

Determinación de variables fisicoquímicas en
cultivo sumergido de *Aspergillus niger*:
Una experiencia integradora
en el Laboratorio Analítico.

Goicoechea H.*; Miglieta H.**;
Mantovani V.*; López Cortés, M.***;
Fernández, J.**** y
Cátedra de Química Analítica General*****

Resumen:

Con motivo de comenzar sus actividades de cursado de la asignatura Química Analítica General los alumnos de la nueva carrera de Licenciatura en Biotecnología, y con el fin de lograr que los mismos proyecten una visión global de los alcances de los conocimientos adquiridos en el aprendizaje de los pasos del denominado Proceso Analítico General, se propuso iniciar una experiencia que permitiera no sólo perfeccionar las habilidades psicomotrices desarrolladas en el laboratorio, sino también aplicar la capacidad adquirida sobre criterios de elección y puesta a punto de metodologías analíticas.

-
- * Cátedra Química Analítica General.
 - ** CIEN (Centro de Inv. de Endemias Nacionales) - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.
 - *** Pasante en el CIEN.
 - **** Becario.
 - ***** Docentes de Química Analítica General que participaron y colaboraron directamente en la experiencia: M.I. Pividori, M. Yossen, S. Fabiano, S. Hernández, R. Pérez del Viso, J. Barrandeguy, S. Acebal, M. De Zan, B. Rodil, J.C. Robles, M.S. Cámara..

Se eligió como sistema el cultivo sumergido del hongo filamentoso *Aspergillus niger*. Se prepararon medios de cultivo líquido en dos composiciones diferentes y se repartieron en doce frascos. Sembrados con los inóculos del hongo, se hicieron determinaciones de sustrato, producto y biomasa sobre muestras alícuotas tomadas cada doce horas durante 168 horas. Participaron de la experiencia 76 alumnos que constituyeron cinco grupos de trabajo.

Durante el desarrollo de las actividades los alumnos se motivaron, ya que pudieron trabajar en una experiencia que los acercó a la realidad concreta de la profesión elegida. Para alcanzar los objetivos, muchos alumnos incrementaron su carga horaria voluntariamente, produciendo una actividad integradora que permitió la transferencia de las experiencias de un grupo a otro. Dada la complejidad del sistema, algunos grupos no alcanzaron a realizar todas las determinaciones propuestas, pero en otros se alcanzó a aplicar dos metodologías analíticas distintas.

Se concluye que implementar este tipo de experiencias, permite una participación más decidida del alumno en la problemática analítica; permitiendo además poner en evidencia que los grupos de trabajo muestran distintas dinámicas y dificultades para integrarse. Se tiene con este tipo de experiencias la posibilidad de mejorar el proceso de enseñanza-aprendizaje en el laboratorio analítico.

Introducción

Este trabajo es el resultado de una interacción entre la Cátedra de Química Analítica General y el CIEN, originado en seminarios desarrollados por la cátedra, con motivo de comenzar sus actividades de cursado regular los alumnos de la nueva carrera de Licenciatura en Biotecnología.

Fue propuesto a los alumnos que cursaban la asignatura en el primer cuatrimestre de 1996; los estudiantes de bioquímica se mostraron interesados y solicitaron participar.

Por un lado, como experiencia pedagógica, contiene una serie de principios pedagógicos que podrían resumirse en los siguientes: referida al aprendizaje de los alumnos, se propone un aprendizaje que se orienta a la construcción de significados y al aprendizaje independiente, es decir, que entienda las tareas que debe realizar y regule su propio aprendizaje. Se busca de esta manera, que el alumno sea un sujeto activo, estratégico,

planificador y constructivo en la vinculación de la información nueva con los conocimientos previos.

Por otra parte, desde el punto de vista de la enseñanza de la Química Analítica, se buscó recorrer todos los pasos del Proceso Analítico General: toma de muestra, preparación de la muestra, separación, mediciones determinativas, expresión de los resultados-control de calidad del resultado analítico- interpretación de los resultados e informe. Además, se presentan aspectos que se desarrollarán en etapas más avanzadas de la carrera, con el fin de transmitirles una idea de las aplicaciones concretas de los conocimientos brindados por la asignatura Química Analítica General, y que ésta —como todas— no es una isla en el contexto de la carrera.

