



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
**Grado en Química**

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

# **ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS MACRONUTRIENTES DE UN SISTEMA BIOLÓGICO CON APORTE DE CO<sub>2</sub>**

*Título en gallego: Estudo da evolución dos macronutrientes dun sistema biolóxico con aporte de CO<sub>2</sub>.*

*Título en inglés: Study of the evolution of macronutrients from a biological system with CO<sub>2</sub> contribution.*

**Nuria Bermúdez Hermida**

Septiembre, 2015





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

El trabajo titulado **ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE MACRONUTRIENTES EN UN SISTEMA BIOLÓGICO CON APORTE DE CO<sub>2</sub>** que constituye la Memoria del Trabajo de Fin de Grado de la alumna **NURIA BERMÚDEZ HERMIDA**, ha sido realizado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña, bajo la tutorización académica de los profesores Dr. Fernando Avecilla Porto y la Dra. Alatzne Carlosena Zubieta.

A Coruña, 10 de Septiembre de 2015

Dr. Fernando Avecilla Porto

Dra. Alatzne Carlosena Z.

*Título en gallego: Estudo da evolución dos macronutrientes dun sistema biolóxico con aporte de CO<sub>2</sub>.*

*Título en inglés: Study of the evolution of macronutrients from a biological system with CO<sub>2</sub> contribution.*



## *Agradecimientos*

A los profesores Alatzne Carlosena Zubieta y Fernando Avecilla Porto por su consejo, ayuda y dedicación a lo largo de este trabajo.

A Maribel por su ánimo y ayudar a la hora de orientarme en el laboratorio.

Finalmente a mi familia y a mis amigos por haberme apoyado siempre y no haber dudado de mí.



## Abreviaturas

Adenosín Disfosfato	ADP
Adenosín Trifosfato	ATP
Nicotinamina Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida)	NaDPH
Nicotinamina Adenina Dinucleótido Fosfato (forma oxidada)	NaDP
Fosfato inorgánico	P <sub>i</sub>





# Índice

1. RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
RESUMO.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. Ciclos biogeoquímicos de los macronutrientes.....	6
2.1.1. Incorporación de los nutrientes en los ecosistemas.....	7
2.1.2. Recirculación interna de los nutrientes en los ecosistemas.....	9
2.1.3. Salida de los nutrientes en los ecosistemas.....	11
2.2. Influencia de la luz y del fotoperiodo.....	12
2.3. Influencia del pH.....	15
3. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.....	18
3.1. Acuario de agua dulce.....	18
3.2. Acuario de agua salada.....	22
4. OBJETIVO.....	27
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	29
5.1. Equipos, material y reactivos.....	29
5.2. Estrategia de Análisis.....	30
5.3. Determinación de Iones Fosfato.....	33
5.4. Determinación de Iones Nitrato.....	38
5.5. Determinación de Iones Potasio.....	43
6. RESULTADOS.....	45
6.1. Adición de nutrientes.....	45
6.2. Adición de nutrientes y variación del fotoperiodo.....	47
6.3. Adición de nutrientes y variación del pH.....	48
6.4. Acuario de agua salada.....	50
7. CONCLUSIONES.....	51
CONCLUSIONS.....	52
CONCLUSIÓNS.....	53



## **1. RESUMEN**

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la evolución de los nutrientes de N, P y K de un sistema biológico modificando el fotoperiodo y el pH del medio. El sistema en estudio es un acuario plantado de agua dulce (80 L).

El trabajo experimental se centra en la realización de una serie de ensayos aportando al sistema una cantidad fija de un nutriente inorgánico ( $K_2HPO_4$ ) de acuerdo a una estrategia previamente establecida. En dichos ensayos se ha modificado el fotoperiodo y el pH del medio y realizado un seguimiento a corto plazo (24 horas) y un seguimiento a largo plazo (4 días). Posteriormente, se lleva a cabo la determinación del contenido de los nutrientes de interés en este estudio, siendo éstos fosfato, nitrato y potasio.

Al incrementar los contenidos iniciales de potasio y fosfato se observó una disminución de la concentración del otro nutriente, el nitrato. A medida que se consumen los nutrientes adicionados se comprobó, en la mayoría de los ensayos, un incremento final del contenido en nitrato. Esto muestra la interconexión de los ciclos biogeoquímicos.

Con una intensidad lumínica baja solo se observó consumo de fosfato (aproximadamente del 50%). Al incrementar la intensidad lumínica, se mantuvo el mismo consumo de fosfato y para el potasio se estimó en un 16%. Al disminuir el pH, aplicando una intensidad lumínica alta, se observó una notable disminución del consumo de fosfato (21%) mientras que el consumo de potasio no se vio alterado.

El menor consumo de fosfato al disminuir el pH del agua puede deberse a una menor actividad de la enzima rubisco, implicada en el ciclo de Calvin, actividad que disminuye al descender el pH. Esto provocaría una menor actividad fotosintética y un menor consumo de nutrientes.

Finalmente, se inició el estudio de un sistema de agua salada evaluando la viabilidad de la metodología empleada para el seguimiento del acuario de agua dulce. La complejidad de la matriz de agua salada requerirá futuros estudios para la optimización de los métodos analíticos de determinación de los nutrientes de interés.

## **SUMMARY**

The aim of the present study is to evaluate the N, P, K nutrients evolution of a biological system by varying the luminous intensity and the pH of the medium. The system is an Aquarium of fresh water (80 L) contains a suit of plants.

Experimental procedure focuses on conducting several trials where the system is fed with an amount of inorganic nutrient ( $K_2HPO_4$ ) in accordance with a previously established strategy. The luminous intensity and the pH of the medium were varied and the system was checked along the first 24 h and during 4 days. The analytical determination of the studied nutrients, namely phosphate, nitrate and potassium, was accomplished.

When the initial concentrations of potassium and phosphate increase a diminution of the nitrate content was observed. In most assays, as the added nutrients consumed, the final nitrate content increased. This shows the interconnection of biogeochemical cycles.

With a low luminous intensity, the system only consumed phosphate (aprox. 50%). When this intensity was increased, the phosphate consumption was constant and for the potassium was estimated on 16%. Applying a high luminous intensity and with a low pH value, the phosphate consumption decreased (to 21%) whereas for potassium no changes were registered.

The low phosphate consumption when the system presents a inferior pH can be due to the diminution of the rubisco enzyme activity (implied in the Calvin Cycle), this activity decreases when pH is less. This can cause a reduction of the photosynthetic activity as well as of the nutrients consumption.

Finally, it was initiated the study of a seawater system. The viability of the analytical methodology previously established for fresh water analysis was evaluated. The seawater matrix requires the optimization of the analytical methods to achieve a reliable determination of the nutrients.

## **RESUMO**

O presente estudo ten como obxecto avaliar a evolución dos nutrientes de N, P e K nun sistema biolóxico modificando o fotoperiodo e o pH do medio. O sistema en estudo é un acuario plantado de auga doce (80 L).

O traballo experimental céntrase na realización dunha serie de ensaios achegando ao sistema unha cantidade fixa dun nutriente inorgánico ( $K_2HPO_4$ ), dacordo a unha estratexia previamente establecida. En ditos ensaios modificouse o fotoperiodo e o pH do medio e realizouse un seguimento a corto prazo (24 horas) e outro a longo prazo (4 días). Posteriormente, lévase a cabo a determinación do contido dos nutrientes de interese neste estudo, sendo istos fosfato, nitrato e potasio.

Ao incrementar os contidos iniciais de potasio e fosfato observouse unha diminución da concentración doutro nutriente, o nitrato. A medida que se consumen os nutrientes adicionados comprobouse, na maioría dos ensaios, un incremento final do contido en nitrato. Isto amosa a interconexión dos ciclos bioxeoquímicos.

Cunha intensidade lumínica baixa observouse so consumo de fosfato (aproximadamente do 50%). Ao incrementar a intensidade lumínica, mantúvose o mesmo consumo de fosfato e para o potasio estimouse nun 16%. Ao diminuir o pH, aplicando unha intensidade lumínica alta, obtívose unha notable diminución do consumo de fosfato (21%) mentras que o consumo de potasio non se veu alterado.

O menor consumo de fosfato ao diminuir o pH da auga pode deberse a unha menor actividade do enzima rubisco, implicada no ciclo de Calvin, actividade que diminúe ao descender o pH. Isto provocaría unha menor actividade fotosintética e un menor consumo de nutrientes.

Finalmente, iniciouse o estudo dun sistema de auga salgada avaliando a viabilidade da metodoloxía empregada para o seguimento do acuario de auga doce. A complexidade da mostra de auga salgada require futuros estudos para a optimización dos métodos analíticos de determinación dos nutrientes de interese.



## 2. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos están constituidos por el mismo conjunto de elementos químicos, principalmente carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, azufre y fósforo y algunos metales<sup>1</sup>. Dichos organismos realizan procesos vitales, como el crecimiento y el desarrollo, para las que se lleva a cabo numerosas reacciones químicas catalizadas por enzimas y que en conjunto reciben el nombre de metabolismo. Para ello, es necesario la incorporación en el organismo de determinadas sustancias, denominadas nutrientes, para poder llevarse a cabo.

Los nutrientes pueden obtenerse de forma directa, o a través de derivados que una vez en el organismo se transforman para poder ser asimilados. La cantidad necesaria de cada nutriente y su modo de obtención varían en función del tipo de organismo (según las variedades de plantas, animales, bacterias, etc.).

En un acuario plantado de agua dulce las plantas, además de luz y CO<sub>2</sub>, necesitan el aporte de determinados nutrientes que en función de la cantidad necesaria y su importancia en el desarrollo vegetal se clasifican como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación de nutrientes para plantas acuáticas<sup>2</sup>.

Grupo	Elementos
Macronutrientes	N, P, K, Na, O, C, Ca y S
Micronutrientes u oligoelementos	Fe, Mn, Mo, Cu, Zn, V y Co

Los nutrientes deben ser suministrados en unas proporciones adecuadas y en su forma química más asequible para las especies vegetales, es decir, los más fáciles de extraer del entorno. Dicha asequibilidad está directamente relacionada con la capacidad de formar especies químicas solubles en agua a pH neutro.

<sup>1</sup> M<sup>a</sup>. Vallet, J. Faus, E. García-España y J. Moratal. *Introducción a la Química Bioinorgánica*. Ed. Síntesis, Madrid, **2003**.

<sup>2</sup> C. Orozco, A. Pérez, M.N. González, F. J. Rodríguez y J. M. Alfayate. *Contaminación ambiental, una visión desde la Química*, Ed. Paraninfo, Madrid, **2011**.

La mayoría de los elementos necesarios para el crecimiento de las plantas se encuentran en cantidades muy superiores a sus requisitos, pero algunos están en concentraciones muy próximas a la necesaria para el desarrollo vegetal y se denominan elementos limitantes. Según la ley del mínimo de Liebig<sup>3</sup>, la producción total de biomasa se verá limitada por dichos elementos, condicionando de esta forma el desarrollo de la comunidad biótica. Los elementos limitantes en la mayoría de los ecosistemas son por lo general el nitrógeno y el fósforo. Sin embargo, un aporte excesivo de fósforo o nitrógeno puede dar lugar a la eutrofización del medio acuático, ya que la proliferación desmesurada de microalgas provoca una disminución drástica del oxígeno disuelto, causando la muerte de los organismos del sistema. Según algunos estudios, el fósforo se considera el responsable principal de la eutrofización en aguas de lagos y embalses, siendo el nitrógeno el elemento limitante en aguas marinas<sup>4</sup>.

## **2.1. Ciclos biogeoquímicos de los macronutrientes**

Muchos nutrientes circulan a través de los distintos niveles tróficos y biotopos sufriendo transformaciones y reciclándose de forma continua a través del sistema. Dichos procesos constituyen lo que se denominan ciclos biogeoquímicos, los cuales permiten convertir sustancias no útiles para los seres vivos en otras que sí lo son (nutrientes) mediante una combinación de procesos biológicos, geológicos y químicos.

Existe una gran variedad de ciclos biogeoquímicos y que, debido a su naturaleza cíclica, promueven el equilibrio dinámico entre las diversas especies de los elementos químicos afectados. Sin embargo, hay que destacar que dichos ciclos están interrelacionados entre sí en mayor o menor medida. Además, según Vernadsky<sup>5</sup>, los ciclos biogeoquímicos también se ven influenciados por la materia viva ya sea de manera directa o por un entorno cuyas propiedades geoquímicas (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> etc.) son o han sido provocadas por la materia viva. Esto está relacionado con la ley de tolerancia de Shelford<sup>6</sup>, la cual establece que cada organismo presente en una

---

<sup>3</sup> R. M. Atlas y R. Bartha. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Ed. Adisson Wesley, Madrid, **2002**.

<sup>4</sup> S. E. Manaham. *Introducción a la química ambiental*. Ed. Reverté, Madrid, **2007**.

<sup>5</sup> W.M. Edmunds, A.A. Bogush, *Geochemistry of natural waters-The legacy of V.I. Vernadsky and his students*, Elsevier, **2012**, 27, 1871-1886.

<sup>6</sup> E. P. Odum y G. W. Barrett. *Fundamentos de Ecología*. 5ª Ed. Cengage Learning, México, **2006**.



comunidad biótica posee unos límites ambientales (temperatura, pH, etc.) fuera de los cuales no es posible su supervivencia.

En esta memoria el objetivo principal se centra en el estudio de los macronutrientes de fósforo, nitrógeno y potasio y la conexión que existe entre ellos y la actividad biológica del sistema a través de sus ciclos biogeoquímicos.

Dentro de los diversos ciclos biogeoquímicos cabe diferenciar dos tipos principales: los ciclos gaseosos (o atmosféricos) en los que las reservas principales de nutrientes son la atmósfera y los océanos, y los ciclos sedimentarios en los cuales el reservorio principal es la litosfera<sup>7</sup>. Según esta clasificación el ciclo del nitrógeno se correspondería a un ciclo gaseoso ya que su principal fuente es la atmósfera, en la que se encuentra en forma de N<sub>2</sub> mayoritariamente. Por otra banda el ciclo del fósforo y el del potasio son ciclos sedimentarios debido a que no poseen reservas gaseosas significativas, hallándose principalmente en los sedimentos de la superficie terrestre o en los fondos marinos.

Un aspecto común que poseen todos los ciclos biogeoquímicos es que desde el punto de vista de los ecosistemas todos ellos presentan una estructura similar que consta de entradas, una circulación interna y salidas, variando su mecanismo en función del tipo de ciclo.

### **2.1.1. Incorporación de los nutrientes en los ecosistemas**

Las entradas al ecosistema de los ciclos del fósforo y del potasio, al tratarse ciclos sedimentarios, se ven limitadas por la meteorización y erosión de los depósitos minerales de los compuestos químicos de dichos elementos ya que habitualmente son inaccesibles para los organismos vivos al encontrarse principalmente en los fondos marinos o en yacimientos subterráneos.

