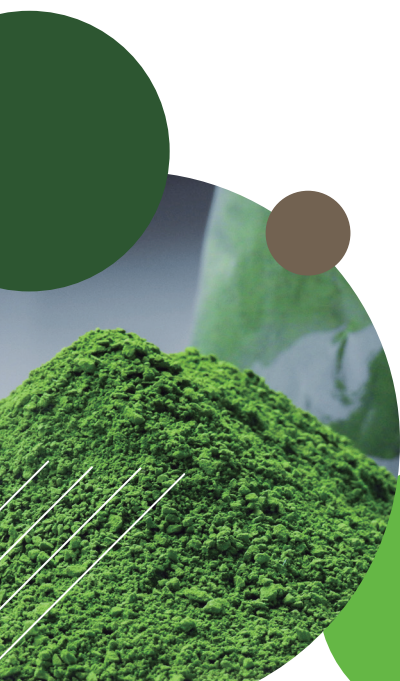
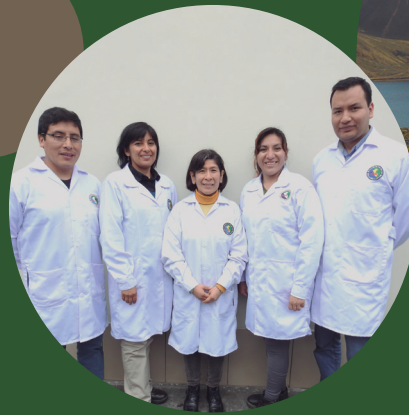


# Instructivo para producción de biomasa microalgal de cepas nativas del género *Desmodesmus* colectadas en zonas altoandinas del Perú

Convenio N° 201-2015-FONDECYT  
Proyecto "Búsqueda, caracterización y cultivo de microalgas  
de zonas alto andinas del Perú potencialmente útiles en la  
industria cosmética"

2018





Instituto del Mar del Perú (Imarpe)  
Esquina Gamarra y General Valle s/n, Callao, Perú  
Teléfono: (511) 208-8650, fax (511) 429-9811  
Correo electrónico: [imarpe@imarpe.gob.pe](mailto:imarpe@imarpe.gob.pe)  
[www.imarpe.gob.pe](http://www.imarpe.gob.pe)

Autores:

Blgo. Alberto Oscanoa Huaynate\*  
MSc. Cecil Tenorio García Blásquez  
Blga. Gheraldine Ynga Huamán  
Qco. Leenin Flores Ramos  
MSc. Carla Aguilar Samanamud

(\*): Contacto: [aoscano@imarpe.gob.pe](mailto:aoscano@imarpe.gob.pe)

Laboratorio de Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos  
Laboratorio de Sala de Microalgas  
Laboratorio de Invernadero y Sala de procesos  
Laboratorio de Análisis Instrumental

Área Funcional de Investigaciones en Acuicultura - AFIA  
Dirección General de Investigaciones en Acuicultura - DGIA

Diseño y diagramación:  
Unidad de Comunicaciones e Imagen Institucional

Setiembre 2018



# PRESENTACIÓN


En las últimas décadas, a nivel mundial, las microalgas han demostrado potencial biotecnológico, generando el desarrollo de cultivos masivos a fin de obtener compuestos de interés. En nuestro país, el Instituto del Mar del Perú - Imarpe, es una de las instituciones pioneras que tiene años de experiencia en el cultivo de microalgas; cuenta con Banco de Germoplasma, Laboratorio de Alimento Vivo, donde se mantienen para la alimentación de los primeros estadios larvales de diferentes organismos acuáticos; además, del Laboratorio de invernadero y Sala de procesos, y el Laboratorio de Análisis instrumental, donde se realiza la producción de biomasa microalgal y la determinación de metabolitos de interés científico, respectivamente.

Los laboratorios mencionados, fueron acondicionados y equipados, desde el 2002 hasta el 2012 por la Asignación Presupuestal que No Resultan en Productos (APNOP); desde el 2013 hasta el 2016 por el Presupuesto por Resultados (PpR) y en los años 2008 y 2013 por el financiamiento de parte del Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT).

Como consecuencia de las experiencias realizadas en los laboratorios señalados, elaboramos el siguiente “Instructivo para la producción de biomasa microalgal de cepas nativas del género *Desmodesmus* colectadas en zonas altoandinas del Perú”, donde se podrá encontrar información con respecto a las técnicas más comunes utilizadas para la producción de microalgas.

Cada proceso está estructurado en secciones que comprenden: objetivo, alcance, los materiales que se requieren, el procedimiento a realizar en forma de instrucciones numeradas y anexos, con instrucciones para expresión de resultados y formatos de llenado de datos, así como las referencias bibliográficas de apoyo.

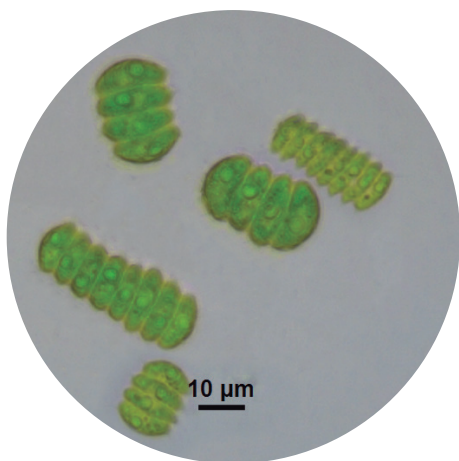
El formato en el que se presenta este documento tiene como referencia la estructura documentaria de los protocolos e instructivos de metodologías de ensayos y muestreos que se vienen aplicando en los laboratorios del Área funcional de Investigaciones en Acuicultura, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, Instituto del Mar del Perú, Perú.



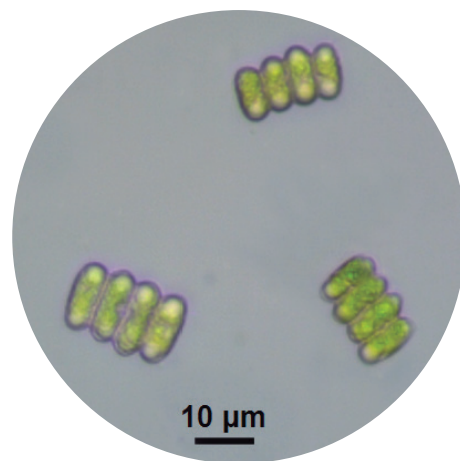
# *Desmodesmus* (Chodat) An, Friedl & Hegewald, 1999

Las microalgas clorofitas del género *Desmodesmus* se encuentran en agua dulce, son cosmopolitas. An *et al.* (1999) empleó la región ITS-2 como marcador molecular que apoyó la separación del género *Scenedesmus*.

Se encuentran agrupadas en colonias de 2, 4, 6 y 8 células dispuestas de lado a lado con células aproximadamente ovoides, (a veces es posible encontrarlas en colonias de hasta 32 células). La mayoría de las especies de este género tienen en las paredes de las células espinas (Hegewald, 2000; Johnson *et al.*, 2007), otra característica de este género es la presencia de ornamentaciones como verrugas y/o rosetas en la pared celular (Hegewald, 1978; An *et al.*, 1999).