En el laboratorio analítico, hasta el momento de esta experiencia, los alumnos han realizado sus trabajos orientados a obtener un aprendizaje de habilidades psicomotrices, a adquirir criterios de elección y aplicabilidad de la metodología analítica, presentación del tema que se está desarrollando en ese momento y trabajando sobre muestras preparadas por los docentes y/o sobre muestras simples reales.

Se trabajó con un cultivo sumergido del hongo *Aspergillus niger* (que en estas condiciones produce ácido cítrico). Sobre ese cultivo, los alumnos realizaron la toma y preparación de la muestra y midieron: masa seca después de la separación por filtración sobre papel cuantitativo; pH, acidez titulable (valoración del ácido cítrico producido), azúcares reductores y nitrógeno amónico sobre el filtrado.

Metodología

1. Proceso Biotecnológico: La experiencia se llevó a cabo en los laboratorios de la Cátedra de Química Analítica General y del CIEN (Centro de Investigaciones de Endemias Nacionales). En primer término se sembraron 6 erlenmeyers de 250 ml, que contenían aproximadamente 130 ml cada uno de un medio de cultivo líquido, denominado medio de

cultivo 1, cuya composición se indica más abajo. Se repitió lo mismo para el medio de cultivo 2. Los erlenmeyers conteniendo los medios de cultivo se agruparon de a pares, conformándose tres pares para cada medio.

Medio 1		Medio 2	
Sacarosa	100 g	Sacarosa	100 g
Cloruro de Amonio	1.1 g	Cloruro de Amonio	2.2 g
KH ₂ PO ₄	0.61 g	KH ₂ PO ₄	0.61 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.35 g	MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.35 g
ZnSO ₄ . H ₂ O	32 mg	ZnSO ₄ . H ₂ O	32 mg
Fe ₂ (SO ₄) ₃	5 mg	Fe ₂ (SO ₄) ₃	5 mg
Agua c.s.p.	1000 ml	Agua c.s.p.	1000 ml

Los erlenmeyers, con los inóculos del hongo, se sometieron a agitación rotativa a 100 rpm durante 7 días. En este tiempo se realizaron las tomas de muestra para medir las distintas variables. Esta etapa se efectuó en el CIEN, en sala termostatzada a 28° C.

2. Toma de muestra: Para este fin se constituyeron diez grupos de trabajo, en los que se distribuyó la totalidad de los alumnos que cursaron la asignatura en el primer cuatrimestre de 1996 (76 alumnos). A cada grupo se le asignó un horario de toma de muestra, al que concurrieron munidos de sus elementos de bioseguridad. Se realizaron las tomas de muestra cada 12 horas los primeros tres días y luego cada 24 horas, reuniéndose en total 10 muestras en los distintos tiempos para cada medio de cultivo..

Luego de una explicación sobre la técnica de muestreo, los alumnos procedieron a retirar de cada erlenmeyer con cultivo, 3 ml de muestra, que se dispensaron en tubos plásticos. Por lo tanto, en el muestreo se recogieron seis tubos, que contenían 6 ml de medio de cultivo (3 ml de cada erlenmeyer del par). Los pares fueron numerados del 1 al 6, siendo éstos los números que correspondieron a cada turno de trabajo práctico

(cinco en total); el número seis es el control que llevaron los docentes. De esta manera se tuvo al final diez tubos (muestras). En la tabla N° 1 se resume el proceso de muestreo.

Tabla N° 1: Disposición y cantidad en ml del muestreo.

pares/grupos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	medic 1
2	2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
3	3	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	medic 2
4	4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	

tiempo de incubación, horas.

		12		24		36		48		60		72		96		120		144		168
--	--	----	--	----	--	----	--	----	--	----	--	----	--	----	--	-----	--	-----	--	-----

3. Procedimiento seguido luego del muestreo: Inmediatamente después del muestreo, se procedió a filtrar el contenido de los tubos sobre papel tarado. Los filtrados se conservaron a -20°C hasta el momento del análisis.