En los depósitos minerales el fósforo se encuentra formando numerosos tipos de fosfatos siendo el más abundante el fosfato cálcico, el cual no es asimilable por las plantas ni por numerosos microorganismos. Debido a esto, algunos microorganismos han desarrollado mecanismos para solubilizar los fosfatos, como las *Nitrosomas* y *Thiobacillus* que movilizan el P<sub>i</sub> mediante la producción de ácido nitroso y ácido

---

<sup>7</sup> T. M. Smith y R. L. Smith, *Ecología*. 6ª Ed. Pearson, Madrid, 2007.

sulfúrico, respectivamente<sup>8</sup>. Algunas plantas también llevan a cabo diversas estrategias para solventar la baja disponibilidad del fósforo, como liberar ácidos orgánicos y H<sup>+</sup> para solubilizar los fosfatos inorgánicos, exudar fosfatasa para liberar el fosfato orgánico unido al suelo etc. Los organismos vegetales absorben el fosfato a través de la raíz gracias a que en sus membranas celulares presentan un transportador de fosfato, el cual presenta una alta afinidad por el fosfato (K<sub>M</sub> de 1-5 μM), y que se encuentra regulado por la concentración intracelular de P<sub>i</sub>. Dicho transportador se basa en una proteína con seis dominios transmembranales en el extremo N-terminal y otros seis dominios en el extremo C-terminal unidos por una región hidrofílica en donde se localiza un centro de fosforilación regulado por la proteína C quinasa. Diversos microorganismos asimilan los fosfatos del medio mediante un sistema complejo, que se basa en el transporte de los fosfatos a través de un sistema simporte (a favor del gradiente de concentración) con H<sup>+</sup>.

El potasio se encuentra mayoritariamente en forma de compuestos no asimilables por los organismos vivos, entre los que predominan los feldspatos. Estos aluminosilicatos son sólidos estables, por lo que no se produce una alta liberación de potasio al medio. Sin embargo, dichos minerales pueden sufrir una degradación gradual debido a reacciones de hidrólisis, acidificación, disolución etc. que den lugar a la formación de compuestos de potasio asimilables<sup>9</sup>:



El K<sup>+</sup> liberado puede ser absorbido por las plantas a través de las raíces mediante dos posibles sistemas de transporte en función del potasio disponible en el medio. A bajas concentraciones de potasio (menos de 100 μM) el sistema de transporte se basa en un transporte activo de alta afinidad saturable ligado a la hidrólisis de ATP mediante una proteína de 79 kDa con doce dominios hidrofóbicos transmembrana. A altas concentraciones de potasio, la absorción se basa en un transporte pasivo simporte del catión a través de un canal iónico formado por cuatro cadenas peptídicas iguales que contienen seis dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana celular.

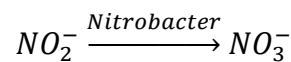
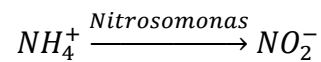
El ciclo del nitrógeno, a diferencia del caso del fósforo y del potasio, al tratarse de un ciclo gaseoso entra en el ecosistema directamente a través de la atmósfera. Sin

<sup>8</sup> F. Castillo, *Bioteología ambiental*. Ed. Tebar, **2005**.

<sup>9</sup> S. N. Blaya y G. N. García, *Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. Ed. Mundi-Prensa Libros, **2003**.

embargo, el nitrógeno a pesar de constituir casi un 80% de la atmósfera terrestre se encuentra en forma de  $N_2$ , la cual no puede ser absorbida por las plantas. La introducción del nitrógeno en los ecosistemas se lleva a cabo, principalmente, mediante la fijación biológica del  $N_2$  atmosférico. La fijación biológica la realizan las bacterias simbióticas a las plantas (principalmente *Rhizobium*), las bacterias aeróbicas libres (*Azotobacter* aeróbico y *Clostridium* anaeróbico) y las cianobacterias<sup>10</sup>. Éstas transforman el  $N_2$  en  $NH_3$  con consumo de ATP gracias al complejo enzimático nitrogenasa, constituido por la proteína Fe y la proteína Fe-Mo.

Debido a la presencia de  $H^+$  en el suelo el  $NH_3$  liberado se transforma rápidamente en  $NH_4^+$ . El amonio producido puede ser absorbido por las plantas o puede ser oxidado por acción de las bacterias del grupo *Nitrosomas* para dar  $NO_2^-$  o convertirlo en  $NO_3^-$  por acción de las bacterias *Nitrobacter*, proceso denominado nitrificación:



Las plantas también pueden absorber el nitrato pero en condiciones anaeróbicas compiten con las bacterias *Pseudomonas* que reducen el  $NO_3^-$  progresivamente a  $N_2O$  y finalmente  $N_2$  (gas que los organismos vegetales no pueden asimilar), proceso que se llama desnitrificación.

### **2.1.2. Recirculación interna de los nutrientes en los ecosistemas**

Una vez los nutrientes son asimilados por las plantas éstos pasan a formar parte de sus tejidos vivos, pudiendo sufrir determinadas transformaciones químicas en el proceso, dando lugar a la materia orgánica. Mediante la nutrición los nutrientes asimilados por los organismos vegetales y microorganismos autótrofos son absorbidos por los siguientes eslabones de la cadena trófica (consumidores) para así formar parte de sus tejidos, movilizándose de esta forma a lo largo de la cadena trófica.

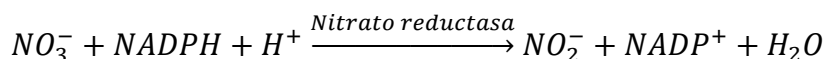
El fósforo, a pesar de poseer varios estados de oxidación, solamente se encuentra en forma de fosfato en los organismos vivos, pudiendo presentarse como fosfato libre y

<sup>10</sup> L. Taiz y E. Zeiger, *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume, Vol. I, 2006.

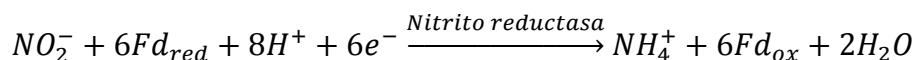
polifosfato (fosfato inorgánico) o asociado a materia orgánica mediante enlaces ésteres (fosfato orgánico). El fosfato inorgánico se encuentra formando una mezcla equimolar de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  que ejerce un efecto tampón en el medio celular que contribuye a mantener el pH neutro del citoplasma. También puede encontrarse asociado con iones calcio dando lugar a la hidroxiapatita, constituyente mineral del esqueleto de los vertebrados. El fosfato orgánico se forma mediante la reacción de condensación del ion fosfato con cualquier molécula biológica que contenga un grupo OH. Debido a esto, el fosfato se encuentra formando parte de numerosas biomoléculas como los fosfolípidos en las membranas celulares, los nucleótidos en el material genético, en algunas proteínas asociado a las cadenas laterales de residuos de aminoácido de serina, tirosina y treonina, etc. Además, en sus formas condensadas también se encuentra asociado con nucleótidos libres como la adenosina dando lugar a ATP y ADP, moléculas que actúan como moneda energética en el organismo, o también asociado a dinucleótidos como la adenina nicotinamida dando lugar a NADPH (reductor biológico universal).

En los seres vivos el potasio se encuentra mayoritariamente como  $\text{K}^+$ , salvo cuando forma parte de la estructura de los endo y exoesqueletos de algunos organismos, acumulándose en el interior de las células originando de esta forma un gradiente de concentración que se mantiene mediante la hidrólisis de ATP. Dicho gradiente, junto con el gradiente de concentración de los iones  $\text{Na}^+$  (el  $\text{Na}^+$  se acumula en el exterior celular), permite el transporte de biomoléculas grandes y con carga a través de la membrana celular mediante proteínas transmembrana, que en este caso reciben el nombre de bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  o  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPasa. De esta forma se lleva a cabo la activación y regulación de diferentes procesos biológicos como la generación y transmisión de señales. Además, el  $\text{K}^+$  junto con otros cationes como  $\text{Mg}^{2+}$  estabilizan las estructuras intracelulares de polímeros biológicos como ácidos nucleicos a través de la neutralización de las cargas eléctricas.

En los organismos vivos el nitrógeno biológico se encuentra como N (-III), asociado a una gran variedad de biomoléculas como los aminoácidos, los ácidos nucleicos, etc. Como se ha mencionado anteriormente, las plantas además de absorber amonio también son capaces de extraer del medio el nitrógeno en forma de nitrato, por lo que, para poder aprovechar el nitrato en la síntesis de biomoléculas, las plantas deben transformarlo en amonio. Para ello, los organismos vegetales disponen de una enzima que cataliza la reducción del nitrato a nitrito y que recibe el nombre de nitrato reductasa. La reacción que tiene lugar es la siguiente:



Sin embargo, el ion nitrito es muy reactivo y potencialmente tóxico. Las células vegetales transportan el nitrito generado en la reducción del nitrato a los cloroplastos en donde es reducido a amonio mediante la acción de la ferredoxina (dador de electrones) en una reacción catalizada por la nitrito reductasa:



Una vez convertido en amonio, las plantas pueden emplear el nitrógeno absorbido como nitrato en la biosíntesis de moléculas. Sin embargo, los organismos heterótrofos no son capaces de llevar a cabo esta transformación, por lo que deben obtener el nitrógeno a partir de los compuestos orgánicos nitrogenados sintetizados por las plantas.

### **2.1.3. Salida de los nutrientes en los ecosistemas**

Los nutrientes han sido extraídos del medio y asimilados por los organismos vivos para su desarrollo y supervivencia. Sin embargo, dichos nutrientes deben retornar al medio para no provocar una reducción neta de los mismos dando lugar a la destrucción progresiva del ecosistema. Durante este proceso se producen pérdidas de los nutrientes en el ecosistema, a través de diferentes mecanismos en función del ciclo biogeoquímico, las cuales se ven compensadas por las entradas de los nutrientes en el mismo, evitando que el ciclo biogeoquímico se rompa.

Desde un punto de vista genérico, los nutrientes de los elementos de N, P y K son devueltos al medio mediante la descomposición de la materia orgánica proveniente de las excreciones o de la muerte de los seres vivos del ecosistema. Una vez en el medio, éstos pueden ser arrastrados por corrientes fluviales hasta las cuencas de los océanos o arrastrados a capas del suelo más profundas (lixiviación) donde no son alcanzables para los organismos autótrofos, saliendo de esta forma del ecosistema. El nitrógeno, además, también puede salir del ecosistema mediante la acción de bacterias desnitrificantes, como las *Pseudomonas Fluorescens* que transforman los iones nitrato en nitrógeno gaseoso, liberándolo de esta forma a la atmósfera.

## 2.2. Influencia de la luz y del fotoperiodo

La mayoría de los procesos fotosintéticos están controlados directa o indirectamente por la luz, por lo que se considera el principal regulador de la fotosíntesis. La luz participa en la regulación de la actividad de enzimas fotosintéticas (activándolas) y de enzimas implicadas en las vías de degradación (desactivándolas).

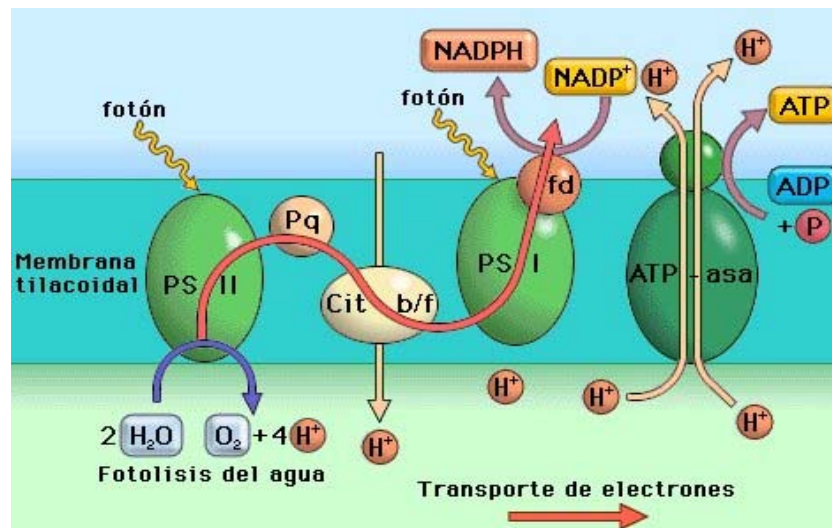
La fotosíntesis tiene lugar en dos etapas, una fase luminosa (en las membranas tilacoidales) y una fase oscura (en el estroma) llamada así por ser independiente de la luz. Ambas fases tienen lugar en los cloroplastos de las células vegetales<sup>11</sup>.



**Figura 1.** Componentes de un cloroplasto.

En la fase luminosa se llevan a cabo determinados mecanismos mediante los que se obtiene ATP y NADPH. Para ello, las plantas disponen de fotosistemas para la captación de la energía luminosa, en los cuales los fotones excitan los electrones de los pigmentos para iniciar la cadena de transporte electrónico. Este movimiento de electrones en la membrana tilacoidal, además de reducir el  $\text{NADP}^+$  a NADPH, genera un gradiente de protones en el espacio intratilacoidal a través de varios complejos proteicos. El retorno de los protones al estroma a través de la ATP sintetasa da lugar a la síntesis de ATP a partir de ADP y  $\text{P}_i$ . Un esquema de este proceso se muestra en la Figura 2.

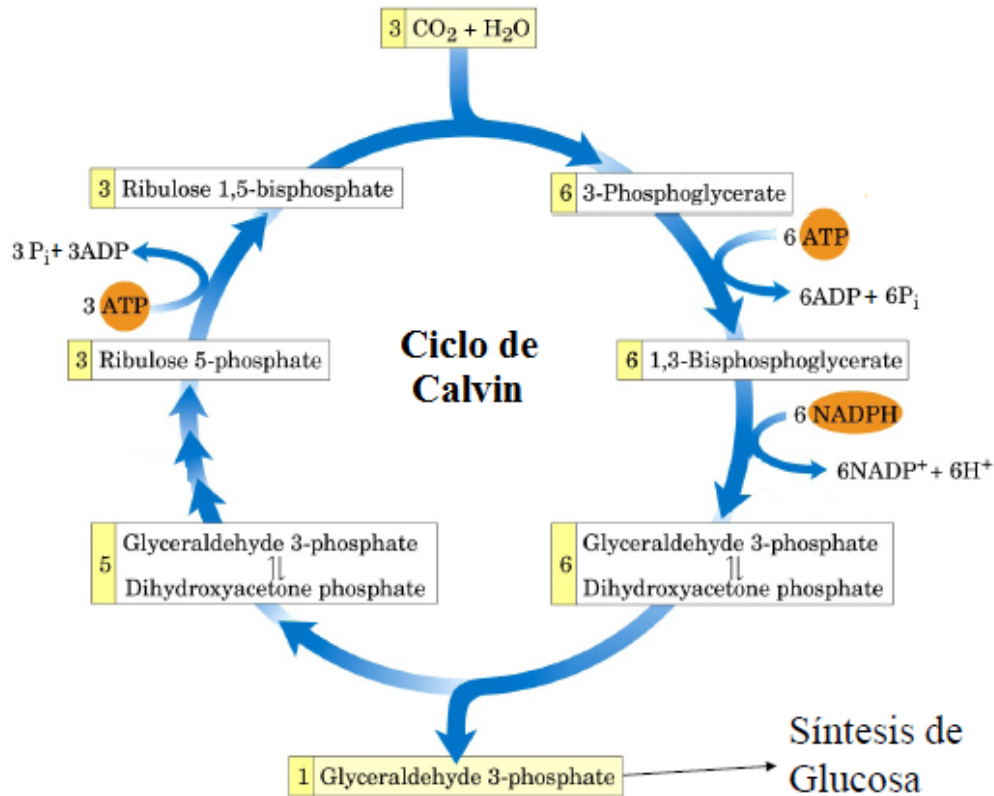
<sup>11</sup> J. Koolman y K. H Röhm, *Bioquímica: texto y atlas*. Ed. Médica Panamericana, 2005.