*Desmodesmus asymmetricus* (Schröder)  
E. Hegewald



*Desmodesmus armatus* (Chodat)  
E. H. Hegewald






# RESUMEN

Proyecto: “BÚSQUEDA, CARACTERIZACIÓN Y CULTIVO DE MICROALGAS DE ZONAS ALTO ANDINAS DEL PERÚ POTENCIALMENTE ÚTILES EN LA INDUSTRIA COSMÉTICA”

## CONVENIO DE SUBVENCIÓN N° 201-2015-FONDECYT

El objetivo general del proyecto fue identificar microalgas de zonas altoandinas cultivables a mayor escala, cuyos metabolitos fueran potencialmente útiles como materia prima de ingredientes naturales de cosméticos. Los resultados de este proyecto han permitido:

- Evaluar tres (3) zonas altoandinas del Perú (Puno, Ayacucho y Huancavelica), nunca antes estudiadas a nivel ficológico (estudio de microalgas)
  - Fortalecer el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del Imarpe (obteniendo 212 cepas de microalgas altoandinas); ninguna otra entidad tiene este acervo genético nacional.
  - Formar especialistas a nivel de pregrado: un licenciado en Ingeniería Pesquera y una licenciada en Biología.
  - Evaluar los compuestos que la empresa Cosmo Ingredients S.A.C (entidad colaboradora), determinó como favorable para el campo de la cosmética.
- 

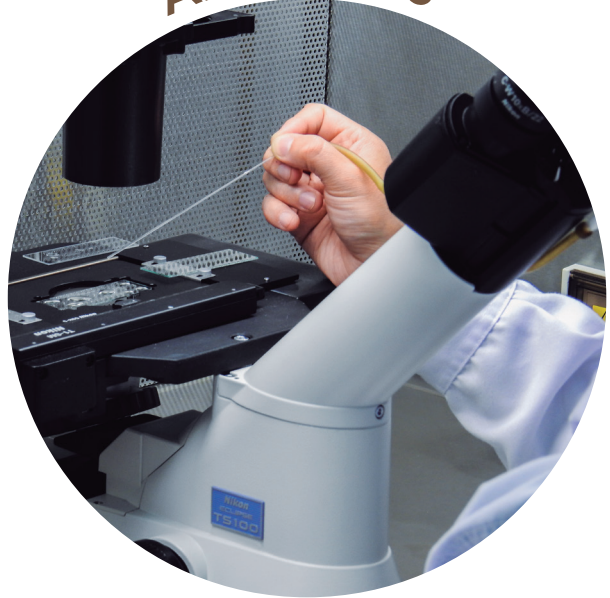


**Aislamiento y  
obtención de  
cepas del género  
*Desmodesmus***

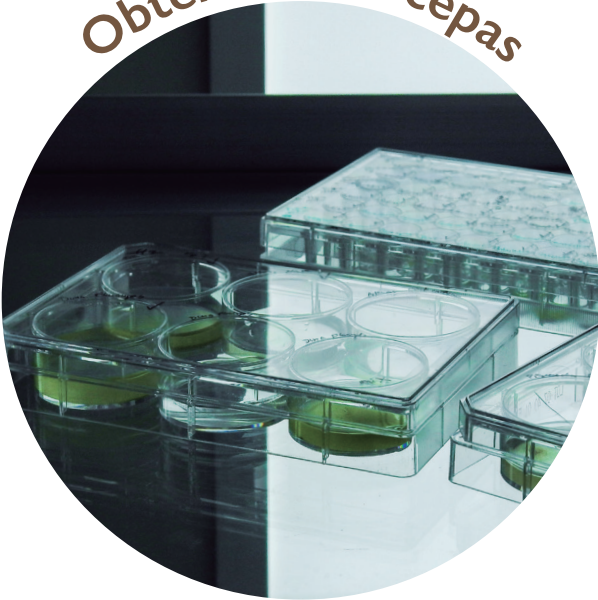
## Colecta



## Aislamiento



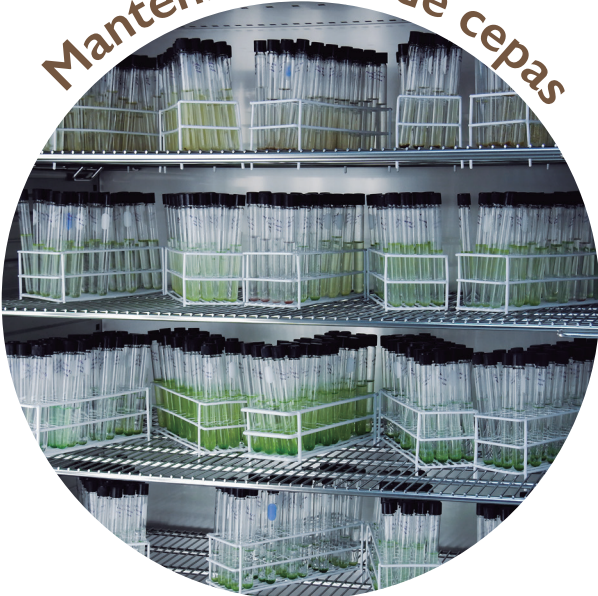
## Obtención de cepas




## Inoculo a 250 mL



## Mantenimiento de cepas



	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/AOD
	<b>AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CEPAS DEL GÉNERO</b> <i>Desmodesmus</i>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 1 de 3

## 1. OBJETIVO

Establecer las pautas a seguir para el aislamiento y la obtención de cepas del género *Desmodesmus* provenientes de las lagunas de zonas alto andinas del Perú (Ayacucho y Puno).

## 2. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable en diferentes muestras de agua continental (lagos, lagunas y ríos)

## 3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

- **Lavado celular:** proceso por el que se traspasa una célula microalgal en diferentes gotas de medio de cultivo estéril hasta lograr que solo quede una sola célula libre de contaminantes como protozoos, bacterias, u otras especies de microalgas.
- **Medio de cultivo:** solución acuosa, sólida o semisólida estéril con nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las microalgas.
- **Microalgas:** organismos unicelulares o pluricelulares cuyas células realizan todas las funciones vitales de forma independiente mediante la fotosíntesis, miden entre 1 y 100 micras, pueden ser autótrofos o heterótrofos.

## 4. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

### 4.1. MATERIALES

- Guantes quirúrgicos descartables
- Cámara de cultivo con multipocillos de policarbonato
- Cubreobjetos de 12 mm x 12 mm
- Jebe de succión
- Aspirador de manguera

- Beaker estéril de 50 mL
- Matraz de 100 y 250 mL
- Micropipetas estériles
- Pipetas Pasteur de vidrio estéril
- Plumón indeleble punta fina
- Portaobjetos de 76 mm x 26 mm
- Tubos de vidrio con tapa rosca estériles de 16 mm X 150 mm
- Caja térmica
- Tubo falcón de 50 mL
- Malla de fitoplancton de 20 µm
- Cuaderno bitácora

### 4.2. INSUMOS

- Agua destilada
- Alcohol de 70%
- Medio enriquecido (Chu modificado)

### 4.3. EQUIPOS


- Campana de flujo laminar
- Cámara climática de condiciones controladas.
- Multiparámetro de campo
- GPS
- Radiómetro
- Cámara fotográfica
- Microscopio invertido con contraste de fases

## 5. PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN

### 5.1. COLECTA DE MUESTRAS

- a. Seleccione zonas de muestreo (lagos, lagunas y ríos).
- b. Registre la ubicación del lugar de colecta con ayuda del GPS y los parámetros físicos químicos del cuerpo de agua (pH, temperatura, salinidad, oxígeno e intensidad lumínica) en el cuaderno de bitácora de campo.