4. Mediciones realizadas: La primera medición consistió en pesar, con el fin de determinar la masa de hongo producida hasta el momento de la toma de muestra. Para tal fin, los residuos de la filtración se secaron a 80°C hasta pesada constante.

La determinación de azúcares reductores y nitrógeno amónico permitió conocer la evolución del consumo de nutrientes y la acidez titulable, la cinética de la producción de ácido cítrico.

Para llevar a cabo esta etapa, los alumnos consultaron en la bibliografía las distintas metodologías, y luego realizaron un estudio sobre la factibilidad de aplicar las mismas a las muestras a analizar. Debieron preparar los reactivos y poner a punto las metodologías analíticas a aplicar.

Contaron con muestras controles y con datos de mediciones realizadas, utilizando otras técnicas de confiabilidad probada. Este criterio facilita aplicar técnicas estadísticas que permiten conocer la imprecisión y la inexactitud de la metodología por ellos puesta a punto.

Para efectuar los análisis, procedieron a descongelar las muestras y a determinar las variables establecidas, luego de lo cual redactaron los informes con los resultados obtenidos.

Técnicas:

- a) Acidez Titulable: se realizó sobre 1 ml del filtrado, agregando 20-30 ml de agua destilada y fenolftaleína como indicador. Se tituló con NaOH 0,1 mol/L valorad
- b) Azúcares Reductores: por el método de Felhing Causse-Bonnans [F.C.B.].)
- c) Nitrógeno Amónico: Se utilizó el método de Kjeldhal.
- d) pH: se utilizó pHmetro, con electrodos combinado.

Resultados

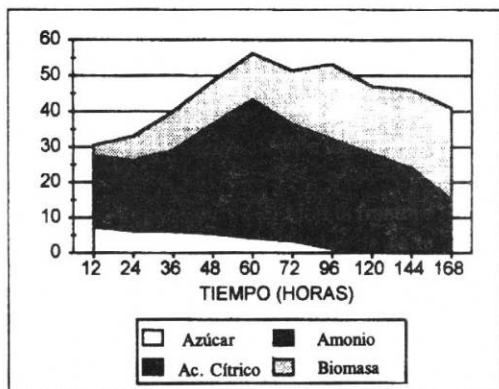
Tabla 2: Evolución de valores de sustrato, fuente de nitrógeno, producto y biomasa para los tubos 1, 2 y 3 (medio de cultivo número 1) (promedios).

Tiempo (horas)	Glucosa (g/l)	Cloruro de amonio (g/l)	Ac. Cítrico (g/l)	pH	Biomasa (g/l)
12		0.88	0.21	3.2	2.69
24		0.79	0.25	3.2	10.55
36		0.57	0.65	3.0	8.43
48		0.32	1.44	2.8	9.07
60		0.16	1.99	2.8	15.43
72		0.18	2.12	2.7	17.68
96		0.11	3.58	2.6	21.35
120		0.09	3.02	2.6	16.08
144		0.07	2.08	2.7	20.63
168		0.05	1.52	2.8	14.27

Tabla 3: Evolución de valores de sustrato, fuente de nitrógeno, producto y biomasa para los tubos 4, 5 y 6 (medio de cultivo número 2) (promedios).

Tiempo (horas)	Glucosa (g/l)	Cloruro de amonio (g/l)	Ac. Cítrico (g/l)	pH	Biomasa (g/l)
12	74	1.84	0.25	3.2	3.03
24	62	1.67	0.28	3.0	7.55
36	60	1.59	0.68	2.7	11.88
48	55	1.46	1.63	2.7	11.11
60	42	1.55	2.43	2.8	13.62
72	35	1.29	2.00	2.8	14.70
96	12	1.16	2.00	2.8	20.88
120		0.85	2.00	2.8	19.25
144		0.73	1.71	2.8	21.92
168		0.63	0.86	2.9	25.57

Gráfica 1: Comparación de producción de Biomasa y Acido Cítrico en función del tiempo para el medio de cultivo número 2.