**Figura 2.** Mecanismo del transporte electrónico en la membrana tilacoidal.

En la fase oscura se emplea el ATP y el NADPH obtenidos en la fase luminosa para reducir los átomos de carbono del  $\text{CO}_2$  para obtener hexosas. Este proceso tiene lugar en el estroma de los cloroplastos a través de una serie de reacciones cíclicas que reciben el nombre de ciclo de Calvin. El ciclo se inicia con tres moléculas de  $\text{CO}_2$ , el cual se fija sobre el carbono carbonilo de tres moléculas de ribulosa-1,5-bisfosfato para formar seis moléculas de 3-fosfoglicerato. Esta primera reacción del ciclo de Calvin está catalizada por la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa, más conocida como rubisco, y es la etapa limitante del ciclo. Las seis moléculas de 3-fosfoglicerato sufren una reacción de fosforilación con consumo de ATP y una posterior reducción con NADPH para dar lugar a seis moléculas de gliceraldehido-3-fosfato, de las cuales una de ellas se empleará para la síntesis de una molécula de hexosa y las cinco restantes en la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato.

Sin embargo, para la síntesis de una molécula de hexosa son necesarias en total dos moléculas de gliceraldehido-3-fosfato, por lo que serán necesarias dos vueltas del ciclo de Calvin. Un esquema del ciclo de Calvin se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Esquema del ciclo de Calvin.

Teniendo una idea general de los mecanismos que se llevan a cabo durante la fotosíntesis se puede comprender con mayor facilidad la influencia que pueda ejercer la luz sobre dichos procesos. La influencia de la luz sobre la fotosíntesis repercute sobre la actividad de las enzimas implicadas mediante mecanismos indirectos. Dichos mecanismos se muestran a continuación<sup>12</sup>:

- **pH:** en la etapa luminosa de la fotosíntesis se bombea protones a través de la membrana tilacoidal del estroma al espacio intratilacoidal. Al aumentar el pH del estroma (de 7 a 8 aproximadamente) la actividad de numerosas enzimas se ven afectadas. Esto favorece la actividad de la rubisco (enzima de la etapa limitante del ciclo de Calvin), puesto que su pH óptimo es en torno a 8, por lo que daría un aumento en la actividad fotosintética.
- **Magnesio:** el  $Mg^{2+}$  activa varias enzimas de la fotosíntesis entre las que se incluye la rubisco. La luz provoca un aumento en la concentración de  $Mg^{2+}$  en

<sup>12</sup> T. McKee y J. R. McKee, *Bioquímica, las bases moleculares de la vida*. 4ª Ed. México, 2009.



el estroma ya que durante la etapa luminosa de la fotosíntesis, este catión se desplaza a través de la membrana tilacoidal hacia el estroma.

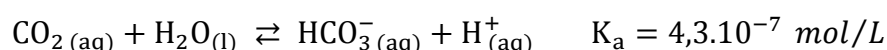
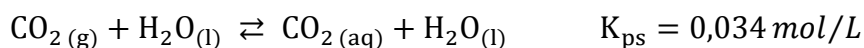
- **Sistema ferredoxina-tiorredoxina:** la luz reduce a la tiorredoxina, la cual se trata de una proteína de bajo peso molecular que posee un puente disulfuro y que puede reducir puentes disulfuro de otras proteínas. De esta forma es capaz de activar las proteínas biosintéticas y desactivar las degradativas.
- **Fitocromo:** el fitocromo es una proteína que posee un cromóforo, cuya activación induce varias vías de transducción de señales que conllevan a diversas respuestas de la planta bajo la exposición de luz, ya sea la germinación de las semillas, el alargamiento de las raíces, la floración, etc.

Sabiendo esto se deduce que la actividad fotosintética aumenta en función de la intensidad lumínica, aunque su magnitud dependerá de las condiciones óptimas de los pigmentos de cada especie vegetal.

### 2.3. Influencia del pH

El pH de una masa de agua es una propiedad de carácter químico de vital importancia para el desarrollo de los organismos que la habitan, ya que influye sobre determinados procesos químicos y biológicos. Esto está relacionado con que el pH determina la solubilidad del CO<sub>2</sub> y los diferentes nutrientes, influyendo directa o indirectamente en el metabolismo de los organismos afectados a la vez que la actividad de los mismos también influye en el pH del medio.

En las aguas naturales el pH del agua nunca es neutro debido a las sustancias disueltas en ella, siendo el CO<sub>2</sub> la causa principal de su acidez. El pH de dichos sistemas acuáticos puede fluctuar de forma diaria debido a los cambios en la actividad de los organismos vegetales en función de las horas de luz. Esto se justifica con los equilibrios que sufre el CO<sub>2</sub><sup>13</sup> en el agua y el principio de Le Châtelier:



<sup>13</sup> J. Moore, C. Stanitski y P. Jurs, *Chemistry: The Molecular Science*. 4ª Ed., Cengage Learning, 2010.

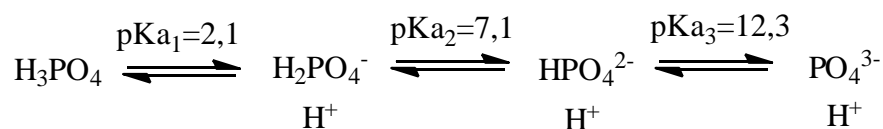
En presencia de luz las plantas consumen el  $\text{CO}_2$  disuelto en el agua, lo que provoca un desplazamiento del equilibrio hacia la formación de  $\text{CO}_2$  con el consecuente descenso de la concentración de protones (aumenta el pH). Sin embargo, en ausencia de luz, las plantas no pueden llevar a cabo la fotosíntesis y el proceso de respiración celular es el que predomina, en el cual se libera  $\text{CO}_2$ . El aumento de la concentración de  $\text{CO}_2$  en el medio conlleva a un desplazamiento del equilibrio hacia la formación de bicarbonato y protones (ácido carbónico), provocando que el pH disminuya. Además de los seres autótrofos también influyen en el nivel de  $\text{CO}_2$  disuelto, y por consiguiente en el pH, los seres heterótrofos a través de la respiración celular liberando  $\text{CO}_2$  contribuyendo de esta forma a una disminución del pH al no poder llevar a cabo la fotosíntesis.

Hasta ahora se ha comentado una visión general de cómo los seres vivos del medio acuático repercuten sobre el pH. Sin embargo, el pH del medio también ejerce una influencia sobre los organismos del medio.

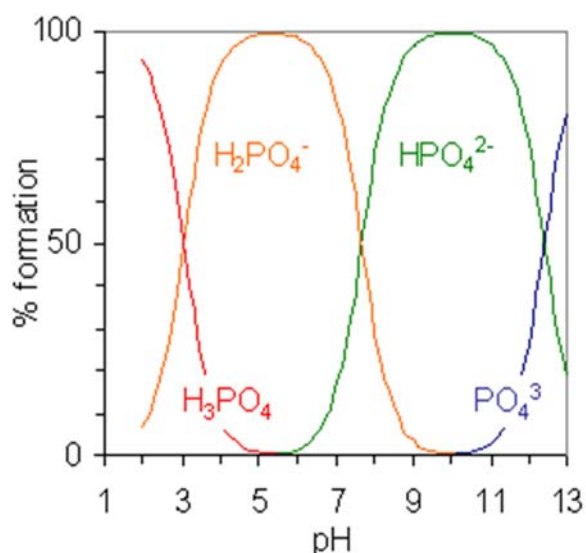
Como se ha mencionado antes, el pH de los ecosistemas acuáticos puede fluctuar. A pesar de esto los seres vivos que habitan dichos medios son capaces de tolerar esas fluctuaciones hasta ciertos límites. En el momento en el que se sobrepasan esos límites o las fluctuaciones son demasiado bruscas, la vida acuática puede sufrir graves daños e incluso la muerte. Sin embargo, dichos cambios drásticos del pH no son el caso de este estudio, ya que en el sistema de estudio se ha modificado moderadamente y sin sobrepasar los límites naturales de los sistemas acuáticos (pH de 6 a 8 por lo general).

Ya se ha mencionado que en los ecosistemas acuáticos por lo general el elemento limitante es el fósforo debido a que su disponibilidad se ve limitada por su tendencia a precipitar en presencia de metales divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) y del ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a pH neutro o alcalino. La disponibilidad de un elemento es proporcional a su capacidad para disolverse, por ello, el fósforo es absorbido por las plantas principalmente como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , aunque también es absorbido en forma de  $\text{HPO}_4^{2-}$  a medida que aumenta el pH al encontrarse en mayor proporción. Esto se justifica por las reacciones de equilibrio ácido-base de las especies inorgánicas de fósforo y la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log\left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right)$$



A niveles de pH bajos (inferiores a 2) la especie predominante es el ácido fosfórico. A medida que el pH aumenta también lo hace la concentración de la base conjugada de dicho ácido ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) hasta valores de pH próximos a 5,5. A valores superiores de pH comienza a aumentar la proporción de  $\text{HPO}_4^{2-}$  hasta llegar a su máximo en torno a pH 8, a partir del cual la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  aumenta hasta ser la especie predominante<sup>14, 15</sup>. Este fenómeno se ilustra en la Figura 4.



**Figura 4.** Especiación del ácido fosfórico en función del pH<sup>15</sup>.

El intervalo de pH al que se observa la máxima disponibilidad de fósforo para actividades biológicas se encuentra aproximadamente entre 6,5 y 7,5. Esto se debe a que en dicho intervalo de pH se produce la máxima solubilidad de las especies inorgánicas del fósforo accesibles para las plantas. Fuera de ese intervalo, la disponibilidad del fósforo bajará provocando una disminución en la actividad fotosintética del sistema al tratarse del elemento limitante principal para dichas procesos biológicos.

<sup>14</sup> A. D. F. Toy, *The Chemistry of Phosphorus: Pergamon Texts in Inorganic Chemistry*. Vol. 3, Elsevier, **2013**.

<sup>15</sup> N. –Rodríguez, A. Rojas y M. T. Ramírez, *Estudio y comportamiento de la capacidad buffer de mezclas de especies de un mismo sistema polidonor de protones*. Vol. 25, Elsevier, **2014**.

### 3. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA

Este trabajo consta de dos sistemas de estudio, un acuario de agua dulce y un acuario de agua salada.

#### 3.1. Acuario de agua dulce

El sistema de agua dulce consta de un tanque de 80 L y que contiene las siguientes especies vegetales: *Alternanthera cardinalis*, *Cryptocoryne wendtii-zelandiae*, *Cryptocoryne wendtii red*, *Microsorium pteropus*, *Lilaeopsis novae-zelandiae*, *Limnophila sessiliflora-ambulia*, *Rotala indica* y *Rotala rotundifolia*.





**Figura 5.** Plantas del acuario de agua dulce.

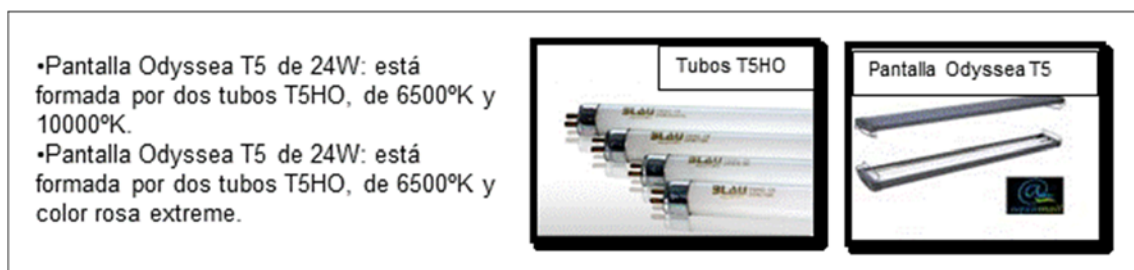
Además de esta gran diversidad de plantas, en el acuario también habitan diferentes especies de peces: tres *Xiphophorus Maculatus* (platys), dos *Crossocheilus Siamensis* (zorro volador de Siam), cinco *Paracheirodon Axeroldi* (tetra cardenal), un *Chromobotia Macracanthus* (botia payaso), dos *Betta Splendes* (luchador de Siam), un *Pterophyllum Scalare* (scalar o pez ángel) y tres *Poecilia Sphenops* (molly balón). El acuario dispone de un sistema de alimentación digital a pilas EHEIM que proporciona el alimento a los peces de forma regular y automática.



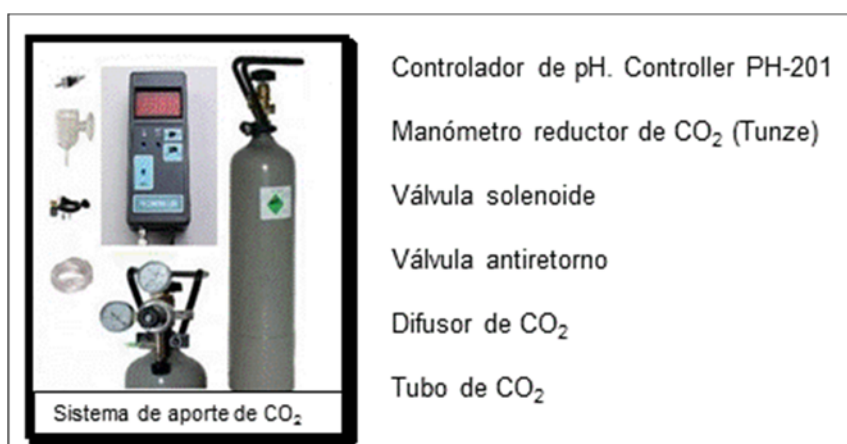


**Figura 6.** Peces del acuario de agua dulce.

Las plantas acuáticas necesitan ciertos compuestos para llevar a cabo la fotosíntesis, que se conocen como nutrientes, además de la luz. Para ello el acuario dispone de un sistema de iluminación formado por una tira de leds 55 cm (5 W) y dos pantallas Odyssey con dos tubos T5HO para agua dulce, cada uno de 24 W y con diferentes temperaturas de color. Además de la iluminación, también cuenta con un sistema de aporte de CO<sub>2</sub> que inyecta directamente el CO<sub>2</sub> en el agua. En las Figuras 7 y 8 se describen estos componentes.