	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/AOD
	<b>AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CEPAS DEL GÉNERO</b> <i>Desmodesmus</i>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 2 de 3

- c. Realice la captura fotográfica del lugar.
- d. Tome la muestra con malla de fitoplancton o directamente con un frasco dependiendo de la profundidad del cuerpo de agua.
- e. Separe de la muestra de fitoplancton organismos como cladóceros, copépodos, anfípodos, larvas de insectos etc., con ayuda de una pipeta, con la finalidad de evitar que estos filtren las microalgas o generen materia orgánica en descomposición.
- f. Codificar los frascos con muestra y colocar en una caja de frío para ser llevados a laboratorio.


## 5.2. RECEPCIÓN DE MUESTRAS EN LABORATORIO Y SU ACONDICIONAMIENTO

- a. Registre en un cuaderno de bitácora el ingreso de las muestras al laboratorio.
- b. Evalúe y registre los parámetros físicos-químicos de temperatura, pH y salinidad de cada frasco con muestra.
- c. Coloque en una lámina portaobjeto una gota de la muestra de fitoplancton, observe bajo microscopio y registre en el cuaderno de bitácora las especies encontradas.
- d. Divida las muestras de fitoplancton en dos beakers de 100 mL de capacidad, donde una décima parte será traspasada a un beaker con medio de cultivo Chu modificado, en función del pH de la muestra, para su crecimiento y adaptación en el cepario, mientras que la muestra sobrante será colocada en otro beaker para su aislamiento a la brevedad posible; codifique ambos recipientes en función al lugar de origen y fecha.
- e. Lleve la muestra diluida al cepario por aproximadamente una semana, para su adaptación a condiciones constantes

de: temperatura, intensidad lumínica y fotoperiodo para luego proceder con la técnica de aislamiento celular.

## 5.3. TÉCNICA DE AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CEPA DEL GÉNERO *Desmodesmus*

- a. La metodología empleada se basa en los procedimientos planteados por Anderson *et al.* (2005).
- b. Prepare el material de trabajo para el aislamiento por lavado celular, el medio de cultivo Chu (elaborado de acuerdo al anexo I), y limpiar el área de trabajo con alcohol al 70%.
- c. Coloque una gota de la muestra de fitoplancton traída de campo en una placa portaobjeto y con ayuda del microscopio invertido identifique las microalgas del género *Desmodesmus*, extraiga la célula seleccionada con la ayuda de una micropipeta y transfiera a otro portaobjeto con las gotas de medio Chu estéril.
- d. Realice la transferencia celular a otras gotas con medio de cultivo estéril de forma sucesiva, hasta eliminar contaminantes como otras especies de microalgas, protozoarios, bacterias y materia orgánica.
- e. Transfiera la gota con la célula limpia de contaminación a una cámara de cultivo celular con medio de cultivo Chu estéril.
- f. Rotule la cámara de cultivo celular con las células aisladas, con datos de la fecha de aislamiento y medio utilizado. Llevar al cepario a  $80 \mu\text{mol. s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ , temperatura de  $17 \text{ }^\circ\text{C}$  y fotoperiodo de 12:12 (horas luz: oscuridad).
- g. Revise las cámaras de cultivo celular con la célula aislada cada semana bajo microscopio invertido, una vez observado el crecimiento libre de

	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/AOD
	<b>AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CEPAS DEL GÉNERO</b> <i>Desmodesmus</i>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 3 de 3

contaminantes, el pocillo con la microalga de la cámara será rotulado para su transferencia a un tubo con medio de cultivo.

- h. Coloque los tubos inoculados en el cepario a condiciones controladas por una a dos semanas hasta el siguiente procedimiento.
- i. Tome una muestra del cultivo proveniente del tubo de 15 mL y observe bajo microscopio a distintos aumentos y distintas técnicas de microscopía, las estructuras características de la microalga con la finalidad de clasificar por morfología la especie. Asigne un nuevo código.

#### 5.4. PREPARACIÓN DE INÓCULO DE 250 mL

- a. Dentro de la cámara de flujo laminar, en funcionamiento, transfiera el cultivo proveniente del tubo de 15 mL a un matraz de 100 mL, que previamente deberá contener 70 mL de medio de cultivo, y rotule con la fecha y código de la cepa. Lleve al cepario por una semana para su crecimiento a condiciones controladas.
- b. Observe al microscopio el crecimiento del matraz de 100 mL, a la semana de cultivo, transfiera el cultivo a un matraz de 250 mL con 130 mL de medio de cultivo. Deje crecer en el cepario por una semana.
- c. A la semana de cultivo, evalúe el cultivo de microalga del matraz de 250 mL, para luego ser entregado al laboratorio de alimento vivo como inóculo para los siguientes niveles de producción.

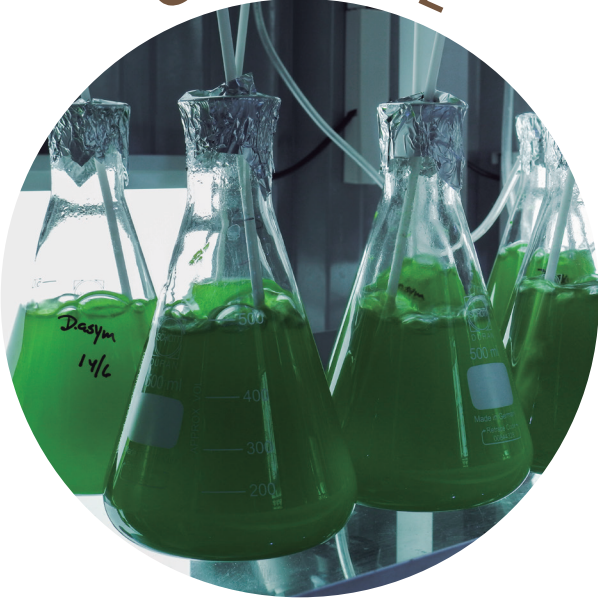
#### 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alveal K, Ferrario E, Oliveira C, Sar E. 1995. Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. pg. 229-249.
- An S, Friedl T, Hegewald E. 1999. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus* like coccoid greenalgae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. *Plant Biol.* 1: 418-429.
- Andersen A. 2005. Algal culturing techniques. Phycological Society of America, Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra. pg. 84- 98.
- Hegewald E. 1978. Eine neue unterteilung der gattung *Scenedesmus meyen.* – *Nova Hedwigia* 30: 343–376.
- Hegewald E. 2000. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). *Algol. Stud.* 96: 1-18.
- Johnson L, Fawley W, Fawley P. 2007. The diversity of *Scenedesmus* and *Desmodesmus* (Chlorophyceae) in Itasca State Park, mn, USA. *Phy.* 46(2), 214-229.
- Lewin A. 1959. The isolation of algae. *Rev. Alfol. (new series)* 3:181 -97.
- Perumal P, Balaji B, Santhanam P, Ananth S, Shenbaga A, Dinesh S. 2012. Isolation and culture of microalgae. *Workshop on advances in aquaculture technology.* Waat. India. pp. 167 -168.
- Throndsen J. 1978. The dilution – culture method. In: Sournia, A., ed. *Phytoplankton Manual.* Unesco, Paris, pp. 218- 303.
- Wiedeman E, Walne P, Trainor F. 1964. A new technique for obtaining axenic cultures of algae. *Can. J. of Bot.*, 42: 958-959.