Observaciones durante la experiencia

Durante el desarrollo de las actividades se notó que la mayoría de los alumnos se entusiasmaron con el tipo de trabajo. Muchos mostraron un desconcierto inicial ante el trabajo intensivo, en lo que se refiere a la etapa de estudio de las técnicas, ya que hasta el momento habían tenido bastante facilitado esta tarea teniendo en cuenta la disponibilidad de los módulos de laboratorio de la cátedra, pero una vez orientados por los docentes, pudieron en la mayoría de los casos desarrollar una propuesta de trabajo.

Hubo alumnos que concurren a tres prácticos seguidos para obtener resultados satisfactorios ante dificultades para poner a punto la técnica seleccionada.

Algunos grupos no pudieron analizar todas las muestras, porque no les alcanzó el tiempo disponible (aspecto que analizaremos para las

próximas experiencias); en otros, pudieron terminar todo y hasta aplicaron dos metodologías distintas.

Conclusiones

El hecho de que los alumnos se enfrenten a una situación nueva y compleja en el laboratorio analítico, les permite realizar una autoevaluación de lo aprendido hasta el momento, ya que tienen que aplicar los criterios adquiridos y tomar decisiones entre dos o más opciones de acuerdo a un criterio de valoración, para lo cual fueron entrenados en los «estudios de casos» durante el cursado de Nivel IV de la asignatura.

Está claro que si durante el cursado sólo resuelven problemas simples, no tendrán una visión de la problemática de la química analítica en la que se desenvolverán en el futuro.

En este caso se logró mostrar, en forma integrada, la función de la Química Analítica en un proceso de producción biotecnológico y, además, transmitir el valor, lo difícil y necesario que es, trabajar en forma integrada y en equipo.

Durante el desarrollo de las actividades, se observó que la mayoría de los alumnos se motivaron y entusiasmaron con este trabajo de laboratorio, pero pensamos que su organización tendría que reajustarse con otra disponibilidad de tiempo y un análisis posterior más profundo y comparativo de los resultados obtenidos.

Desde el punto de vista pedagógico, los diversos contenidos conceptuales y procedimentales surgen mutuamente en su integración. Se resalta el saldo positivo de esta experiencia en función del grado de comprensión que logran los alumnos, el que se manifiesta en un trabajo individual y cooperativo, en el aprendizaje de conceptos, procedimientos, participación responsable y toma de decisiones. Por otra parte esta experiencia integradora en el laboratorio reunió las siguientes condiciones para el aprendizaje significativo:

1. relativas al material: organización interna (estructura conceptual explícita); vocabulario y terminología adaptados al alumno;

a2. relativas al alumno: conocimientos previos sobre el tema (en lo conceptual y en lo procedimental) y predisposición favorable hacia la comprensión. En cuanto a la enseñanza por parte del grupo de cátedra: se trata de una propuesta altamente motivadora porque logra integrar distintos tipos de contenidos: los conceptuales, los procedimentales y los actitudinales; la íntima vinculación entre la teoría y la práctica está posibilitada por un enfoque globalizador; la planificación docente promueve una estrategia de aprendizaje integrador, traducida en la participación de un gran número de docentes.

En la última etapa del trabajo recibimos asesoramiento pedagógico de la Prof. Marcela Manuale, responsable del Gabinete Pedagógico de la Facultad, quien se integra al equipo de Cátedra para estos fines.

Por otra parte, se quiere destacar la colaboración que brindaron los alumnos: María Belén Cassera, Mauricio Katz, Fernanda A. Marchesini, Débora Rinaldi y José Schweigkardt; y las alumnas pasantes: Paula Kubescha; Laura Strada; Lucila Satuf y Julieta Ferraro.

Una alumna, M. B. Cassera, realizó la filmación de un video, en el que se ven reflejadas las distintas actividades realizadas por los alumnos en esta experiencia, pudiendo ser consultada en la videoteca de la Cátedra.

