de carbono disuelto (pCO₂), el potencial redox¹ y en este mismo sentido, el empleo de la medición de la conductividad eléctrica (CE) como indicador en la evaluación de las principales variables de control de cultivos de la microalga *Arthrospira*, lo que permitiría utilizar una celda de conductividad apropiada como sensor.¹³ Sin embargo, a diferencia de las otras variables del proceso, no es posible la estimación de la concentración de iones hidrógenocarbonato (fuente de carbono, en el medio de cultivo de esta microalga) a través de su correlación con la CE, por lo que resultaría conveniente establecer la forma de introducir esta importante variable dentro de la evaluación y el control automatizado de los cultivos de *Arthrospira*.

En el presente trabajo se presenta el desarrollo y aplicación de un modelo matemático, que involucra las mediciones de CE, pH y temperatura, para la estimación de la concentración de iones hidrógenocarbonato en cultivos de *Arthrospira maxima* a escala de laboratorio y de planta piloto. Además, se realiza un análisis de la influencia de los errores de la medición en la respuesta del modelo. Los resultados pudieran servir como base para la aplicación de un método de evaluación y control automatizado de estos cultivos, mediante equipos comúnmente asequibles,

obviando el empleo de sensores costosos.

MATERIALES Y METODOS

La microalga utilizada fue la cianobacteria *Arthrospira maxima* (Colección de Microalgas del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana).

Experiencias de laboratorio

Los cultivos se realizaron en cubetas plásticas de 40 L y 15 cm de profundidad. La agitación se realizó mediante paletas acopladas a un motor, a 15 r/min. La iluminación se llevó a cabo con cuatro lámparas de neón de 40 W cada una que fueron situadas a 40 cm por encima de la superficie del líquido. La temperatura de los cultivos se equilibró con la ambiente, la cual fue de 35 a 37 °C.

Se utilizó el medio de cultivo Zarrouk,¹⁴ el cual fue inoculado con 250 mL de una suspensión concentrada de la microalga, con un contenido de clorofila *a* de 13,77 mg/L.

Evaluación de los cultivos de laboratorio

Diariamente se registraron la CE (equipo ECCA-2, Centro Nacional de Investigaciones Científicas), el pH (potenciómetro MPH-4B Centro Nacional de Investigaciones Científicas) y temperatura. La determinación de la concentración de los iones hidrógenocarbonato (HCO₃⁻), carbonato (CO₃²⁻), cloruro (Cl⁻), calcio (Ca²⁺) y magnesio (Mg²⁺) (empleando métodos volumétricos), así como los de clorofila *a* y absorbancia a 750 nm (fotocolorímetro digital Spekol modelo 210), se realizaron por duplicado, según los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales.¹⁵

A partir del sexto día, se mantuvo el pH en un intervalo adecuado (9,3 a 9,7),¹⁶ con el suministro conveniente de CO₂.

Características del cultivador a escala de planta piloto

Para llevar a cabo el cultivo intensivo de esta especie, se diseñó un cultivador que presenta la forma de carrousel, con una vista superior de forma oval, un área de 16,3 m² y un volumen efectivo de 7 m³ de cultivo, aunque en este estudio se emplearon solamente 2 m³. Presentó además, dos paletas hechas de acero níquel con un sistema que permitía que el cultivo en cuestión fuera mezclado con una velocidad de 80 r/min. El inóculo tenía una concentración de clorofila *a* de 5,409 mg/L. El me-

dio utilizado fue adicionado mensualmente al sistema durante el transcurso del experimento.

Evaluación del cultivo a escala de planta piloto

La evaluación del cultivo a escala de planta piloto fue realizado en dos cultivos diferentes durante un total de 145 d. Se tomaron muestras dos veces por semana para evaluar los diferentes parámetros de control del cultivo a nivel piloto. Los análisis se realizaron de la misma forma que para los cultivos de laboratorio.

Procesamiento matemático

Los datos experimentales fueron procesados mediante el programa EXCEL¹⁷ y el paquete de programas de procesamiento estadístico Statistica.¹⁸

RESULTADOS Y DISCUSION

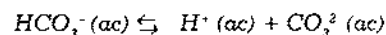
Desarrollo de un modelo matemático para el cálculo de la concentración de los iones hidrógenocarbonato a partir de las mediciones de CE, pH y temperatura

Como se estableció anteriormente,¹³ es posible estimar los principales indicadores de los elementos nutritivos necesarios para el control del cultivo de *Arthrospira maxima* mediante su correlación con la CE. Sin embargo, no ocurre así con la concentración de los iones hidrógenocarbonato, probablemente uno de los más importantes, al constituir la fuente de carbono para esta microalga.