**Figura 7.** Sistema de iluminación del acuario.



**Figura 8.** Sistema controlador del pH.

Para controlar los parámetros del agua y mantenerlos en niveles adecuados y no tóxicos, el acuario cuenta con dos filtros exteriores (Tabla 2) que permiten mantener el agua en condiciones adecuadas tanto para las plantas como para los peces, permitiendo así que puedan llevar a cabo sus funciones vitales. Para que la temperatura del agua se mantenga en torno a 27°C el acuario consta de un sistema de calefacción formado por un termocalentador EHEIM thermo control de 100 W.

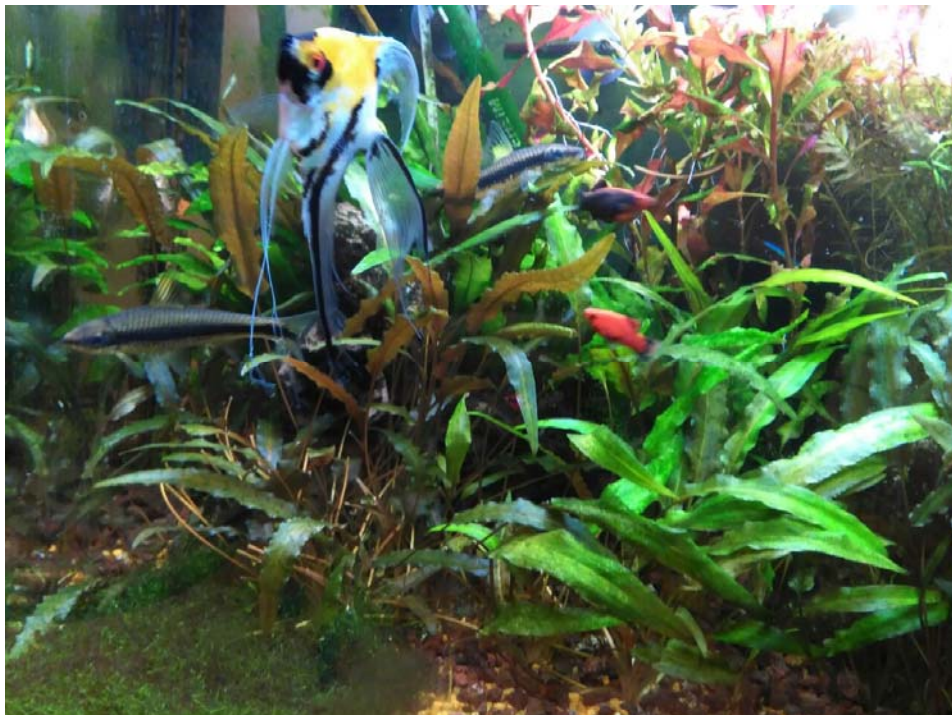
**Tabla 2.** Filtros del acuario y sus características.

<b><i>Filtro exterior EHEIM Classic 2211</i></b>	<b><i>Filtro exterior EHEIM profesional 3 2071</i></b>
Caudal 300 L/h con un consumo de 5W Volumen material filtrante: 1,3 L Medio filtrante biológico EHEIM substract pro Canutillos cerámicos Esponjas filtrantes EHEIM classic 2616111	Caudal 950 L/h con un consumo de 12W Materiales filtrantes originales de EHEIM: SUBSTRATpro, MECHpro Sistema de llaves para cerrar y limpiar el filtro.

Semanalmente el acuario se rellena con 13-14 L de agua y 10 mL de un producto comercial de nutrientes (Nutrafin Plant Gro), para reponer el agua que se evapora y la que se extrae para realizar los diferentes análisis en este estudio y mantener los niveles de nutrientes. Este producto comercial contiene una serie de compuestos cuya composición global presenta un 0,15% de N, 0,0005% de B, 0,0005% de Cu, 0,26% de Fe, 0,05% de Mn, 0,0007% de Mo y 0,003% de Zn. El sistema cuenta con una bomba para acuario EHEIM compact 300, tubo y grifo para realizar la toma de muestra.

El sustrato está compuesto por arena de sílice de 5 mm de grosor y arena volcánica de una media de 10 mm de grosor que constituye el 70% de la mezcla. Además se ha incorporado en la mezcla tierra vegetal y akadama en proporción 20:10 con respecto al total. También se ha adicionado piedra de tipo caliza para aumentar la dureza del agua.

En la Figura 9 se muestra una foto del acuario de agua dulce estudiado en este trabajo.



**Figura 9.** Acuario plantado de agua dulce.

### **3.2. Acuario de agua salada**

Este sistema ha sido montado a lo largo de este estudio. Previamente a la incorporación de algas, el acuario ha tenido que pasar por un corto periodo de aclimatación (30 días desde su puesta en funcionamiento). A las cinco semanas se incorporaron mejillones jóvenes (2-3 cm de longitud) al acuario.

El sistema se basa en un acuario plantado de agua salada de 40 L (urna con tapa de cristal) que recrea el ecosistema autóctono atlántico. El acuario consta de las siguientes especies vegetales: *Sargassum muticum*, *Ulva rigida*, *Gigartin pistillata*,



*Bifurcaria bifurcata*, *Gelidium pusillum*, *Litophyllum incrustans*, *Hildenbrandia rubra* y *Corallina*.

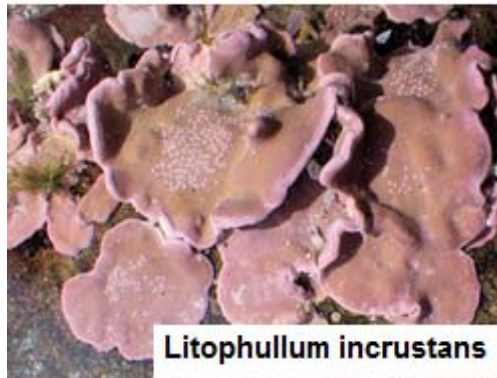


Figura 10. Algas del acuario de agua salada.

Las especies animales que habitan el acuario son *Mytilus edulis* (mejillones) y unos pocos caracoles marinos presentes en las algas (se retiraron del acuario todos los posibles ya que se alimentaban de las algas).



**Figura 11.** Mejillones.

El acuario dispone de un sistema de iluminación formado por una lámpara de Nano led light 2.0 BLAU (11 W), además de un sistema de aporte de CO<sub>2</sub> con campana difusora.

Para la circulación del agua el acuario consta de una bomba de circulación nanostream 6020 TUNZE, cuyas características se recogen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Sistema de circulación del agua y características.

---

<b><i>Bomba de circulación nanostream 6020 TUNZE</i></b>
Potencia de circulación: aproximadamente 2500 L/h
Consumo de energía: 4 W
Tensión/frecuencia: 230 V/50 Hz (115 V/60 Hz)
Cable: 2 m
Medidas sin ángulo de corriente: 65x60x72 mm
Expulsión: ø 40 mm
Silence Magnet Holder hasta un grosor de vidrio de 12 mm

---

Para mantener el agua en las condiciones adecuadas para los seres vivos que habitan el acuario, éste dispone de dos filtros, uno externo y uno de superficie descritos en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Filtros del acuario de agua salada y características.

<b><i>Filtro exterior EHEIM experience 150</i></b>	<b><i>Filtro de superficie casero</i></b>
Caudal: 500 L/h Consumo: 8 W Volumen medio filtrante: 2,3 L Material filtrante: EHEIM MECH y SUBSTRACT PRO Esponja y almohadilla filtrante EHEIM SUBSTRACT Grasa lubricante EHEIM	Envase sujeto a la pared del acuario y ligeramente sumergido en el agua con el siguiente material filtrante: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Carbón activo</li> <li>• EHEIM SUBSTRACT PRO</li> <li>• Perlón MARINA</li> <li>• Piedra de carbonato cálcico</li> </ul>

El acuario también cuenta con un sistema Skimmer para la eliminación de materia orgánica, ya que los seres marinos están adaptados a vivir en aguas con un bajo contenido en materia orgánica y un exceso de la misma podría resultar nocivo para los mismos. Para ello el Skimmer se encarga de la formación de una importante cantidad de finas burbujas (diámetro entre 0,1 y 0,3 mm) sobre las que se adsorben dichas sustancias residuales y se extraen del acuario. Las características del Skimmer se reúnen en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Sistema Skimmer.

<b><i>Doc Skimmer 9001 TUNZE</i></b>
Profundidad de inmersión: 135-155 mm Volumen del vaso de espuma: 0,2 L Rendimiento de aire: aproximadamente 100 L/h, 2,5 W, 230 V/50 Hz Magnet Holder para un grosor de vidrio de hasta 10 mm

El acuario dispone de un enfriador HAILEA HC-100 A que mantiene la temperatura del agua en torno a 15,6 °C, además de un termómetro para su control. El enfriador presenta las características descritas en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Sistema de enfriamiento.

<b><i>Enfriador HAILEA HC-100 A</i></b>
Flujo de bomba: 200-1000 L/h
Potencia refrigerante: 150 W
Potencia: 1/20 HP
Consumo energético: 1,0 A

Semanalmente se realizan cambios del agua de 5 L y se adiciona (tras el cambio de agua) 5 mL de Nutrafin Plant Gro.

El sustrato está compuesto por una capa inferior de arena de 10 mm de diámetro, sobre la que se distribuye una capa de arena de 3-5 mm de diámetro y una capa superficial de arena de playa. A mayores, hay 3 rocas recogidas en la ría sobre las que se insertan las algas del acuario y los mejillones.

En la Figura 12 se muestra una foto del acuario de agua salada descrito.



**Figura 12.** Acuario de agua salada.

## **4. OBJETIVO**

El presente estudio tiene como objeto evaluar la evolución de los nutrientes de potasio, fósforo y nitrógeno de un sistema biológico modificando el fotoperiodo al que se somete y el pH del agua. El sistema en estudio es un acuario plantado de agua dulce (80 L). Para ello se llevan a cabo diversos ensayos aportando al sistema una cantidad fija de nutriente inorgánico ( $K_2HPO_4$ ) modificando las variables anteriormente mencionadas.

Desde el punto de vista analítico, se aplicarán los métodos y técnicas instrumentales adecuados para la determinación de los nutrientes presentes en su forma más abundante ( $K^+$ ,  $PO_4^{3-}$  y  $NO_3^-$ ).

Se tratará de relacionar los resultados obtenidos con los ciclos biogeoquímicos de las especies inorgánicas consideradas, así como con la actividad biológica del sistema.

De forma paralela se aborda el estudio de un acuario plantado de agua salada, evaluando la viabilidad de la metodología de análisis empleada para la matriz de agua dulce.



## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

A continuación se describe la estrategia diseñada en los distintos ensayos, los procedimientos experimentales llevados a cabo y el material empleado.

### **5.1. Equipos, material y reactivos**

Los aparatos necesarios para realizar los diferentes ensayos son los que se muestran a continuación:

- Balanza electrónica GRAM modelo ST-220S, de precisión  $\pm 0.0001\text{g}$ .
- Balanza granataria Precisa modelo 620C, precisión  $\pm 0.01\text{g}$ .
- Espectrofotómetro UV-Vis VWR, modelo UV-6300PC.
- Estufa Selecta  $T \leq 250^\circ\text{C}$ .
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica de llama, Perkin-Elmer, modelo 2380.

Las características del material de laboratorio empleado son las siguientes:

- Material volumétrico de vidrio (matraces, pipetas, vasos, etc.).
- Micropipetas Eppendorf, de 100-1000  $\mu\text{L}$  y de 20-200  $\mu\text{L}$  de capacidad.
- Celdas de cuarzo planoc cuadradas de 1 cm de lado.

Todo el material se lava con abundante agua y se enjuaga tres veces con agua ultrapura.

Los reactivos necesarios para realizar los ensayos son:

- Ácido clorhídrico 37% PA, Panreac.
- Cloroformo PA, Panreac.
- Monohidrógenofosfato potásico PA, Sigma-Aldrich.
- Dihidrógenofosfato potásico PA, Panreac.
- Nitrato potásico PA, Merk.
- Disolución patrón potasio 1000 ppm, PlasmaCAL.

- Óxido de lantano 5%.
- Molibdato amónico tetrahidratado, PA Panreac.
- Vanadato amónico, RIEDEL-DE HAËN.
- Ácido sulfúrico 3M.
- Persulfato potásico PA, Merck.

Para la preparación de todas las disoluciones se utiliza agua ultrapura.

## 5.2. Estrategia de Análisis

El sistema en estudio presenta un contenido inicial de los nutrientes de interés (N, P y K) indicado en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Contenido inicial de los macronutrientes estudiados en el acuario de agua dulce.

<b>Nitrógeno</b>	<b>Fósforo</b>	<b>Potasio</b>
5,2 mg/L	0,13 mg/L	5,8 mg/L

Se establece una sistemática, descrita en la Tabla 9, para estudiar la evolución del fosfato, potasio y nitrato tras incorporar al sistema  $K_2HPO_4$ . En los ensayos iniciales únicamente se llevó a cabo la adición del nutriente inorgánico y el estudio de su evolución a corto y a largo plazo. En los ensayos posteriores, a mayores, se modifica una variable del sistema (intensidad de luz y pH) y se estudia su evolución a largo plazo.

El nutriente inorgánico ( $K_2HPO_4$ ) se introduce en el sistema en una única adición, ya que la cantidad administrada no altera de forma perjudicial al equilibrio aconsejable de macronutrientes (N, P y K) en acuarios de agua dulce, como se muestra en la Tabla 8.



**Tabla 8.** Comparación entre la relación óptima de nutrientes y la existente en el sistema de agua dulce bajo estudio.<sup>16</sup>

Nutriente	N	P	K
<i>Relación óptima de los macronutrientes</i>	10	1	15
<i>Relación inicial de los macronutrientes en el sistema</i>	40	1	45

Se toma una muestra de agua en cada ensayo antes de la incorporación del nutriente al acuario. Hecha la incorporación del nutriente, se diseña un muestreo del agua del acuario. El muestreo se realiza a lo largo de una semana, tomando muestras cada dos horas el primer día y dos muestras el resto de la semana (una por la mañana y otra por la tarde, siempre a la misma hora). El acuario cuenta con un sistema de extracción de muestras compuesto por una bomba de acuario EHEIM compact 300, tubo y grifo. Se utilizaron tubos de vidrio con tapón de rosca de 25 mL de capacidad.