**Cultivo inicial e  
intermedio de la  
microalga del género  
*Desmodesmus***

Cultivo de 1L



Toma de parámetros



Cultivo de 7L



Cultivo de 20L



Cultivo de 250L





	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/CIIM
	<b>CULTIVO INICIAL E INTERMEDIO DE LA MICROALGA DEL</b> <b>GÉNERO <i>Desmodesmus</i></b>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 1 de 3

## 1. OBJETIVO

Establecer las pautas a seguir para el cultivo y mantenimiento de microalgas continentales del género *Desmodesmus*, bajo condiciones controladas.

## 2. ALCANCE

Este procedimiento es aplicable por laboratorios que desarrollan técnicas de cultivo de diversas microalgas de origen continental en laboratorio bajo condiciones controladas de luz, temperatura, nutrientes y CO<sub>2</sub>, cuyo fin es evaluar el uso potencial de los cultivos en distintas industrias.

## 3. TERMINOS Y DEFINICIONES

- **Microalgas:** organismos unicelulares o pluricelulares cuyas células realizan todas las funciones vitales de forma independiente mediante la fotosíntesis, miden entre 1 a 100 micras, pueden ser autótrofos o heterótrofos.
- **Productividad:** biomasa seca microalgal expresada en g/L de cultivo.
- **Densidad celular:** número de células por mililitro.
- **Sembrar:** introducción de un concentrado conocido de volumen microalgal (inóculo) a recipientes con medio líquido. Esto marca el inicio de la etapa de cultivo.

## 4. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

### 4.1. MATERIALES

- Matracas de 100, 250, 500 y 1000 mL
- Botellas de vidrio de 2 y 20 L
- Tanques transparente de 250 L
- Botellas de borosilicato de 1, 2 y 5 L

- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 mL
- Pipetas Pasteur descartables de 3 mL
- Tapones de jebe
- Paliglobos
- Cámara de Neubauer
- Laminas porta y cubre objetos
- Termómetro de máxima y mínima
- Cámara de flujo laminar
- Mangueras siliconadas
- Llaves para la regulación de entrada de aire
- Viales de 20 mL para toma de muestra.

### 4.2. INSUMOS

- Medio Chu
- Nutriente agrícola (Byfoland®)
- Alcohol al 96%
- Extran (Detergente neutro)
- Aceite de inmersión
- Tiosulfato de sodio grado P.A
- Hipoclorito de sodio al 2,8%
- Etanol al 96%

### 4.3. EQUIPOS

- Blowers de 1,5 HP
- Bomba de vacío
- Campana de flujo laminar
- Sistema de esterilización UV
- Microscopio binocular
- Estufa
- Luxómetro
- Multiparámetro de campo WTW.
- Autoclave
- Balanza analítica

## 5. PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN

### 5.1. CULTIVO MICROALGAL

- a. Recepcionar las cepas al Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos, en matraces de 250 mL, y

	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/CIIM
	<b>CULTIVO INICIAL E INTERMEDIO DE LA MICROALGA DEL</b> <b>GÉNERO <i>Desmodesmus</i></b>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 2 de 3

mantenerlos durante 24 horas bajo las condiciones de temperatura e intensidad lumínica del laboratorio para su adaptación.

- b. Prepare los reactivos stocks que forman parte del medio Chu.
- c. Prepare el medio de cultivo añadiendo 1 mL/L de cada reactivo stock preparado anteriormente por cada litro de agua destilada y autoclave por 10 min a una temperatura de 105 °C, deje enfriar hasta el inicio de la siembra.
- d. Dentro de la campana de flujo laminar vierta 250 y 500 mL de medio de cultivo en matraces de 500 y 1000 mL respectivamente, y proceda a esterilizar por 16 min con luz UV.
- e. Para los cultivos a partir de 7L utilice agua potable tratada con hipoclorito de sodio al 2,8 % (1 mL/L agua) por 24 horas, añadir tiosulfato de sodio al 24,8 % (0,5 mL/L agua) una hora antes de la siembra para eliminar restos de cloro.
- f. Para cultivos a partir de 7 L, añada 0,14 y 0,28 mL/L nutriente agrícola Byfoland®, (para cultivos en botellas y tanques).
- g. Agregue una cantidad del cultivo microalgal (inóculo), el mismo que varía según el volumen a cultivar. Al iniciar el cultivo con el inóculo proveniente del Banco de Germoplasma, el volumen total es trasvasado a un matraz de 500 mL. Para los siguientes niveles de cultivo tener en cuenta el siguiente cuadro:

Volumen Inóculo (L)	Volumen Final (L)
0,25	0,5
0,5	1
1	7
7	20
100	250

## 5.2. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

En cada nivel de cosecha se determina la capacidad de carga y productividad.

- a. Capacidad de carga
  - Tome la muestra (2-3 mL) en un vial y fijarla con una gota de lugol.
  - Coloque la muestra en la cámara de Neubauer y lleve al microscopio.
  - Realice el conteo en el cuadrante central y en línea diagonal para el caso de microalgas menores a 6 u y los cuadrantes externos para el caso de microalgas mayores a 6 u (de acuerdo a anexo 5).
- b. Cámara de Neubauer
  - Realice el conteo por triplicado.
  - Obtenga el promedio y lleve los datos a las fórmulas (de acuerdo a anexo 5).
- c. Curva y tasa de crecimiento
  - Luego de cinco días de cultivo se realiza la curva de crecimiento y se determina la tasa de crecimiento celular según la siguiente fórmula.

$$K = \frac{1}{Cf} \times \left( \frac{\Delta Cf}{\Delta t} \right)$$

Donde:

K: Tasa de Crecimiento

Cf: Concentración celular final

<b>Proporción de inóculo por nivel de cultivo</b>
---

	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/CIIM
	<b>CULTIVO INICIAL E INTERMEDIO DE LA MICROALGA DEL</b> <b>GÉNERO <i>Desmodesmus</i></b>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 3 de 3

$\Delta C_f$ : Variación de la concentración celular  
(Concentración final- Concentración inicial)

$\Delta t$ : Variación de tiempo (Tiempo final- Tiempo inicial)

**d. Productividad: determinación del  
Peso seco**

- Coloque el filtro GF/F dentro de placas Petri, que han sido previamente pesadas, las mismas que contienen papel platino para evitar el pegado sobre ellos, luego colocarlos en la estufa por 4 h a 80 °C.
- Lleve el filtro al deshumecedor hasta que alcance la temperatura ambiente (25 min. como mínimo) y pese (repita el proceso de pesado por triplicado observando la constancia del peso).
- Coloque filtro sobre soporte de filtración utilizando una pinza y filtre 5 mL de microalgas.
- Coloque el filtro con muestra en la placa petri y póngalo en la estufa por 4 h a 80 °C.
- Coloque la placa en deshumecedor por 25 minutos y luego pese el filtro con la muestra y llevar el resultado a la siguiente formula.
- Una vez obtenido el peso seco llevar el resultado al volumen de 1L (de acuerdo a anexo 6).

$$Ps = Fm - Fs$$

Dónde:

Ps: Peso seco de microalga

Fm: Filtro con muestra filtrada

Fs: Filtro solo

**e. Registro de Datos**

- Diariamente se registra la temperatura e intensidad lumínica de la sala (de acuerdo a los anexos

2 y 3), las mismas que deben mantenerse en un rango entre 18 a 20°C y 1000 a 3000 lux.