Por ello, resultaba una necesidad contar con un método que permitiera estimar las concentraciones de hidrógenocarbonato, a partir de la medición de la CE, el pH y la temperatura, de modo que posibilitara incluir este importante parámetro, dentro de un posible control automatizado a partir de las mediciones instrumentales ya señaladas.

Debido a esto, se desarrolló un modelo empírico para hallar las concentraciones de los iones hidrógenocarbonato a partir de las mediciones de pH, temperatura y CE, así como de las concentraciones de los iones carbonato obtenidas, a su vez, a partir de su correlación con la CE. A continuación, se expone la deducción de dicho modelo.

Considerando que la *Arthrospira maxima* es una cianobacteria o alga verde-azul, autótrofa, es decir, que utiliza como fuente de carbono CO₂ o NaHCO₃, se debe tener en cuenta el equilibrio siguiente:



cuya constante de equilibrio está dada por:

$$K_2 = \frac{(H^+)(CO_3^{2-})}{(HCO_3^-)} \quad (1)$$

donde los paréntesis representan las actividades, que se relacionan con las concentraciones mediante los coeficientes de actividad (ν).

Por otra parte, si se considera, por definición, que:

$$(H^+) = 10^{-pH} \quad (2)$$

En forma similar;

$$K_2 = 10^{-pK_2} \quad (3)$$

En el caso que se ocupa este trabajo, es decir, el control de los principales parámetros en el cultivo de *Arthrospira maxima*, ya que las concentraciones de CO_3^{2-} se pueden calcular a partir de las mediciones de CE (por la fuerte correlación que existe entre ambos parámetros), es necesario, entonces, deducir una ecuación que permita el cálculo de la concentración de HCO_3^- , teniendo en cuenta la concentración de CO_3^{2-} estimada según se explicó anteriormente y el pH, la CE y la temperatura medidos experimentalmente.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, de la ecuación (1) se tiene:

$$(HCO_3^-) = \frac{(H^+)(CO_3^{2-})}{K_2} \quad (4)$$

y poniendo esta expresión en función de las concentraciones, el pH y el pK_2 , se tiene:

$$\begin{aligned} \nu_{HCO_3^-} [HCO_3^-] &= \\ &= \frac{10^{-pH} \nu_{CO_3^{2-}} [CO_3^{2-}]}{10^{-pK_2}} \quad (5) \end{aligned}$$

Por lo que la expresión para el cálculo de la concentración de HCO_3^- será:

$$[HCO_3^-] = \frac{\nu_{CO_3^{2-}}}{\nu_{HCO_3^-}} [CO_3^{2-}] 10^{pK_2 - pH} \quad (6)$$

Se debe tener en cuenta que los coeficientes de actividad dependen de la carga del ión (Z), el diámetro medio de éste (o diámetro eficaz) y de la fuerza iónica (μ), según la Ley de Debye-Hückel.¹⁹

Además, la fuerza iónica dependerá de la mineralización del medio, ya que, por definición, va a estar en función de las cargas y las concentraciones molales de los iones presentes.

Sin embargo, es necesario señalar que la Ley de Debye-Hückel es aplicable a disoluciones diluidas, ya

que se hace la aproximación de suponer que el ión es una carga puntual. Esto no causa un error considerable en disoluciones diluidas, pero a concentraciones del orden 0,01 mol/L el efecto ya es apreciable. (Se debe tener en cuenta que, en el caso específico de este trabajo, la concentración de $NaHCO_3$ y, a su vez, del HCO_3^- es, aproximadamente, 0,2 mol/L).

Por otra parte, si se considera por definición que:

$$p \nu_i = -\log \nu_i \quad (7)$$

entonces

$$\nu_i = 10^{-p \nu_i} \quad (8)$$

De acuerdo con esto, en lugar de la expresión (6), se puede escribir:

$$[HCO_3^-] = [CO_3^{2-}] \cdot 10^{pK_2 - pH - a} \quad (9)$$

donde a dependerá de la concentración de HCO_3^- y CO_3^{2-} , y por ende, de la CE, pudiendo expresarse como:

$$a = \frac{\alpha}{(CE)^n} \quad (10)$$

Por lo que la expresión para el cálculo de la concentración del HCO_3^- quedará como sigue:

$$[HCO_3^-] = [CO_3^{2-}] \cdot 10^{pK_2 - pH - \frac{\alpha}{(CE)^n}} \quad (11)$$

Aplicando logaritmo en la expresión (10), se tiene:

$$\log a = \log \alpha - n(CE) \quad (12)$$

que resulta una expresión similar a la ecuación de una línea recta ($y = a + bx$), por lo que utilizando regresión lineal se obtendrán los valores de a y n , a partir del intercepto y la pendiente, respectivamente.