**Tabla 9.** Planificación de los ensayos.

<b>Primer ensayo</b>	
<i>Fotoperiodo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mañana: 4 horas con luz intensa.</li> <li>• Tarde: 4 horas con luz tenue.</li> </ul>
<i>pH fijado</i>	7,30 ± 0,05
<i>Periodo de estudio</i>	13 al 14 abril 2015
<i>Aporte nutrientes</i>	100 mg K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<i>Toma de muestra</i>	<p><i>Agua del acuario:</i> Muestra inicial (sin aporte). Muestreo después del aporte (2 días):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1º día: se toman 4 muestras por la tarde, una cada 2 horas.</li> <li>• 2º día: se toman 3 muestras por la mañana, una cada 2 horas.</li> </ul>
<i>Aporte H<sub>2</sub>O</i>	Se adicionan 13 L de H <sub>2</sub> O al acuario tras el muestreo.

<sup>16</sup> C. Rubilar, "Método de los Desequilibrios Controlados".  
[http://wiki.infopez.com/index.php/Sistema\\_de\\_Abonado\\_MDC\\_%22M%C3%A9todo\\_de\\_los\\_De\\_sequilibrios\\_Controlados%22](http://wiki.infopez.com/index.php/Sistema_de_Abonado_MDC_%22M%C3%A9todo_de_los_De_sequilibrios_Controlados%22). Consulta: 25/03/15

---

## Segundo ensayo

---

<i>Fotoperiodo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mañana: 4 horas con luz intensa.</li> <li>• Tarde: 4 horas con luz tenue.</li> </ul>
<i>pH fijado</i>	7,30 ± 0,05
<i>Periodo de estudio</i>	20 abril al 23 abril 2015
<i>Aporte nutrientes</i>	100 mg K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<i>Toma de muestra</i>	<p><i>Agua del acuario:</i> Muestra inicial (sin aporte) Muestreo después del aporte: durante 4 días se recogen 1 muestra por la mañana y otra por la tarde.</p>
<i>Aporte H<sub>2</sub>O</i>	Se adicionan 13 L de H <sub>2</sub> O al acuario tras el muestreo Poda del acuario.

---

## Tercer ensayo

---

<i>Fotoperiodo</i>	<p>Se modifica el ciclo de luz:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mañana: 4 horas de luz intensa.</li> <li>• Tarde: 4 horas de luz intensa.</li> </ul>
<i>pH fijado</i>	7,30 ± 0,05
<i>Periodo de estudio</i>	27 abril a 30 abril 2015
<i>Aporte nutrientes</i>	100 mg K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<i>Toma de muestra</i>	<p><i>Agua del acuario</i> Muestra inicial (sin aporte) Muestreo después del aporte: durante 4 días se recogen muestras:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1º día: se toman 5 muestras, una cada 2 horas</li> <li>• 2º, 3º y 4º día: se toman 2 muestras por día (una por la mañana y otra por la tarde)</li> </ul>
<i>Aporte H<sub>2</sub>O</i>	Se adicionan 13 L de H <sub>2</sub> O al acuario tras el muestreo

---

## Cuarto ensayo

---

<i>Fotoperiodo</i>	Se mantiene el ciclo de luz fijado en el tercer ensayo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mañana: 4 horas de luz intensa.</li> <li>• Tarde: 4 horas de luz intensa.</li> </ul>
<i>pH fijado</i>	Se cambia el pH a $7,00 \pm 0,05$
<i>Periodo de estudio</i>	11 mayo a 14 mayo 2015
<i>Aporte de nutrientes</i>	100 mg $K_2HPO_4$
<i>Toma de muestra</i>	Muestra inicial (sin aporte) Muestreo después del aporte: durante 4 días se recogen muestras: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1º día: se toman 5 muestras, una cada 2 horas</li> <li>• 2º, 3º y 4º día: se toman 2 muestras por día (una por la mañana y otra por la tarde)</li> </ul>

---

### 5.3. Determinación de Iones Fosfato

Para la determinación de fosfatos en aguas naturales ha de tenerse en cuenta que éste puede encontrarse en varias formas químicas, ya sea como ortofosfatos, como fosfatos condensados o formando parte de materia orgánica<sup>17</sup>. En el procedimiento analítico se siguen dos pasos generales:

- Conversión de la forma de fosfato de interés a ortofosfato disuelto.
- Determinación colorimétrica del ortofosfato disuelto.

Los fosfatos que responden a los test colorimétricos sin hidrólisis o digestión oxidante previa se denominan “fosfatos reactivos”, constituidos principalmente por ortofosfato. En caso de realizar una hidrólisis ácida antes de la colorimetría los fosfatos que responden al análisis son los ortofosfatos y los fosfatos condensados (fosfato ácido-hidrolizable) y, si en lugar de una hidrólisis ácida se lleva a cabo una digestión

---

<sup>17</sup> J. D. Stednick, *Wildland water quality sampling and analysis*. San Diego: Academic Press, cop, 1991.

oxidante entonces se determina el fosfato total disuelto (ortofosfato, fosfato condensado y fosfato asociado a materia orgánica).

En este trabajo se estudió la posibilidad de determinar el contenido total de fosfato, para lo que es necesario una digestión previa oxidante Sin embargo, no resultó viable al no obtener resultados reproducibles en los ensayos realizados. Por tanto, se decidió analizar únicamente el ortofosfato del agua del acuario.

Existe un gran número de métodos colorimétricos válidos para la determinación de fosfatos en aguas naturales. El procedimiento elegido está basado en el empleo del ácido vanadomolibdofosfórico, siendo éste uno de los métodos de referencia para aguas y aguas residuales establecido por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA).<sup>18</sup>

El método seleccionado se basa en la formación de isopoliácidos en medio ácido a partir de vanadatos y molibdatos que en presencia de iones fosfato se agrupan entorno al fósforo dando lugar a un heteropoliácido estable<sup>19</sup>. La formación de este complejo (cromóforo amarillo) da lugar a un incremento de la intensidad del color amarillo de la disolución, permitiendo determinar el contenido de fosfato mediante una medida espectrofotométrica.

La naturaleza del complejo amarillo formado aún no se ha determinado con certeza aunque sí se conoce que en función de la concentración de fosfatos la relación entre los iones vanadatos y molibdatos en los heteropolimetalatocomplejos varía, presentando distinta absortividad molar en función del estado de agregación:

- A altas concentraciones de fósforo (superiores a 4 ppm) el complejo amarillo presenta mayor estabilidad cuando participa un ion de vanadato por cada ocho de molibdato (relación 1:8).
- A bajas concentraciones de fósforo (inferiores a 3,20 ppm) el complejo más estable es aquel en el que participan un ion vanadato por cada dos de molibdato (relación 1:2).

---

<sup>18</sup> APHA, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 22<sup>o</sup>ed.; Rice, E.W.; Baird, R.B.; Clesceri, L.S. (eds.) Maryland **2012**.

<sup>19</sup> A. Carrasquero y M. Adams, *Estudio del complejo amarillo vanadomolibdofosfórico para el análisis de fósforo en suelos*. *Venezuelos*, **1995**, 3 (2), 83-88.

Teniendo en cuenta esta consideración y que el contenido inicial (sin adición de sal) de fósforo es de 0,16 ppm se decide trabajar en el rango de baja concentración de fósforo para asegurarse de que se obtiene un único complejo y así evitar posibles problemas de linealidad en el calibrado. La cantidad de sal adicionada en los ensayos (0,10 g) es suficiente para poder observar un aumento inicial considerable de la concentración de fósforo (0,40 ppm teóricos) pero manteniéndose dentro del intervalo de baja concentración.

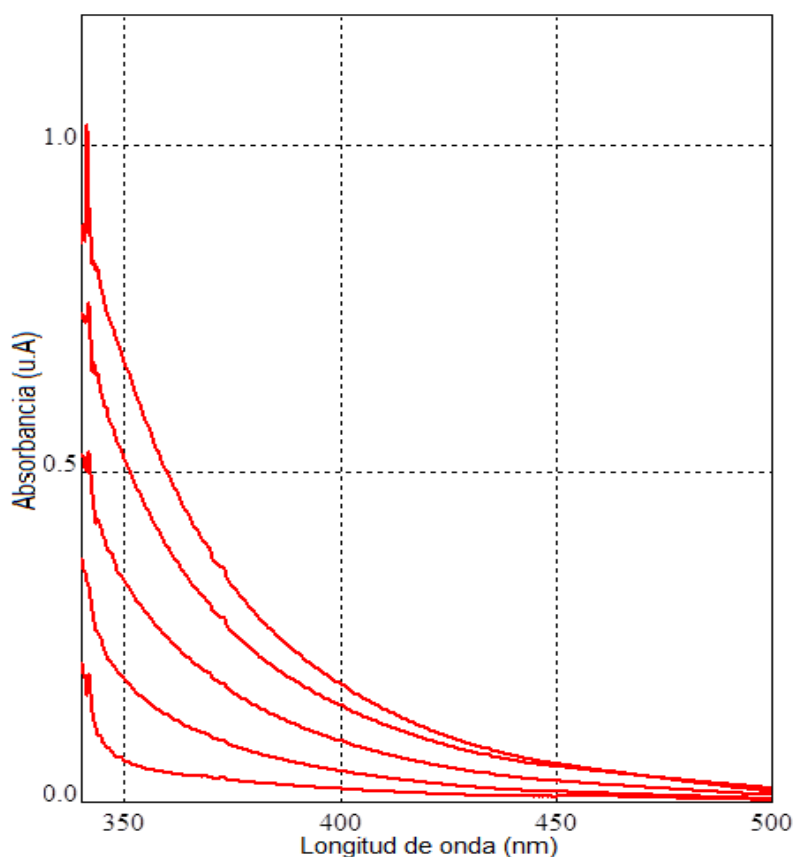
La medida espectrofotométrica se puede realizar en un intervalo de longitudes de onda entre 400 y 470 nm en función de la sensibilidad deseada. Al trabajar con bajas concentraciones de fósforo, la absorbancia de las muestras y los patrones se medirá a 400 nm por proporcionar una mayor sensibilidad.

En este método colorimétrico son necesarias las siguientes disoluciones:

- Disolución molibdato amónico: se pesan 6,25 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y se disuelven en 75 mL de agua mili-Q.
- Disolución vanadato amónico: se pesan 0,3125 g de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  y se disuelven en 75 mL de agua mili-Q. Se calienta sobre una placa calefactora y se lleva a ebullición. Hecho esto, se deja enfriar a temperatura ambiente y se adicionan 82,5 mL de ácido clorhídrico concentrado comercial. Se deja enfriar la disolución a temperatura ambiente.
- Disolución del complejo vanadato-molibdato: se vierte la disolución de molibdato amónico sobre la disolución de vanadato amónico y se lleva a 250 mL con agua mili-Q.
- Disolución patrón de ion fosfato: se disuelven 109,7 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en agua mili-Q y se lleva a 250 mL (1 mL = 100  $\mu\text{g}$  de P).

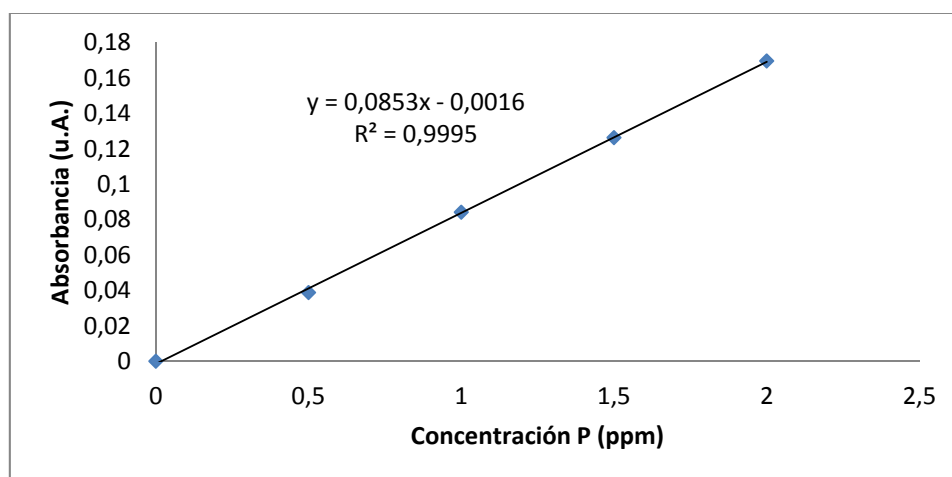
Para la cuantificación de los iones fosfato se construye una recta de calibrado desde 0,20 a 2,00 ppm de P. Se pipetea los volúmenes adecuados de la disolución patrón de P y se transfieren a matraces aforados de 25 mL, a los que se adiciona 5 mL de la disolución de complejo vanadato-molibdato y se enrasa con agua mili-Q. Se dejan reposar durante 10 minutos (o más) y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 400 nm. Las disoluciones de los patrones y de las muestras se preparan el mismo día del análisis.

Los espectros obtenidos para las distintas disoluciones patrón son los que se muestran en la Figura 13, donde se puede comprobar un buen solapamiento para las distintas concentraciones ensayadas. Todas las mediciones se llevan a cabo empleando un blanco en la celda de referencia preparado con el reactivo vanadato-molibdato y agua en las mismas proporciones que en las disoluciones de los patrones.



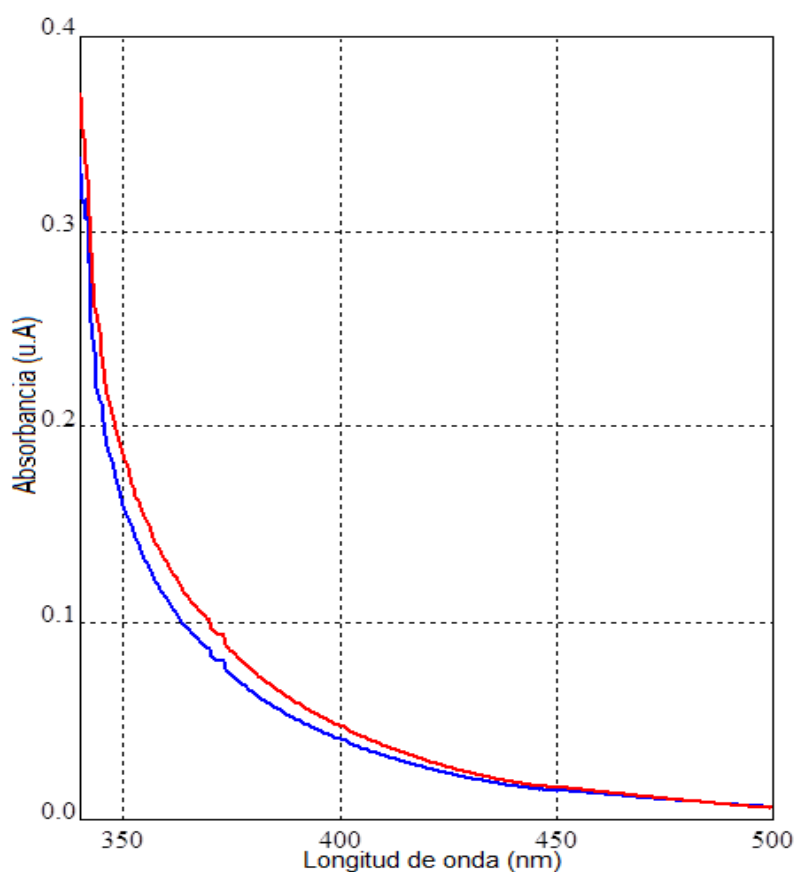
**Figura 13.** Espectros de absorción de las disoluciones patrón de P de 0,20 a 2,00 mg/L.