- Luego de haber realizado el sembrado (medio nutrido e inoculado), mantenga el cultivo por un periodo de 168 h (tiempo para alcanzar la máxima densidad), posterior a este momento se toman los parámetros físico-químicos (temperatura, OD, pH y salinidad) según el formato del anexo 4.

**6. BIBLIOGRAFÍA**

- Arredondo O, Voltolina D. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del noreste. La Paz, Baja California Sur. Pág. 17-25.
- Jacinto M. Manual de Calidad MQ-001. 2009. Instituto del Mar del Perú. Pág. 30-44.
- Ortega A. y Reyes H. 2012. Cultivo de las microalgas dulceacuícolas *Kirchneriella obesa*, *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorococcum infusorium* empleando tres medios de cultivo. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología-Unam. México.



Obtención de  
biomasa de  
microalgas del  
género *Desmodesmus*



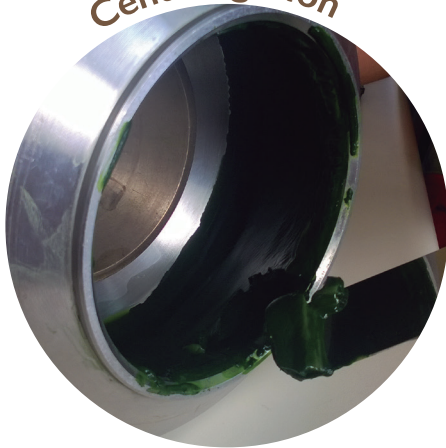
Cultivo de 500 L



Toma de parámetros



Centrifugación



Biomasa húmeda



Liofilización



Biomasa seca



Conservación



	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/OBMD
	<b>OBTENCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DEL</b> <b>GÉNERO <i>Desmodesmus</i></b>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 1 de 10

## 1. OBJETIVO

Establecer las pautas a seguir para realizar la implementación de sistemas de cultivo, transporte, sembrado, mantenimiento y obtención de biomasa húmeda y seca, del cultivo de la microalga del género *Desmodesmus* cultivada en condiciones de invernadero.

## 2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica a la obtención de biomasa, a partir de cultivos de microalgas del género *Desmodesmus* de origen continental y cultivados en condiciones de invernadero.

## 3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

- **Biomasa:** (1) peso, volumen o equivalente energético total de los organismos de un área dada, (2) materiales vegetales y restos animales utilizados como fuente de combustible o de otros productos industriales.
- **Biorreactor:** son recipientes donde se llevan a cabo reacciones bioquímicas y/o bioprocesos, ya sea con microorganismos, células vegetales y animales, viables o no viables. En términos generales, un Biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, concentración de oxígeno, temperatura, etc.) al organismo o sustancia química que se cultiva, en función de los flujos de entrada y salida.
- **Centrifugación:** la centrifugación separa sólidos de líquidos de diferente densidad mediante una fuerza rotativa, la cual imprime a la mezcla una fuerza mayor que la de la

gravedad, provocando la sedimentación de los sólidos o de las partículas de mayor densidad. El proceso es rápido y de gran consumo energético, la recuperación de la biomasa depende de las características de sedimentación de las células, tiempo de residencia y la solución de fondo.

- **Liofilización:** es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua de estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.

## 4. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS

### 4.1. MATERIALES

- Cámara Neubauer
- Tanque de fibra de vidrio de 300 L, para transporte y acopio de cultivo
- Manguera de 1" x 100 m
- Mangueras siliconadas de 1/8" x m
- Pipetas Pasteur de 9" caja x 250 unid
- Portaobjetos caja x 50 unid
- Cubre objetos 22 x 22 mm caja x 100 unid
- Vial de 10 mL
- Esponja verde lavavajilla
- Guantes industriales de nitrilo Talla 9 x 1 par

	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/OBMD
	<b>OBTENCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DEL</b> <b>GÉNERO <i>Desmodesmus</i></b>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 2 de 10

- Rollo de bolsa de polietileno x 60 kg (200 bolsas)
- Módulo de metal para biorreactores (120 x 180 cm)
- Piedras difusoras de aire de 2 x 1,5 cm para acuario
- Plomos cilíndricos para pesca de 50 g
- Gas carbónico CO<sub>2</sub> x 30 kg
- Agua destilada x 1 L
- Balde plástico de 20 L
- Malla tipo talega de 1 μ
- Jarras de 1 y 2 L
- Bandeja rectangular de acero inoxidable de 38 x 36 x 3 cm
- Placa Petri de vidrio de 60 x 15; 100 x 20; 150 x 25 o 150 x 30 mm
- Espátula de plástico con mango de madera de 20 cm
- Cuchara espátula de metal de 120 mm
- Mortero C/pilón de porcelana, capacidad de 400 g
- Bolsas plásticas con cierre hermético (de 2,5 x 2,5 a 38 x 41 cm.)
- Linterna de mano
- Pieza facial de media cara 3M código 07025/2091
- Guantes quirúrgicos descartables

#### 4.2. INSUMOS

- Hipoclorito de sodio (lejía) x 2,5 L
- Lugol x 1L
- Detergente granulado x 15 Kg

#### 4.3. EQUIPOS

- Microscopio óptico binocular Leitz
- Carretilla hidráulica de 2 TM de capacidad
- Bomba succionadora de agua 1 HP
- Bomba succionadora de agua 5 HP
- Selladora con alambre de Micrón
- Contómetro celular

- Multiparámetro de campo WTW
- Sistema de esterilización por UV (biofiltro, conos porta filtro, lámpara UV)
- Sistema de aireación
- Blower de alta presión de 3HP
- Luxómetro
- Sistema de inyección de CO<sub>2</sub>
- Termómetro ambiental de pared
- Centrífuga de limpieza manual GEA WESTFALIA modelo OTC2
- Bomba de succión Nemo
- Congeladora (Temperatura promedio -20 °C)
- Balanza analítica y/o electrónica
- Calculadora
- Liofilizador LABCONCO de 18 L de capacidad (Modelo: 7755042/790480401622, incluye bomba de vacío)

## 5. PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN

### 5.1. MANIPULACIÓN DE INOCULO

#### 5.1.1. Implementación de los sistemas de cultivo en tanques

- a. Colóquese guantes industriales y mezcle en una jarra de dos (2) litros, 100 mL de agua potable, 200 mL Hipoclorito de sodio (lejía) 4,5% P/V y 10 g de detergente industrial granulado, homogenice manualmente toda la mezcla.
- b. Vierta la mezcla al tanque, colóquese guantes de jebe industrial y con la ayuda de esponja lava vajilla, proceda a limpiar toda la superficie interna del tanque.
- c. Finalmente, enjuague con abundante chorros de agua el interior y bordes

	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/R01.01/OBMD
	<b>OBTENCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DEL</b> <b>GÉNERO <i>Desmodesmus</i></b>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 3 de 10

del tanque, para la implementación del sistema de cultivos en tanque. Luego, instale mangueras siliconadas de 1/8", con una piedra difusora de aire para acuario en un extremo con un plomo cilíndrico para pesca de 50 g, la manguera permitirá el ingreso de aire y CO<sub>2</sub>.