De esta forma, experimentalmente, se tienen los parámetros necesarios para calcular $[HCO_3^-]$ a partir del modelo propuesto, expresado en la ecuación (11). La figura 1 muestra un ejemplo concreto de esto anterior.

Aplicación del modelo para el cálculo de las concentraciones de HCO_3^- , a partir de los datos experimentales

Aplicando el modelo desarrollado se calcularon las concentraciones de HCO_3^- , las cuales fueron comparadas con aquellos resultados obtenidos analíticamente mediante la prueba de Chi cuadrado ($\alpha = 0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre ambos ($\chi^2: 12,28, p < 0,424$).

Se comprobó la similitud existente entre los datos experimentales y los obtenidos mediante el modelo, en las experiencias de laboratorio (Fig. 2).

Los resultados demostraron la factibilidad de la aplicación de este

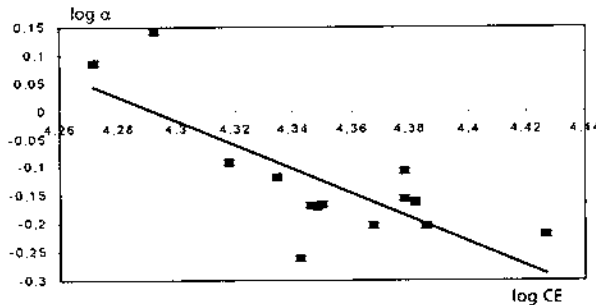


Fig. 1. Correlación del log CE y log α al aplicar el modelo desarrollado, a los datos de laboratorio correspondientes a cultivos de *Arthrospira maxima*.

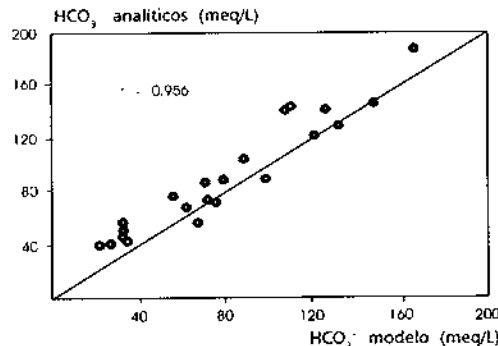


Fig. 2. Comparación de las concentraciones de los iones hidrógenocarbonato determinadas analíticamente y las estimadas mediante el modelo desarrollado.

modelo para el cálculo de las concentraciones de HCO_3^- , en cultivos de *Arthrospira maxima* a partir de las mediciones de pH, CE y temperatura, lo cual resulta una gran ventaja, debido a la facilidad de la medición instrumental de estos parámetros y la rapidez de obtención de los resultados, así como la disminución de los errores por utilización de las mediciones volumétricas que, en líneas generales, pueden alcanzar porcentajes de error mayores que las instrumentales.

Influencia de los errores de las mediciones en la respuesta del modelo

Las figuras 3, 4 y 5 muestran el efecto de las variaciones de los diferentes parámetros (pH, CE y concentración de iones carbonato) involucrados en el modelo, sobre su respuesta, es decir, sobre las concentraciones de HCO_3^- resultantes.

La expresión de estos gráficos está dada por el papel que representa cada uno de esos parámetros en el modelo. Es decir, que en este se observa un comportamiento exponencial para el pH y la CE (aunque en este caso algo diferente del pH, ya que la CE se encuentra en el denominador del exponente) y un comportamiento lineal para la concentración de CO_3^{2-} , de acuerdo con la ecuación (11).

Por otra parte, al considerar la influencia del error en las mediciones sobre la respuesta del modelo, se deben tener en cuenta los errores experimentales inherentes a los equipos utilizados (Tabla 1).