La recta de calibrado obtenida es la que se muestra en la Figura 14. Se observa una buena linealidad, lo que demuestra que se ha logrado obtener un único complejo amarillo en el análisis al trabajar a bajas concentraciones de fósforo.



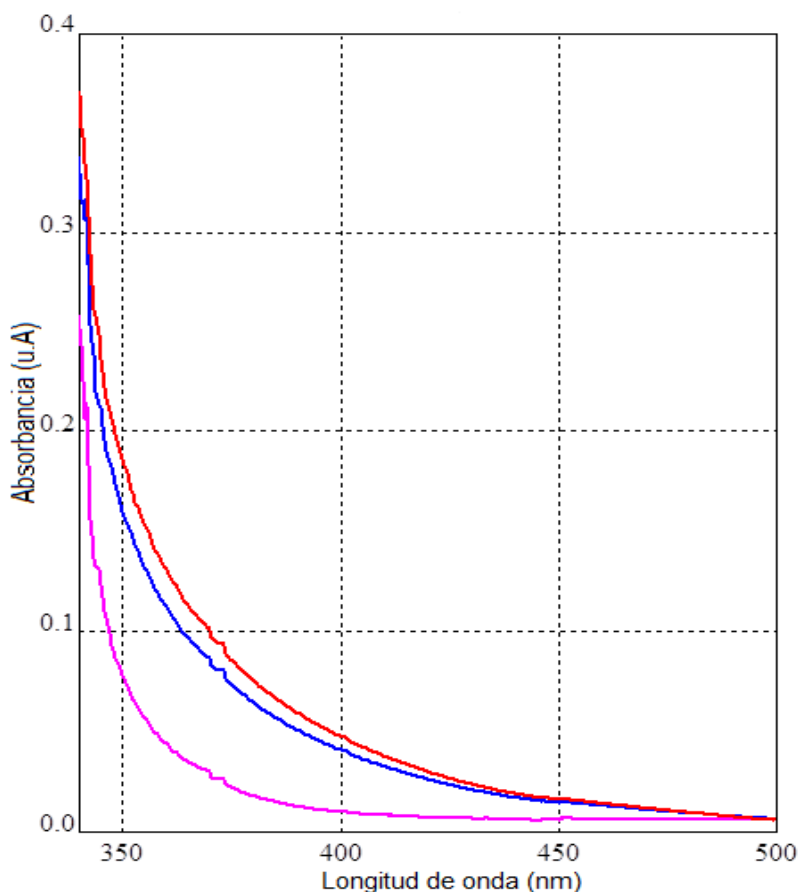
**Figura 14.** Recta de calibrado para la determinación espectrofotométrica de P.

Posteriormente se analiza una muestra del acuario de agua dulce, obteniéndose el espectro de la Figura 15, en donde también se representó el espectro del patrón de 0,50 ppm (en rojo). Se observa que ambos espectros presentan el mismo perfil, por lo que se puede considerar que no existe efecto matriz. Se registra la absorbancia a 400 nm.



**Figura 15.** Espectros de absorción del P obtenidos para la disolución patrón de 0,50 mg/L (en rojo) y una muestra de agua dulce (en azul).

También se analiza una muestra del acuario de agua salada, obteniéndose el espectro de la Figura 16. En ella también se muestra el espectro registrado para un patrón de 0,50 ppm y para la muestra de agua observando que todos presentan perfil similar a pesar del alto contenido en sales disueltas en el acuario de agua salada. Por lo que se considera la ausencia de efecto matriz en este análisis.



**Figura 16.** Espectros de absorción del P obtenidos para la disolución patrón de 0,5 mg/L (en rojo), una muestra del acuario de agua dulce (en azul) y una muestra del acuario de agua salada (en lila).

#### **5.4. Determinación de Iones Nitrato**

Para la determinación de iones nitrato en agua se ha seleccionado la técnica de espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis aplicando el método de la segunda derivada por ser una técnica sencilla y lo suficientemente sensible para los sistemas



en estudio<sup>20</sup>. Empleando esta metodología se consigue minimizar las interferencias en la medida espectrofotométrica por parte de la materia orgánica presente<sup>21</sup>.

Savitzky y Golay desarrollaron un método que permite realizar los cálculos de las derivadas que constituye la base del algoritmo de derivación en la mayoría de los equipos comerciales, como es el utilizado en este estudio. Para poder aplicar la segunda derivada al espectro de absorción es necesario ajustar en el equipo una serie de parámetros, tales como el orden de polinomio y  $\Delta\lambda$ . Para dichos parámetros se fijan los mismos valores establecidos en un estudio previo, siendo  $\Delta\lambda$  de 8 y el orden de polinomio de 4, y se registra el valor de absorbancia a 225,5 nm.

Para poder llevar a cabo la determinación de iones nitrato en agua fueron necesarias las siguientes disoluciones:

- Disolución patrón de nitrato potásico: se pesan 0,60 g de nitrato potásico en una balanza granataria y se secan en la estufa a 105°C durante 24 horas. Finalizada la etapa de secado se pesa una fracción de 0,1143 g de la sal seca y se disuelve en agua ultrapura. Se trasvasa la disolución a un matraz aforado de 250 mL, se adicionan 0,5 mL de cloroformo para la conservación de la disolución, y se enrasa con agua ultrapura. La concentración final resultante de la disolución es de 457,2 mg KNO<sub>3</sub>/L.
- Disolución de ácido clorhídrico 1 N: se miden 21,0 mL del ácido clorhídrico comercial y se transfieren a un matraz aforado de 250 mL, en donde se enrasa con agua ultrapura.

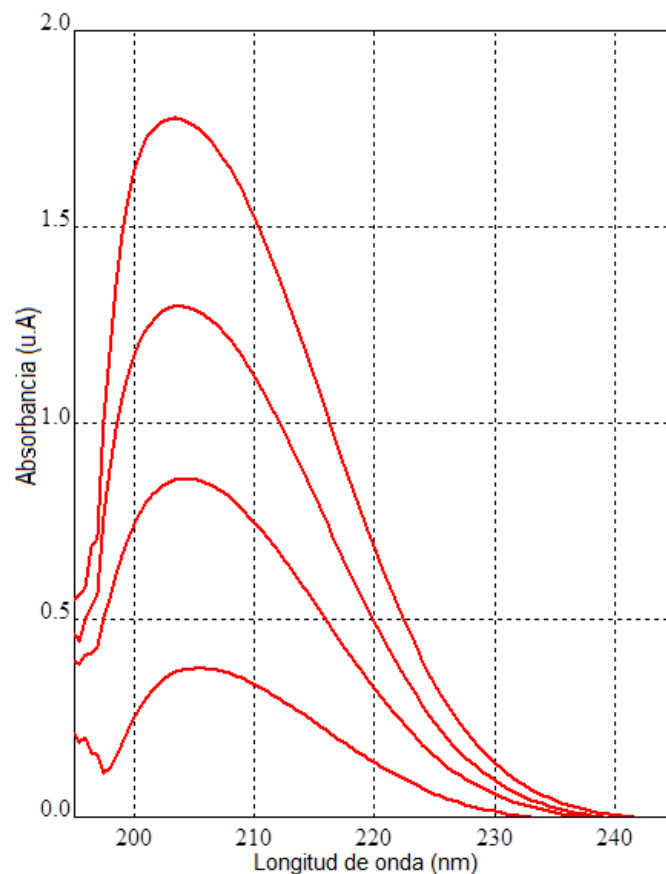
Para la cuantificación del contenido de iones nitrato se prepara un calibrado constituido por una serie de patrones con concentraciones de nitrato potásico desde 5,00 a 20,00 mg KNO<sub>3</sub>/L. Para la preparación de los patrones en matraces aforados de 25 mL se pipetea el volumen necesario de disolución patrón de nitrato potásico, se adiciona 1 mL de HCl 1 N y se enrasa con agua ultrapura. Dichas disoluciones se preparan el mismo día del análisis. Se registran los espectros de absorción de los patrones con intervalos de longitud de onda de 0,5 nm para obtener un mayor suavizado a la hora de aplicar la segunda derivada.

---

<sup>20</sup> A. Ríos, M.C. Moreno, B.M. Simonet, *Técnicas Espectroscópicas en Química Analítica. Volumen I; Aspectos básicos y espectrometría molecular*. Editorial Síntesis, S.A., Madrid **2012**.

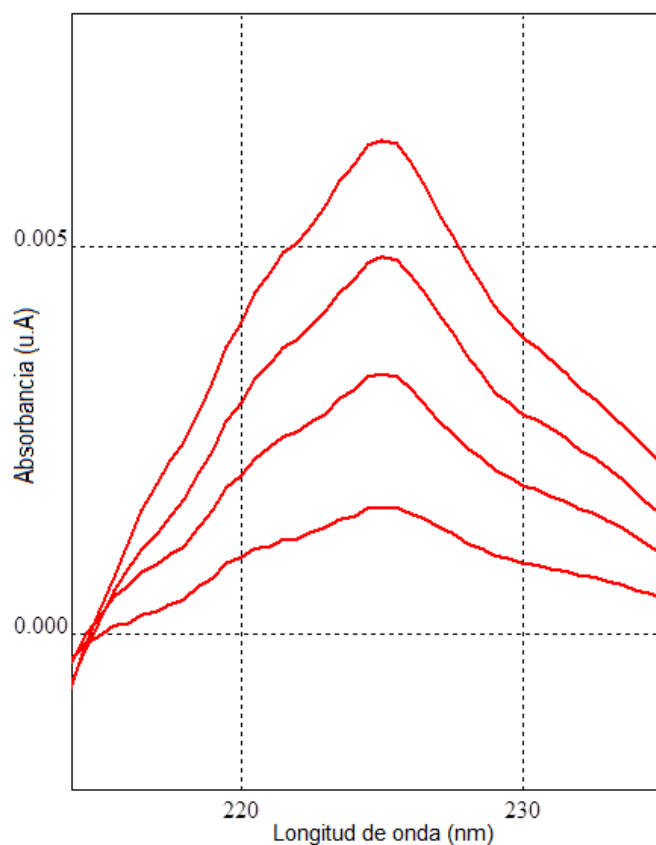
<sup>21</sup> W. G. Crumpton, T. M. Isenhardt y P. D. Mitchell, *Nitrate and organic N analyses with second-derivate spectroscopy. Limnol. Oceanogr.*, **1992**, 37 (4), 907-913.

En la Figura 17 se muestran los espectros de absorción de los patrones empleados, donde se observa un buen solapamiento de los espectros para las diferentes concentraciones.



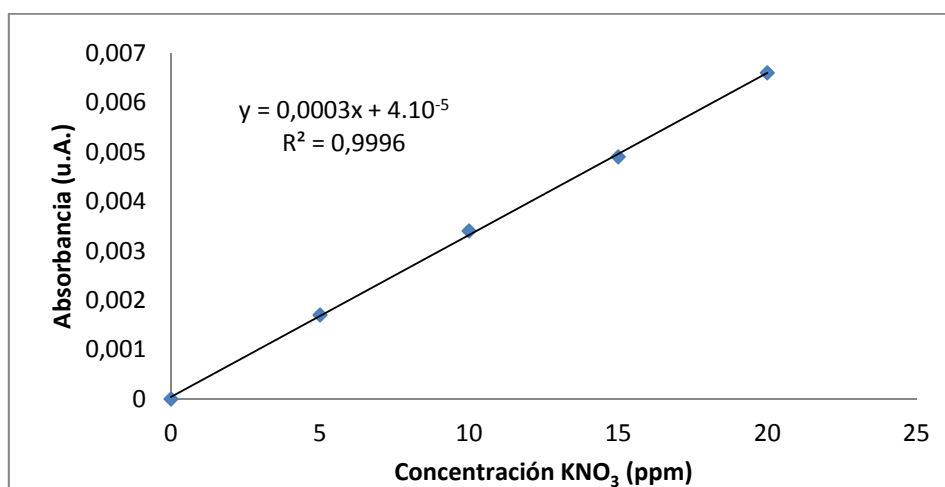
**Figura 17.** Espectros de absorción de las disoluciones patrón de KNO<sub>3</sub> de 5,00 a 20,00 mg/L.

Se aplica la segunda derivada a los espectros registrados, obteniendo un espectro mucho más complejo que presenta numerosos picos positivos y negativos que dificultan la selección de longitud de onda. Se opta por el criterio de seleccionar el segundo pico positivo del espectro de la segunda derivada. El perfil obtenido de dicho pico es el que se muestra en la Figura 18.



**Figura 18.** Segunda derivada de los espectros de absorción de las disoluciones patrón de  $\text{KNO}_3$  de 5,00 a 20,00 mg/L.

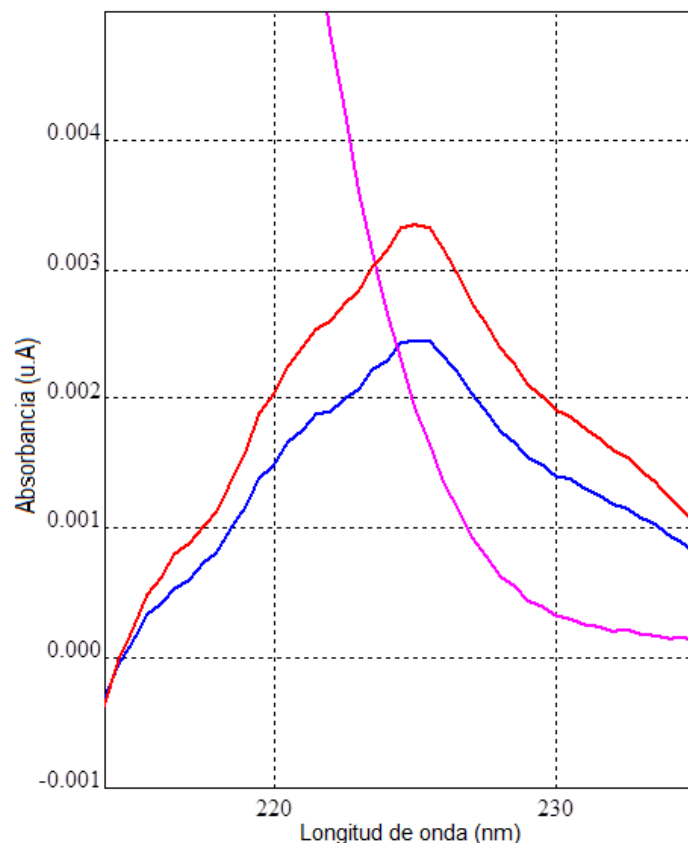
Se observa un buen solapamiento de los patrones, presentando todos ellos el máximo a 225,5 nm. Se registra la señal a esa longitud de onda y se construye la recta de calibrado, que se muestra en la Figura 19.