Bibliografía usada por el alumno

Barrios M., Martínez R., Miglietta H. « Determinación de la generación de calor y producción de entropía en fermentaciones en sustrato sólido. Aspectos teóricos». (a publicar).

Departamento de Bioingeniería. Facultad de Ingeniería química. UNL. Trabajo Práctico: «Fermentación Cítrica».

Harris D. C. *Análisis Químico Cuantitativo*. Grupo Editorial Iberoamérica. 1992.

Ayres G. H. *Análisis Químico Cuantitativo*. Ed. del Castillo. Madrid. 1970.

Informe de dos estudiantes:

Nuestra experiencia del trabajo especial

Se nos indicó sobre lo que íbamos a trabajar, y a partir de allí cada uno se limitó a investigar las técnicas a nuestro alcance para realizar la determinación. Se debía determinar la cantidad de nitrógeno existente en una muestra biológica al cabo de ciertos períodos de tiempo.

Se propusieron distintos métodos; a partir de las diferentes técnicas decidimos cuál era el más apropiado, basándonos en conceptos como errores que podíamos introducir en la preparación de una mayor o menor cantidad de disoluciones, pasos a desarrollar y del material con el que contábamos en el laboratorio. Se nos dio total libertad al respecto y decidimos de acuerdo a nuestras propias convicciones.

Luego de esta búsqueda teórica, realizamos los cálculos necesarios para determinar las concentraciones de las disoluciones con las que trabajaríamos.

Mas tarde empezamos a realizar algunas determinaciones, a modo de prueba; todo marchaba sin mayores problemas hasta el día en que trabajamos con la muestra real. Al principio la técnica parecía fallar y entonces comenzamos a introducir pequeñas variantes hasta que obtuvimos un resultado positivo. Esto requirió que aplicáramos nuestro incipiente criterio químico.

A continuación enumeramos algunos de los problemas que debimos solucionar: en primer lugar la técnica fallaba porque estaba diseñada para trabajar con una mayor cantidad de amoníaco que la que nosotros pretendíamos determinar, entonces éste no era suficiente para lograr el viraje en el ácido bórico que obraba de receptor; la solución fue trabajar con una ínfima cantidad de ácido bórico y en condiciones muy diluidas de manera tal que la cantidad de amoníaco liberado por la muestra fuera suficiente para lograr el viraje. Otro problema que se nos presentó fue

que el refrigerante era muy largo y que había una gran condensación de vapores con lo cual podía llegar a perderse algo del amoníaco (por su gran tendencia a absorberse en agua); la solución fue adaptar el equipo; en lugar de refrigerante utilizamos una pequeña extensión de una manguera de goma sellando entradas y salidas con tapones de goma, los cuales debimos adaptar, y donde fue necesario aplicamos parafina.

Finalmente las determinaciones no fueron lo suficientemente exactas. Suponemos que la mayor cantidad de error fue introducida durante la toma de muestra, ya que se trató con una innumerable cantidad de operadores, cada uno de los cuales implicó, en mayor o menor grado, su error personal. Además, considerando nuestra limitada experiencia en el trabajo de laboratorio y a pesar de los recaudos tomados, a nuestro entender, el error mayor ocurría cuando introducíamos el NaOH para producir el desprendimiento del amoníaco; como demorábamos un cierto tiempo en tapar el recipiente, es probable que se halla perdido un poco del gas.

Habría sido de gran utilidad que los resultados obtenidos fuesen cuantitativos, pero consideramos que, si bien éstos eran importantes, la mayor relevancia del trabajo recaía sobre nuestra capacidad para resolver los problemas que se presentaron, es decir, el objetivo del trabajo era lograr incentivarlos en la búsqueda de técnicas y en la resolución de problemas a partir de nuestro criterio, actuando con completa libertad de decisión.

Basándonos en esto concluimos que fue muy provechoso como experiencia personal y que es conveniente que esta metodología de trabajo se continúe aplicando a fin de lograr mejores resultados.

José María Schveigkardt
Albana F. Marchesini.