Al analizar los valores que se presentan en la segunda columna de la tabla anterior, hay que tener en cuenta la precisión que se reporta por los fabricantes²¹ para los equipos existentes en el mercado. Por ejemplo, en un medidor de pH (digital, de laboratorio) la precisión está entre 0,02 y 0,01 unidades; pudiendo estar alrededor de 0,05 en equipos digitales, pero de menor precisión. Además, en equipos analógicos la precisión es mucho menor, ya que la apreciación es de sólo 0,1 unidades. De este análisis se deduce que sería recomendable utilizar equipos con un error de 0,05 unidades de pH o menor, para que el error relativo de la concentración de HCO_3^- estimada por el modelo no sobrepase el 11 %.

De la misma forma, se estimó la influencia de los errores en las mediciones de CE y de la concentración de CO_3^{2-} sobre la respuesta del modelo.

Para las mediciones de CE, los equipos existentes en el mercado

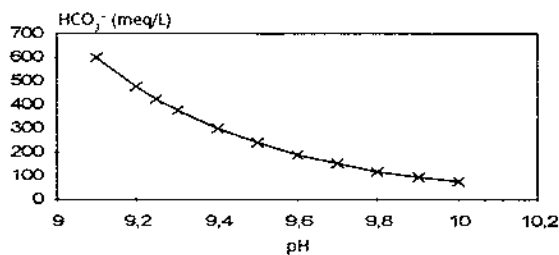


Fig. 3. Efecto de la variación del pH en la respuesta del modelo propuesto. (CE: 23 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$; CO_3^{2-} : 125 meq/L).

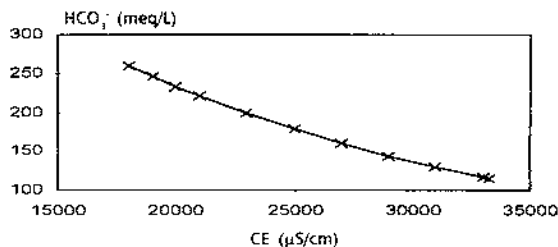


Fig. 4. Efecto de la variación de la CE en la respuesta del modelo propuesto. (pH: 9,58; CO_3^{2-} : 125 meq/L).

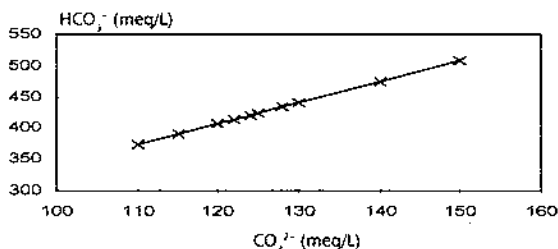


Fig. 5. Efecto de la variación de la concentración de CO_3^{2-} en la respuesta del modelo (pH: 9,25; CE: 23 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Tabla 1. Efecto de los errores de las mediciones del pH, la CE y la concentración de los iones carbonato sobre la respuesta del modelo.

Parámetro	Error en la medición	Error relativo en la respuesta del modelo (%)	
		Error relativo de la medición	Error relativo en la respuesta del modelo
pH	0,05	0,5	11
	0,1	1,0	21
CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	500	2,2	2,6
	1 000	5,0	5,9
Iones carbonato (meq/L)	2	2,4	1,7
	5	4,0	4,0

pueden tener una precisión desde $\pm 2\%$ (portátiles, de bolsillo), hasta $\pm (1,0$ a $0,5)\%$ (de laboratorio).²¹ En cuanto a las mediciones de la concentración de CO_3^{2-} por métodos volumétricos, se ha determinado que la adición de una gota del reactivo utilizado en la valoración causa un error en la medición de 2,5 meq $\text{CO}_3^{2-}/\text{L}$, teniendo en cuenta la concentración de este reactivo en el medio de cultivo.

Se pudo observar que los errores provocados en la respuesta del modelo están en el mismo orden que los errores en las mediciones experimentales de CE y de la concentración de CO_3^{2-} (Tabla 2), mientras que no ocurre igual con el pH, ya que los errores que se producen en el modelo en ese caso, son aproximadamente, 20 veces mayores que los errores experimentales que los producen.

Es decir, que de los tres parámetros involucrados en el modelo (no se tiene en cuenta la temperatura, cuya influencia en él es a través del pK_a , y el valor de éste se puede considerar constante en el intervalo de trabajo) es, evidentemente, el pH el de mayor influencia en los errores de la respuesta del modelo. Este hecho resalta la importancia de la precisión en su medición, para el empleo de dicho modelo en el control del cultivo de *Arthrospira maxima*, siendo recomendable utilizar equipos con una precisión adecuada para lograr resultados confiables.