### 5.1.2. Transporte y recepción de inóculo

- a. El inóculo es proporcionado por el Laboratorio de la Sala de Microalgas (Cultivos intermedios) en tanques tipo cilindrocónicos de 250 L, antes de iniciar con el transporte, verifique la calidad del cultivo con la ayuda de un microscopio (presencia de protozoarios, bacterias y/o hongos), si observa contaminantes, descarte el inóculo.
- b. De no presentar contaminantes, proceda con el transporte, para lo cual con la ayuda de una bomba hidráulica de 0,5 Hp, trasvase el inóculo del tanque cilindrocónico al tanque de fibra de vidrio, el cual estará sobre un carro hidráulico para facilitar el transporte hacia el invernadero.
- c. Dentro del invernadero, acopie todo el inóculo en un tanque de fibra de vidrio, con el objetivo de homogenizar el cultivo, finalmente tome una alícuota del inóculo, fije en Lugol y proceda con la determinación de la densidad celular por la técnica de conteo en cámara de Neubauer (de acuerdo anexo 5).

### 5.1.3. Siembra de inóculo

- a. Luego del acopio del inóculo proveniente de la sala de microalgas

(Cultivos intermedios), proceda con la siembra de las mismas, en tanques previamente implementados. Inicie el cultivo, llenando al 50% con agua filtrada a una micra y pasada por radiación UV, luego llene el 50% con el inóculo. Agregue nutriente foliar Bayfolan® en la dosis de 0,28 mL/L.

- b. Encienda la bomba aireadora y el sistema de inyección de CO<sub>2</sub>, cerciorándose que cada tanque de cultivo o biorreactor tenga una correcta aireación.
- c. Tras la siembra tome una muestra de los cultivos, fije con Lugol y proceda con el conteo celular en cámara de Neubauer para la determinación de la densidad celular inicial, registre en formato correspondiente (según anexo 5).

### 5.1.4. Mantenimiento de cultivo

- a. Diariamente registre los parámetros abióticos (pH, temperatura de cultivo, oxígeno disuelto, salinidad), con el empleo de un Multiparámetro de campo WTW i305, sumerja los sensores en el cultivo (Anexo 2). Mantenga pH en 7 – 7,5 con inyección de CO<sub>2</sub>, la temperatura no debe superar los 35 °C ni ser menor de 16 °C.
- b. También registre las condiciones medioambientales dentro del invernadero (intensidad lumínica, radiación fotosintética activa - PAR y temperatura) con el empleo de un luxómetro, un fotómetro, radiómetro y termómetros (Anexo 3).
- c. Finalmente, tome muestras del cultivo y revise parámetros bióticos (Contaminación y tamaño celular),



	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/OBMD
	<b>OBTENCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DEL</b> <b>GÉNERO <i>Desmodesmus</i></b>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 4 de 10

fije con Lugol y proceda con el conteo celular en cámara de Neubauer para la determinación de la densidad celular diaria, registre en formato correspondiente (según anexo 5).

- d. En caso de presentar contaminantes, como protozoarios, puede inyectar CO<sub>2</sub> por 30 min en intervalos de 2 horas, hasta bajar a 4 el pH; de seguir presentando contaminantes descarte el cultivo.

## 5.2. COSECHA Y OBTENCIÓN DE BIOMASA HÚMEDA

### 5.2.1. Acopio de cultivos

- a. Acopie todo el cultivo a cosechar en un tanque de 300 o 600 L, empleando la técnica del sifoneo (La densidad de cosecha empleada vario entre  $3 - 6 \times 10^6$  cel/mL).

### 5.2.2. Acondicionamiento de equipo de centrifugación

- a. Llene un recipiente de 20L de capacidad, con agua potable y coloque en las mangueras de succión y de retorno de cultivo, que están conectadas a la bomba de succión, coloque la manguera de retorno en la canaleta de desagüe, encienda la bomba y empleando el variador de velocidad ajústelo a una velocidad media de salida de 20 L/h, así se estará cebando y limpiando la bomba, transcurrido 3 minutos apague.
- b. Arme la centrifuga de limpieza manual, apilando los discos en el eje del cabezal, encima de ellos colocar el separador de discos y seguidamente coloque el “bowl”.
- c. En la parte superior del “bowl” acople el anillo roscado, para su

correcto posicionamiento emplee dos llaves de gancho, con una de ellas se fija el “bowl” y con la segunda llave de gancho se enrosca el anillo roscado a la parte superior del “bowl” para lo cual, gire la llave en sentido antihorario.

- d. Seguidamente coloque la campana encima del “bowl” y fíjela empleando las 3 tuercas de aseguramiento, empleando la llave de gancho con cuencas hexagonales.
- e. En la parte superior de la campana existe una conexión empuñadora, disponer en ella la llave de gancho, la cual posee una cavidad que calza en la conexión, seguidamente introducir la llave tipo T, presione y gire la llave de gancho en sentido antihorario.
- f. El armado de la centrifuga concluye al enroscar la tapa rosca en la conexión empuñadora.
- g. Una vez armada la centrifuga de limpieza manual, proceda a encenderla, en el panel electrónico de la centrifuga, gire la llave de encendido a I y pulse ON (Botón negro), esperar que alcance velocidad programada (32000 rpm). Inmediatamente encienda la bomba de succión, coloque la manguera de succión dentro del tanque de acopio de cultivo y elimine el resto de agua potable mediante recirculación por la manguera de retorno de cultivo, observe la salida del cultivo e inmediatamente sumérjalo al tanque y continúe con la recirculación.
- h. Coloque la manguera en la llave de ingreso hacia la centrifuga y abra la llave de paso hacia la centrifuga y cierre gradualmente la llave de paso de la manguera de retorno de

	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/OBMD
	<b>OBTENCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DEL</b> <b>GÉNERO <i>Desmodesmus</i></b>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 5 de 10

cultivo, dependiendo de la densidad celular de las microalgas, el flujo de salida de cultivo centrifugado varía entre 120 – 200 L/hora.

- i. Verifique la retención de microalgas, observando la transparencia del agua de salida o tome una muestra y observe al microscopio, para descartar la presencia de células.

### 5.2.3. Retiro de biomasa húmeda

- a. Prepare un envase con aproximadamente 80L de agua potable, antes que termine de centrifugar el cultivo, cierre la llave de paso de la manguera que ingresa cultivo a la centrifuga y realice recirculación del equipo de succión con el agua potable colectado, mantenga así, aproximadamente por cinco (5) minutos y apague el variador de velocidad, realice este procedimiento a fin de dejar limpio el equipo de succión.
- b. Cuando comience el enjuague del equipo de succión, también apague la centrifuga, pulse OFF (Botón Rojo) y gire la llave de encendido a 0, espere que el eje deje de girar. Cuando se detenga, proceda con el guardado de todas las mangueras de manera ordenada. Para el desarmado de la centrifuga proceda de manera inversa a su procedimiento de armado.
- c. Una vez realizado el desarmado, retire el bowl, en seguida con la ayuda de una espátula retire toda la biomasa colectada, esparza la biomasa colectada en recipientes, máximo espesor de 1,5 cm de altura, finalmente limpie y lave los accesorios de la centrifuga y

materiales utilizados para la colecta de la biomasa húmeda.

- d. Para terminar el proceso, pese y rotule el envase donde fue colectado la biomasa húmeda (Anexo 9). Para su conservación y antes de continuar con el siguiente proceso coloque el envase en una congeladora -15 °C (como mínimo 24 horas antes de iniciar siguiente proceso).