**Figura 19.** Recta de calibrado obtenida para la determinación de  $\text{KNO}_3$  a partir de los valores de la segunda derivada de los espectros de absorción.

Se observa una buena linealidad entre la concentración de nitrato potásico y la amplitud del pico de la segunda derivada en el rango establecido.

Se midieron también muestras del acuario de agua dulce y del acuario de agua salada y tras aplicar la segunda derivada se observa que las muestras de agua dulce (azul) presentan el mismo perfil que el de los patrones, pero no ocurre lo mismo con las muestras de agua salada (en lila). Dichos espectros se muestran en la Figura 20.



**Figura 20.** Segunda derivada de los espectros de absorción de la disolución patrón de 10 mg/L (en rojo), de la muestra del acuario de agua dulce (en azul) y de la muestra del acuario de agua salada (en lila).

Los espectros de las muestras de agua salada, tanto a los que se les ha aplicado la segunda derivada como a los que no, no muestran el mismo perfil que los patrones probablemente debido a interferencias de la matriz. Debido a esto, no se puede cuantificar de forma fiable el contenido en nitrato en el acuario de agua salada.

## 5.5. Determinación de Iones Potasio

Para la determinación de potasio en agua existe una amplia variedad de técnicas instrumentales, entre las que se encuentra la absorción atómica por llama, el electrodo selectivo y la espectroscopia de emisión atómica de plasma con acoplamiento inductivo entre otras.

Para este trabajo se ha seleccionado la espectroscopia de emisión atómica por llama por ser una técnica sencilla con una alta especificidad y sensibilidad, además de ser uno de los métodos oficiales para análisis de potasio en aguas naturales. Con este método se puede determinar el contenido de potasio en agua por medida directa ya que presenta una banda de emisión a 766,5 nm.

Se prepararon las siguientes disoluciones:

- Disolución patrón de  $K^+$  de 100 ppm: se toma 1 mL de la disolución patrón de 1000 ppm (patrón comercial) y se llevan a 10 mL con agua ultrapura en un matraz aforado de 10 mL. Esta disolución se prepara cada análisis.
- Disolución de óxido de lantano ( $La_2O_3$ ) al 5%: se pesan 5,90 g del óxido y se disuelven en 25 mL de HCl concentrado hasta total disolución y se diluye a 100 mL con agua ultrapura.

En este método se ha de tener en cuenta las posibles interferencias químicas originadas por la formación de óxidos estables a partir de los productos de la combustión de la llama y los átomos formados en la misma. Para minimizar este riesgo se adiciona óxido de lantano que actúa como elemento "buffer" formando con los productos de la combustión un compuesto más estable que el que se formaría con el potasio<sup>22</sup>.

Para poder determinar la concentración de potasio en las muestras de agua del acuario se prepara una serie de disoluciones patrón desde 0,50 a 3,00 mg/L. Para ello, en matraces aforados de 25 mL se pipetea el volumen necesario de patrón de potasio de 100 mg/L y se adiciona el volumen requerido de la disolución de  $La_2O_3$  al 5% de tal forma que en la disolución final se encuentre en una concentración del 0,1%.

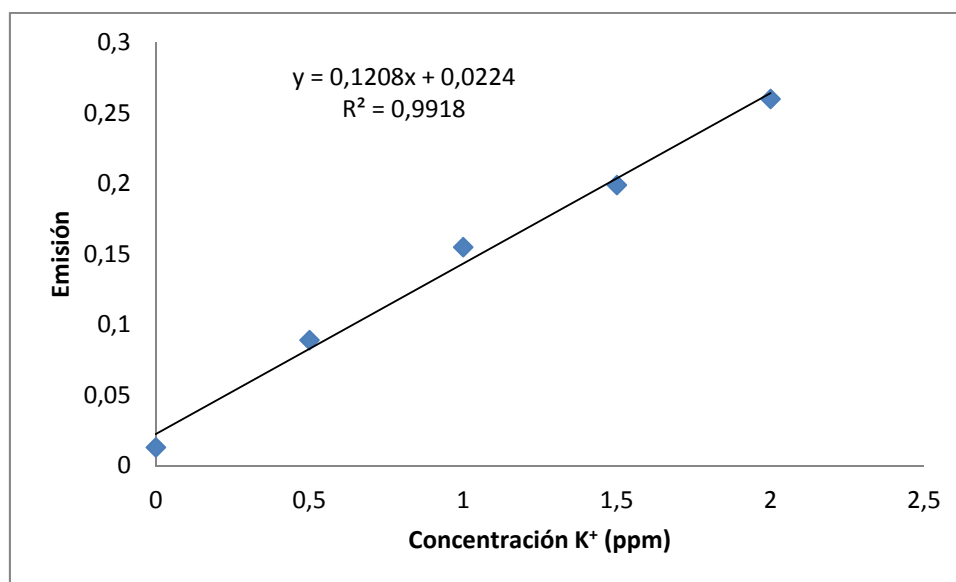
---

<sup>22</sup> W. F. Pickering, *Química analítica moderna*. Reverte, 1980.

En el espectrofotómetro de emisión atómica de llama se optimizaron con el patrón más concentrado los distintos parámetros que se muestran a continuación, ajustando la ganancia a 70 y obteniendo la máxima señal:

- Relación flujos rotámetro: combustible (acetileno)/comburente (aire), 20/50.
- Longitud de onda: 766,2 nm.
- Posición del mechero: ajuste vertical, lateral y horizontal.
- Caudal de aspiración: 3,2 mL/min.

Una vez hecho esto se registran los valores de emisión a 766,2 nm de los diferentes patrones preparados obteniéndose la recta de calibrado de la Figura 21, en donde se observa una buena linealidad.



**Figura 21.** Recta de calibrado obtenida para la determinación de K<sup>+</sup>.

A continuación se analiza una muestra del agua del acuario cinco veces diluida, observándose un cambio de color (naranja) debido al contenido en iones sodio, lo que podría constituir una interferencia espectral si el sodio se encuentra en una proporción de 5:1 con respecto al potasio.

No se ha determinado el contenido de potasio en agua del acuario de agua salada ya que al tratarse de agua salada el contenido en potasio es muy alto y las posibles variaciones a lo largo del estudio serían despreciables.

## 6. RESULTADOS

El objetivo de los diferentes ensayos realizados en el acuario de agua dulce a lo largo de este trabajo es comprobar si el sistema biológico en estudio consume el nutriente inorgánico adicionado y cómo se ve afectado ese consumo modificando determinadas variables del sistema, siendo éstas el fotoperiodo y el pH del mismo.

Se ha partido de unas condiciones iniciales de la relación de nutrientes NPK de 40:1:45. A lo largo de los ensayos realizados se alcanzó un máximo para el fosfato de 1,76 ppm y una relación de nutrientes de 9:1:10, la cual se aproxima a la relación óptima ya citada (10:1:15).

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada ensayo realizado.

### 6.1. Adición de nutrientes

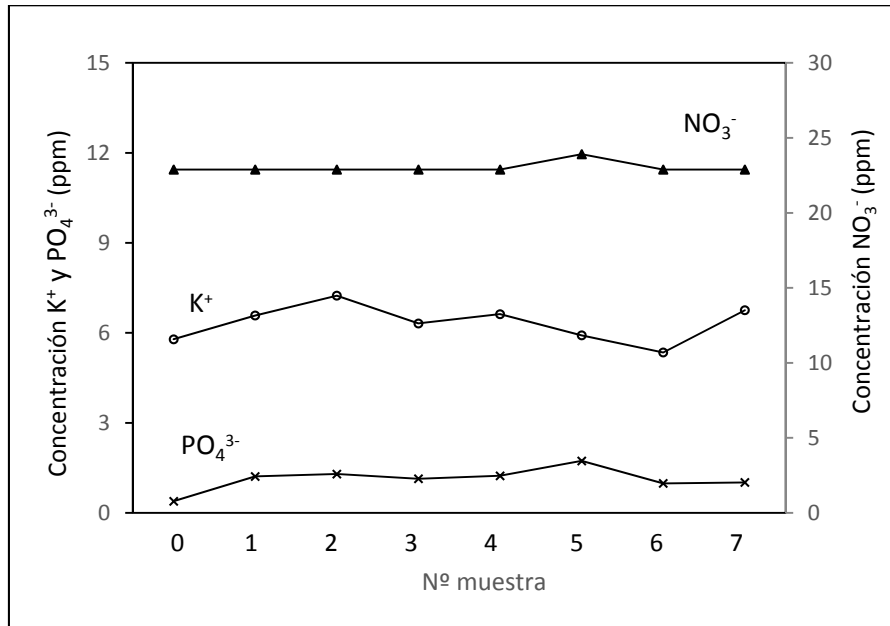
En primer lugar se estudió el comportamiento del sistema al añadir una cierta cantidad de  $K_2HPO_4$  como nutriente inorgánico. Estos ensayos se iniciaron por la tarde con luz intensa (4 h) y se continuaron a la mañana siguiente con aplicación de luz tenue (4 h). Se mantuvo constante el pH a  $7,30 \pm 0,05$ .

En la Figura 22 se muestran los contenidos de iones fosfato, potasio y nitrato presentes en el acuario inicialmente (muestra 0) así como después de añadir 100 mg de la sal. Se observa como dicha sal provoca un aumento en la concentración de fosfatos de 0,39 a 1,29 ppm, y de potasio de 5,78 a 7,24 ppm. En las muestras tomadas al día siguiente (muestras 5, 6 y 7) se aprecia un ligero descenso de la concentración de ambos iones que puede deberse a que la luz de alta intensidad a la que está sometida el acuario en ese periodo provoque un mayor consumo de nutrientes. Con relación a los iones nitrato, no se aprecian variaciones significativas a lo largo del día manteniéndose en torno a 22,90 ppm.

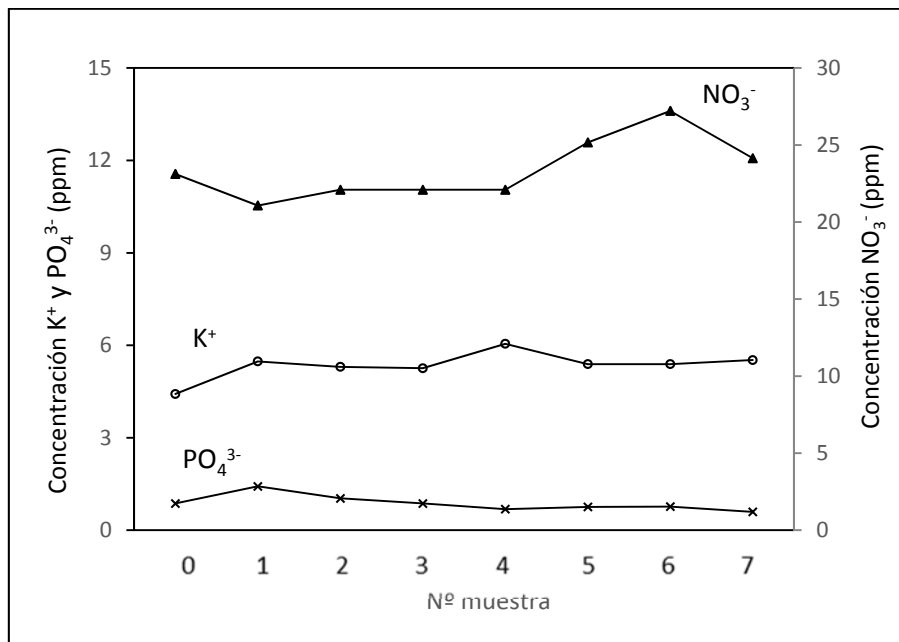
A la semana siguiente se repite este estudio pero ampliándolo a lo largo de 4 días (Figura 23). Se observa nuevamente el aumento de iones fosfato y potasio después de la adición de la sal así como también se comprueba el consumo continuo del nutriente limitante de la producción primaria del sistema (en este caso fosfato) a lo largo de los días. Se alcanza un consumo final en torno al 50% del fosfato inicial en el agua del

acuario, mientras que el potasio, al hallarse en exceso su concentración, permanece prácticamente constante.

Para el nitrato se observa claramente en la Figura 23 una disminución inicial de su contenido al incrementarse la concentración de fosfato y potasio. A medida que se consume el fosfato, se registró un aumento de nitrato en el agua.



**Figura 22.** Evolución diaria del contenido de los macronutrientes estudiados con 4 horas de luz tenue y 4 horas de luz intensa diarias; pH fijado a  $7,30 \pm 0,05$ .



**Figura 23.** Evolución semanal del contenido de los macronutrientes estudiados con 4 horas de luz tenue y 4 horas de luz intensa diarias; pH fijado a  $7,30 \pm 0,05$ .

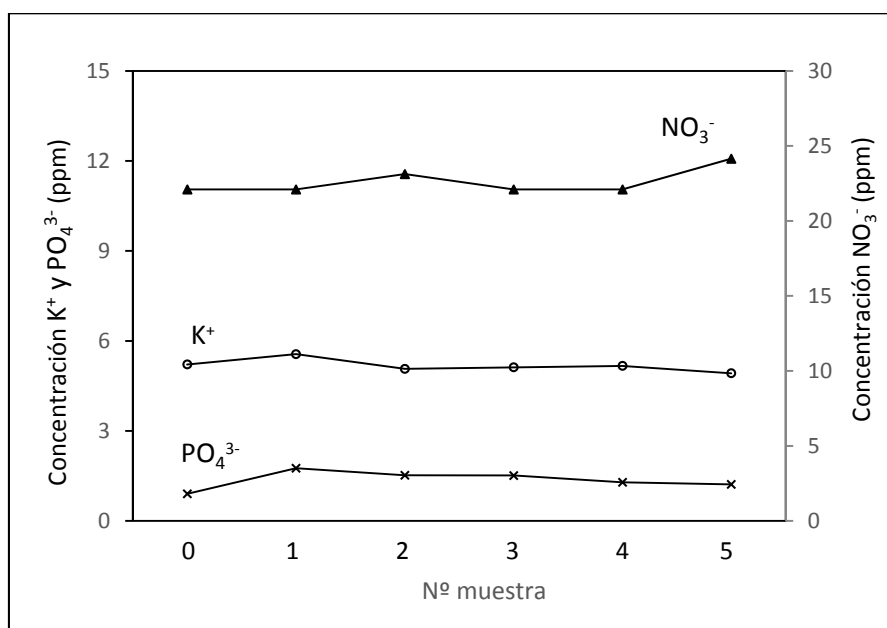


## 6.2. Adición de nutrientes y variación del fotoperiodo

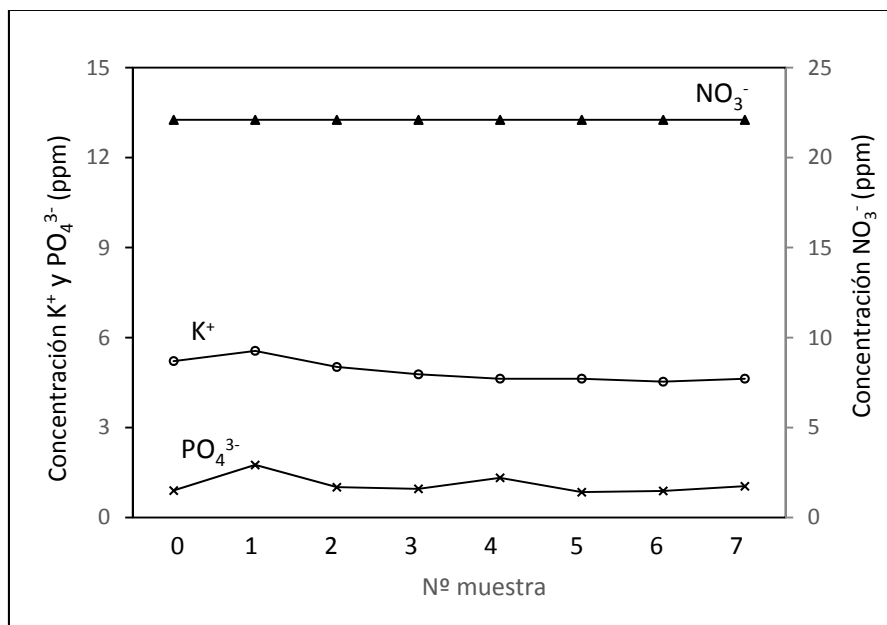
Los ensayos realizados inicialmente diferenciaban un ciclo de luz tenue por la mañana y otro de luz intensa por la tarde, por lo que se lleva a cabo la modificación del fotoperiodo para ver su influencia en el comportamiento del sistema. De esta forma se aplica durante todo el día una intensidad lumínica alta al acuario.