Este método de control puede ser utilizado en los cultivos de especies de microalgas similares del género *Spirulina*, previa determinación de las correlaciones específicas correspondientes al medio de cultivo.

Los fundamentos de este método sirven de base para la aplicación de sistemas de control automatizado en el cultivo de otros tipos de microalgas, lo cual pudiera ser objeto de otros estudios futuros.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un modelo matemático para estimar las concentraciones de iones hidrógenocarbonato a partir de las mediciones de pH, temperatura y CE, así como de las concentraciones de iones carbonato obtenidas, a su vez, a partir de su correlación con la CE. No se conocen reportes acerca de un modelo similar al descrito.

De los tres parámetros involucrados en el modelo, el pH es el de mayor influencia en los errores de la respuesta de éste. Este hecho resalta la importancia de la precisión en la medición de este parámetro, para el empleo de dicho modelo en el control del cultivo de *Arthrospira maxima*, siendo recomendable utilizar equipos con una precisión adecuada para lograr resultados confiables.

Se demostró la factibilidad de la aplicación del modelo desarrollado para la estimación de las concentra-

ciones de HCO_3^- , en cultivos de *Arthrospira maxima* a partir de las mediciones de pH, CE y temperatura, lo cual resulta una gran ventaja, debido a la facilidad de la medición instrumental de estos parámetros y a la rapidez de obtención de los resultados, así como a la disminución de los errores por utilización de la medición volumétrica que, en líneas generales, puede alcanzar porcentajes de error mayores que las mediciones instrumentales.

Este método de evaluación puede ser utilizado en los cultivos de otras especies de microalgas similares, por ejemplo *Spirulina*, previa determinación de las correlaciones específicas correspondientes al medio de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Gary, K., Meier, P and Ludwig, K. General aspects of use of sensors in biotechnology with special emphasis on cell cultivation. **Biotechnology Research and Applications**, 155, 1988.
2. Scheper T., Plotz F., Muller C. and Hitzmann B. Sensors as components of integrated analytical systems. **Trends in Biotech.**, 12, 42, 1994.
3. Singh V. On-line measurement of oxygen uptake in cell culture using the dynamic method. **Biotech. and Bioeng.**, 52, 443, 1996.
4. Christensen L. et al. Semi-on-line analysis for fast and precise monitoring of bioreaction processes. **Biotech. and Bioeng.**, 52, 237, 1996.
5. Ho K. y Zhou B. A powerful and flexible computer monitoring and control system for microbial fermentations. **Proceedings of Asia Pacific Society of Bioscientists**. PT3.7, 1996.
6. Guterma H., Ben-Yaakov S. and Vonshak A. Automatic on-line growth estimation method for outdoor algal biomass production. **Biotechnol. Bioengng**, 34, 143, 1989.
7. Vanrolleghem P., Kong Z., Rombouts G. and Verstraete W. An on-line respirographic biosensor for the characterization of load and toxicity of wastewaters. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, 59, 321, 1994.
8. 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.
9. 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.
10. Ben-Amotz A. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. **J. of Applied Phycology**, 7, 65, 1995.
11. Hilaly A., Karim M. and Guyre D. Optimization of an Industrial Microalgae Fermentation. **Biotech. and Bioeng.**, 43, 314, 1994.
12. 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 component.2. Monitoring of cultivation. **Anal. Chim. Acta**, 300, 25, 1994.
13. Espinosa M. Monitoreo y control automatizado del cultivo de *Arthrospira* sp. Tesis en opción al título de Maestra en Ciencias del Agua, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, 1996.
14. Borowitzka M.A. Appendix: Algal growth media and sources of algal cultures. In: **Micro-algal Biotechnology**. Ed. M.A. Borowitzka and L. Borowitzka. Cambridge University Press, 456-464, 1988.
15. APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17th Ed., USA. 1989.
16. 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.
17. Microsoft Corporation. Microsoft EXCEL. release 5.0a. USA., 1993.
18. StatSoft, Inc., CSS. Complete Statistical System with data base management and graphics (release 3.0A) USA, 1990.
19. Glasstone S. Tratado de Química Física. Editorial Aguilar, Madrid, 796, 1968.
20. DeFrancesco F. *Acqua. Appunti introduttivi alla scienza, alla tecnica, alla difesa delle acque naturali*. Ed. Temi, Rome, 187, 1988.
21. Bioblock Scientific. Catálogo. Francia, 306-950, 1995.