## 5.3. SECADO Y OBTENCIÓN DE BIOMASA SECA

### 5.3.1. Acondicionamiento del Liofilizador

- a. Antes de encender el Liofilizador, limpie el cubículo del STOPPERING TRY DRYER. (Panel superior) y el colector del FREEZONE (Panel inferior), con un trapo seco y suave o un pedazo de papel, asegure que las llaves (Manifolds) estén totalmente cerrados, verifique el colector, la llave central, que intercomunica ambas partes, y el sistema de vacío, de manera que no tenga ninguna fuga.
- b. Verifique que el equipo mantenga la programación establecida.
  - STOPPERING TRY DRYER. (Panel superior)  
Ubíquese con DISPLAY en MANUAL.  
Modo manual, PI/Seg 1 Ramp 0.40°C/Mn, Hold -35°C, time 12.0.
  - FREEZONE ó FREEZE DRY SYSTEMS 18L (Panel inferior)  
Presione MENU: Modo automático, Vacuum set point: 0.100 mbar, R5-232 Transmission Rate: 10 Seg.
- c. En cada proceso de liofilización, antes de iniciar, registre en el formato correspondiente, las horas

	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/OBMD
	<b>OBTENCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DEL</b> <b>GÉNERO <i>Desmodesmus</i></b>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 6 de 10

de uso tanto de STOPPERING TRY DRYER y del FREEZONE (anexo 10).

- STOPPERING TRY DRYER. (Panel superior): Encienda el Switch, mediante botón DISPLAY ubíquese en SET UP luego con el botón ENTER presione hasta ubicar REFRIG TOTAL HOUR y SERVICE HOUR y registre cantidad de horas.
- FREEZONE (Panel inferior) Encienda el switch, presione el botón MENU hasta ubicar REFRIG TOTAL HOUR y SERVICE HOUR, presionar una vez más y registre horas de REFRIG TOTAL HOUR y VACUUM HOUR, las horas de VACUUM no debe exceder las 1000 horas, caso contrario reinicie conteo, presionando SELECT por 5 segundos y luego aceptar reinicio.

### 5.3.2. Proceso de liofilización

- a. Es importante resaltar que el equipo tiene una capacidad máxima de dos (2) kilogramos, para procesar cualquier tipo de biomasa húmeda homogenizada, repartida entre sus tres (3) parrillas, además cada una tiene un sensor de temperatura.
- b. Previo al proceso, registre el peso de las bandejas y/o placas Petri vacías (Anexo 9).
- c. Esparza las muestras sobre las bandejas de acero y/o placas Petri, y pese nuevamente, registre el peso obtenido (Anexo 9).
- d. Verifique que el grosor de la biomasa esparcida tenga como máximo 1,5 cm de espesor. Finalmente, congele las muestras (- 20 °C). Realice este proceso 24 horas antes de la liofilización.
- e. Liofilización: Encienda el switch del STOPPERING TRY DRYER. Anote las horas de uso del equipo, con el botón DISPLAY ubíquese en MANUAL y con el botón PROGRAM haga descender la temperatura hasta -15°C y presione ENTER.
- f. Con DISPLAY ubíquese en MONITOR, observe el descenso de la temperatura. Comience con el enfriamiento presionando RUN/STOP. El modo de funcionamiento del STOPPERING TRY DRYER es manual (Led verde encendido en MAN). El equipo tardará tres (3) horas hasta llegar a los -15 °C.
- g. Una vez encendido el panel superior, continúe con el panel inferior.
- h. Encienda el switch de FREEZONE, anote horas de uso, luego presione AUTO.
- i. Observe el descenso de la temperatura del colector, que varía entre -50 y -56 °C, luego de diez (10) minutos se activará automáticamente el vacío, VACUUM.
- j. Observe en el tablero el encendido de las luces ámbar y verdes, este último cuando ya todo el sistema esté con la temperatura y vacío adecuado (0,022 – 0,070 mBar).
- k. Todo este proceso demora treinta (30) minutos aproximadamente.
- l. Cuando la zona del STOPPERING TRY DRYER, descienda hasta -15°C, en tres (3) horas, coloque las muestras.
- m. Espere una (1) hora más, hasta que las muestras y parrillas estén a la

	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/P-01.01/OBMD
	<b>OBTENCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DEL</b> <b>GÉNERO <i>Desmodesmus</i></b>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 7 de 10

- misma temperatura, observe el monitor.
- n. Observe el panel y verifique que las parrillas y muestras estén a la misma temperatura e inmediatamente abra la llave central (Abrir de derecha a izquierda), con el objetivo que comience la liofilización de las muestras, el vacío se producirá en todo el equipo (Los valores de temperatura de colector y vacío, varían en los rangos ya descritos, durante todo el proceso) (Figura 19, d).
  - o. Luego de seis (6) horas, ubíquese en STOPPERING TRY DRYER, y nuevamente con el botón DISPLAY localice MANUAL y con el botón PROGRAM aumente la temperatura hasta 5 °C y presione ENTER.
  - p. Finalmente con DISPLAY ubíquese en MONITOR y observe el aumento de la temperatura.
  - q. Luego de catorce (14) horas, nuevamente en STOPPERING TRY DRYER y con el botón DISPLAY ubíquese en MANUAL y con el botón PROGRAM aumente la temperatura hasta quince (15) °C y presione ENTER, dejar por 3 horas.
  - r. Concluidas las 3 horas, aumente la temperatura (para el secado final) hasta veinticinco (25) °C y dejar por siete (07) horas.
  - s. En este punto, con la ayuda de la linterna de mano, verifique cada (1) hora el proceso de secado la muestra.
  - t. Luego de treinta y cuatro (34) horas, tiempo que demora el proceso de liofilización, inicie el apagado del equipo.
  - u. En el panel inferior, FREEZONE, presione VACUUM, espere 10 segundos y presione AUTO.
  - v. Abra 2 ó 3 Manifolds (Partes lisas hacia abajo) a fin de eliminar el vacío.
  - w. Luego de eliminar el vacío, ubique en el panel superior el STOPPERING TRY DRYER y presione RUN/STOP.
  - x. Con los pasos previos, se termina el proceso de liofilización de la muestra.
  - y. Finalmente apague ambos switch.
  - z. Retire las bandejas y/o placas Petri.
  - aa. Con la ayuda de las espátulas remueva las muestras y páselas al mortero.
  - bb. En el mortero realice el homogenizado de las muestras.
  - cc. Vierta la muestra homogenizada en bolsas plásticas, con cierre hermético.
  - dd. Una vez la muestra esté embolsada, pese nuevamente y anote el peso total (de acuerdo a anexo 11 y 12).
  - ee. Codifique y almacene la muestra para su posterior análisis.
  - ff. Finalmente con todos los datos obtenidos, complete el formato de acuerdo anexo 13.
- ### 5.3.3. Control de calidad
- a. Verifique la calidad de la biomasa seca, realizando un análisis de humedad al liofilizado.
  - b. Emplee el método de estufa de aire caliente (50 °C) por 5 horas, hasta que el peso sea constante.
  - c. El rango de humedad aceptable para biomasa con peso superior a un (01) Kg, está entre 5 a 7%.
  - d. Si el porcentaje de humedad es mayor o la muestra no logre secar,

	<b>PROTOCOLO</b> <b>IMARPE</b>	DGIA/LISP/R01.01/OBMD
	<b>OBTENCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DEL</b> <b>GÉNERO <i>Desmodesmus</i></b>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 8 de 10

nuevamente proceda a congelar y realice la liofilización.