En la Figura 24 se muestra la evolución a lo largo del primer día de estudio de los niveles de fosfato, potasio y nitrato. Se observa el incremento inicial de fosfato y potasio como consecuencia de la sal adicionada, y al cabo de dos horas ambos contenidos van disminuyendo ligeramente constatando su consumo continuo por parte del sistema al tener lugar una mayor actividad fotosintética en estas condiciones. Para el nitrato se vuelve a apreciar una tendencia a aumentar a medida que se consumen los otros nutrientes considerados. Sin embargo, cuando se amplía el periodo de estudio a lo largo de 4 días no se aprecian variaciones significativas para el nitrato.

Se estimó el consumo final de fosfato en torno al 50% y para el potasio en un 15%.



**Figura 24.** Evolución diaria del contenido de macronutrientes estudiados con 8 horas de luz intensa diarias y pH fijado a  $7,30 \pm 0,05$ .



**Figura 25.** Evolución semanal del contenido de macronutrientes estudiados con 8 horas de luz intensa diarias y pH fijado a  $7,30 \pm 0,05$ .

### 6.3. Adición de nutrientes y variación del pH

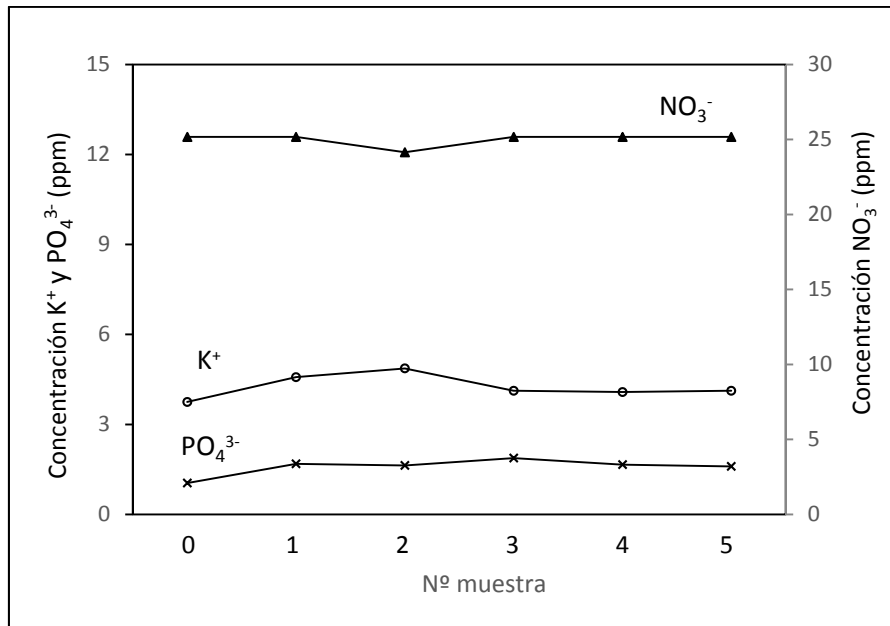
El pH óptimo de un acuario de agua dulce está entre 7 y 8 unidades, por lo que sólo se podrán estudiar pequeñas variaciones en este intervalo. Para su ajuste, se controla mediante la inyección de CO<sub>2</sub> en el sistema. En los experimentos anteriores el sistema de inyección de CO<sub>2</sub> del acuario estaba programado para mantener el agua a un pH de  $7,30 \pm 0,05$ .

Para evaluar la influencia del pH en el consumo de los nutrientes considerados, se incrementa el flujo de gas hasta fijar un pH de  $7,00 \pm 0,05$ . Se mantuvo el fotoperiodo de 8 horas con alta intensidad lumínica.

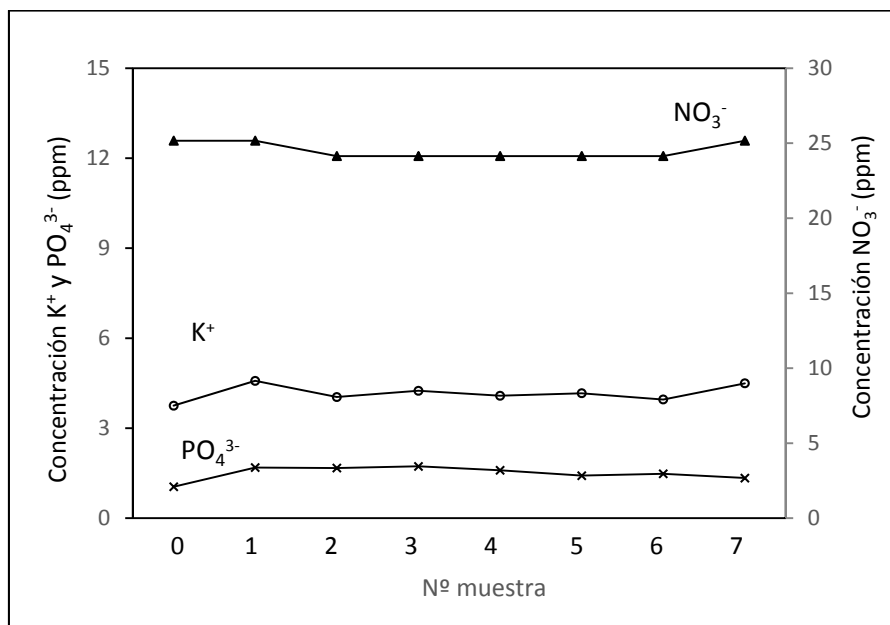
Como en todos los ensayos, se realiza la toma de muestra de agua antes de la adición de la sal y a lo largo de las horas siguientes, durante 4 días. En la Figura 26 se muestran los contenidos de los tres macronutrientes durante el primer día. Se ve de nuevo el aumento de iones fosfato y potasio como consecuencia de la adición de sal, sin embargo, sus concentraciones tardan más tiempo en empezar a disminuir. Es decir, el sistema no consume estos nutrientes adicionados en las primeras horas después de su adición. Después de aproximadamente 6 horas se observa un ligero descenso. La misma pauta se observa en la gráfica para la evolución semanal (Figura 27).

Al calcular el consumo total de nutrientes se obtiene un 21% para el fosfato y un 14% para el potasio. Si lo comparamos con las condiciones anteriores, el comportamiento para el potasio es similar pero el consumo de fosfato se redujo a más de la mitad al disminuir el pH en 0,3 unidades.

En la Figura 27 también se aprecia que los niveles de nitrato permanecen prácticamente constantes a lo largo de estos ensayos, en torno a 24,52 ppm.



**Figura 26.** Evolución diaria del contenido de macronutrientes estudiados con 8 horas de luz intensa diarias y pH fijado a  $7,00 \pm 0,05$ .



**Figura 27.** Evolución semanal del contenido de macronutrientes estudiados con 8 horas de luz intensa diarias y pH fijado a  $7,00 \pm 0,05$ .

#### **6.4. Acuario de agua salada**

Paralelo a los ensayos realizados con el acuario de agua dulce se ha iniciado el estudio de un acuario de agua salada desde su puesta en marcha. Con respecto a los iones potasio, no se considera su análisis en este tipo de agua debido a que es un componente mayoritario de la misma no siendo significativas pequeñas variaciones que se pudiesen producir en el sistema. Se investigó la determinación espectrofotométrica de los iones nitrato, la cual no fue viable en las condiciones optimizadas para el acuario de agua dulce debido a las interferencias provocadas por la matriz del agua salada.

Para la determinación de los iones fosfato se evaluó el método espectrofotométrico empleado para las muestras de agua dulce y se comprobó su viabilidad, dada la ausencia de efecto matriz. No obstante, el límite de detección de este método (0,61 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L) no fue suficiente para detectar los niveles presentes en el acuario de agua salada. Por lo que será necesario buscar métodos alternativos que permitan bajar dichos límites a los niveles de fosfato disuelto referenciados para agua de mar (3.10<sup>-4</sup>-0,12 mg/L<sup>23</sup>).

---

<sup>23</sup> G. N. Baturin. *Phosphorites on the sea floor: origin, composition and distribution*. Elsevier, **1981**, 33, 5-50.

## 7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el estudio del sistema de agua dulce se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Se ha observado que al adicionarle al sistema una sal que contiene fosfato y potasio ( $K_2HPO_4$ ), incrementando sus contenidos iniciales hasta niveles próximos a los óptimos de la relación NPK, se produce una disminución de la concentración del otro nutriente, el nitrato. A medida que se consumen los nutrientes adicionados se comprobó en la mayoría de los ensayos, un incremento final del contenido en nitrato en el agua del acuario. Esto muestra la interconexión de los ciclos biogeoquímicos.
- Con una intensidad lumínica baja solo se observó consumo de fosfato (aproximadamente del 50%). Al incrementar la intensidad lumínica aplicada al sistema, se mantuvo el mismo consumo de fosfato y para el potasio se estimó en un 16%.
- Al disminuir el pH aplicando una intensidad lumínica alta, se observó una notable disminución del consumo de fosfato (21%) mientras que el consumo de potasio no se vio alterado.
- En todos los ensayos se ha observado que el nutriente que ha experimentado un mayor consumo ha sido el fosfato, que se comporta como nutriente limitante.
- El menor consumo de fosfatos al disminuir el pH del agua puede deberse a una menor actividad de la enzima rubisco, implicada en el ciclo de Calvin, actividad que disminuye al descender el pH. Esto provocaría una menor actividad fotosintética y un menor consumo de nutrientes, lo cual están en concordancia con los resultados experimentales.

Con relación al sistema de agua salada, se inició su estudio evaluando la viabilidad de la metodología empleada para el seguimiento del acuario de agua dulce. Solo fue posible aplicar el método para el fosfato, si bien los niveles en las muestras fueron inferiores al límite de detección. La complejidad de la matriz de agua salada requerirá futuros estudios para la optimización de los métodos analíticos de determinación de los nutrientes de interés.

## **CONCLUSIONS**

The following conclusions can be drawn from the results obtained for the freshwater system:

- When the initial concentrations of potassium and phosphate increase by adding a salt ( $K_2HPO_4$ ), in around the optimum NKP relation, a diminution of the nitrate content was observed. In most assays, as the added nutrients consumed, the final nitrate content increased. This shows the interconnection of biogeochemical cycles.
- With a low luminous intensity, the system only consumed phosphate (aprox. 50%). When this intensity was increased, the phosphate consumption was constant and for the potassium was estimated on 16%.
- Applying a high luminous intensity and with a low pH value, the phosphate consumption decreased (to 21%) whereas for potassium no changes were registered.
- En todos los ensayos se ha observado que el nutriente que ha experimentado un mayor consumo ha sido el fosfato, que se comporta como nutriente limitante.
- The phosphate was revealed as the limitant nutrient in all assays.
- The low phosphate consumption when the system presents inferior pH values can be due to the diminution of the rubisco enzyme activity (implied in the Calvin Cycle), this activity decreases when pH is less. This can cause a reduction of the photosynthetic activity as well as of the nutrients consumption, in accordance with the experimental results.

Finally, it was initiated the study of a seawater system. The viability of the analytical methodology previously established for fresh water analysis was evaluated. It was only possible to apply the method for phosphate although the contents on samples were lower than the detection limit. The seawater matrix requires the optimization of the analytical methods to achieve a reliable determination of the nutrients.

## CONCLUSIONES

Dos resultados obtidos no estudo do sistema de auga doce pódense establecer as seguintes conclusións:

- Observouse que ao engadirle ao sistema unha sal que contén fosfato e potasio ( $K_2HPO_4$ ), incrementando os seus contidos iniciais ata niveis próximos aos óptimos da relación NPK, obtívose unha diminución da concentración doutro nutriente, o nitrato. A medida que se consumen os nutrientes engadidos comprobouse na maioría dos ensaios, un incremento final do contido en nitrato na auga do acuario. Isto amosa a interconexión dos ciclos bioxeoquímicos.
- Cunha intensidade lumínica baixa observouse so consumo de fosfato (aproximadamente do 50%). Ao incrementar a intensidade lumínica, mantívose o mesmo consumo de fosfato e para o potasio estimouse nun 16%.
- Ao diminuir o pH, aplicando unha intensidade lumínica alta, obtívose unha notable diminución do consumo de fosfato (21%) mentras que o consumo de potasio non se veu alterado.
- En todos os ensaios observouse que o nutriente que experimentou o maior consumo foi o fosfato, comportándose como nutriente limitante.
- O menor consumo de fosfato ao diminuir o pH da auga pode deberse a unha menor actividade do enzima rubisco, implicada no ciclo de Calvin, actividade que diminúe ao descender o pH. Isto provocaría unha menor actividade fotosintética e un menor consumo de nutrientes, o cal estaría dacordo cos resultados experimentais.

Finalmente, iniciouse o estudo dun sistema de auga salgada avaliando a viabilidade da metodoloxía empregada para o seguimento do acuario de auga doce. So foi posible empregar o método de análise do fosfato, aínda que os niveis nas mostras estiveron por debaixo do límite de detección. A complexidade da mostra de auga salgada require futuros estudos para a optimización dos métodos analíticos de determinación dos nutrientes de interese.