#### 5.3.4. Análisis proximal de las muestras

- a. De acuerdo a los análisis realizados, se obtendrá un análisis proximal según anexo 14.

#### 5.3.5. Conservación de muestras

- a. Codifique y almacene la muestra para posteriores análisis, conserve en congeladora a temperatura entre -15 y -20 °C, de esa manera se evitará la degradación de algún compuesto.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez T, Gallardo T. 1989. Una Revisión sobre la Biotecnología de las Algas. Boj.Compu tecnsis 15: 9—60
- Becker E. 1994. Microalgae. Biotechnology and Microbiology. Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Becker E, Venkataraman L. 1982. Biotechnology and Exploitation of Algae- the Indian Approach. German Agency for Technical Cooperation, Eschborn, Germany.
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L. 2002. Biochemistry. 5a Edition. W.H. Freeman. New York, 1050 pp.
- Brennan L, Owende P. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14: 557-577.
- Chen M, Liu J, Ju Y. 1998. Flotation removal of algae from water. Physicochemical and Engineering Aspects. 12:49-55.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv. 25:294–306
- Cohen Z. 1999. Chemicals from Microalgae. Taylor Y Francis, London, 419pp.
- Desmorieux H, Decaen N. 2006. Convective drying of *spirulina* in thin layer, Journal of Food Engineering 66 (4), pp. 497–503.
- Dubinsky Z, Matsukawa R, Karube I. 1995. Photobiological aspects of algal mass culture. J. Mar. Biotechnol. 2, 261-265.
- Garcia F, Jawiarczyk N, González C, Fernández J, Acien, F. 2012. Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal 3(2):147-161
- Gonzales A. 2000. “Alternativas en el cultivo de microalgas”. Escuela superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil- Ecuador.
- Ho S, Chen C, Lee D, Chang J. 2011. Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-emission mitigation systems – A review. Biotechnology Advances 29: 189-198.
- Jacob A, Krist G, Wiencke C, Lehmann H. 1991. Physiological-Responses of the Antarctic Green-Alga *Prasiola Crispa* Ssp Antarctica to Salinity Stress. J. Plant Physiol. 139:57-62.



	PROTOCOLO IMARPE	DGIA/LISP/R01.01/OBMD
	OBTENCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DEL GÉNERO <i>Desmodesmus</i>	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 9 de 10

- Leach G, Oliveira G, Morais R. 1998. Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a  $\beta$ -carotene rich powder, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 20 (2) pp. 82–85.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. 2004. Brock, Biología de los microorganismos. 10a Edición. Prentice Hall. 1089p.
- Molina E, Belarbi E, Fernández F, Robles A, Chisti Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advances. 20: 491–515.
- Molina E, Medina A, Giménez A, Sánchez J, Camacho F, García J. 1994. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass, Journal of the American Oil Chemists' Society 71 (9) pp. 955–959.
- Nindo C, Powers J, Tang J. 2007. Influence of Refractance Window evaporation on quality of juices from small fruits. Journal FoodScience & Technology 40 (6): 1000-1007.
- Nishida I, Murata N. 1996. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47:541-568.
- Norton T, Melkonian N, Andersen R. 1996. Algal biodiversity. Phycologia. 35: 308–326
- Olaizola M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace, Biomolecular Engineering. USA 459\_466.
- Osorio P. 2008. Estudio técnico económico para la producción de biodiesel a partir de algas. Tesis de grado Ingeniero Civil en Biotecnología e Ingeniero Civil Químico. Universidad de Chile, agosto del 2008.
- Palomino A, Estrada C. López J. 2010. Microalgas: Potencial para la producción de biodiesel. IV Congreso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, João Pessoa, PB.
- Prakash J, Pushparaj B, Carlozzi P, Torzillo G, Montaini, Materassi, R. 1997. Microalgae drying by a simple solar device, International Journal of Solar Energy. 18 (4), pp. 303–311.
- Reynolds C. 1984. Ecology of Freshwater Phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge, 184pp
- Richmond A. 1999. Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. In: Chemicals from Microalgae (ed. Z. Cohen), pp. 353-86. Taylor & Francis, London.
- Richmond A. 2004. Handbook of microalgal culture:Biotechnology and applied phycology. Ed Blackwell.Science Ltd.UK.
- Richmond A, Becker E. 1986. Technological aspects of mass cultivation, a general outline. In: Richmond A, editor. CRC handbook of microalgal mass culture.Boca Raton: CRC Press. p. 245– 63.
- Singh R. Sharma S. 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production - A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 16(4): 2347-2353.
- Suh I, Lee C. 2003. Photobioreactor engineering: design and performance. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 6(8), pp. 313-321.

	<p>PROTOCOLO IMARPE</p>	DGIA/LISP/R01.01/OBMD
	<p>OBTENCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DEL GÉNERO <i>Desmodesmus</i></p>	<p>Edición: 01 Revisión: 0 Fecha: Mayo 2018 Página: 10 de 10</p>

- Ugwu C, Aoyagi H, Uchiyama H. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol.*, **99**: 4021-4028.
- Yamaguchi K. 1997. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *Journal of Applied Phycology*, **8**, 487-502.

## ANEXOS

### Anexo I. Medio de cultivo Chu

A 1000 mL de agua destilada esterilizada en autoclave, agregue asépticamente cada una de las soluciones stocks siguientes (esterilizados previamente en autoclave) en las cantidades que se indican:

mL	Solución stock	g/500mL	g/L
1	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	18,35	36,7
1	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	18,45	36,9
1	NaHCO <sub>3</sub>	6,3	12,6
1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,35	8,7
1	NaNO <sub>3</sub>	42,5	85
1	Na <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> . 9H <sub>2</sub> O	14,2	28,4
1	*Solución de citrato férrico		
1	** Solución de micronutrientes		
1	***Tris		

- \*Solución de citrato férrico: A 1000 mL de agua destilada esterilizada en autoclave agregue 3,35 g de ácido cítrico y disuelva completamente. Agregue 3,35 g de citrato férrico y disuelva al poner en autoclave. Mantenga los envases envueltos en papel aluminio.
- \*\*Solución de micronutrientes: A 1000 mL de agua destilada y esterilizada en autoclave, agregue:

Compuesto	g/L
Na <sub>2</sub> EDTA	0,05
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,618
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,0196
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,044
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,02
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,0126
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.0126

- \*\*\*TRIS

Por cada 200 mL agua destilada:

Agregar 50g de tris y 32mL de HCl

Añadir 1mL de cada una de las soluciones por cada litro de medio de cultivo a preparar.

## Anexo 2. Formato de control de temperatura ambiental de la Sala de microalgas

Fecha	8:00 AM						12:00 PM						16:00 PM					
	A (*)		B (*)		C (*)		A (*)		B (*)		C (*)		A (*)		B (*)		C (*)	
	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min

(\*): Puntos de toma de datos dentro de la sala de microalgas: A: matraces 500 mL; B: Matraces 1 L; C: Botellas de 7 y 20 L

## Anexo 3. Formato de control parámetros de la intensidad lumínica de la Sala de microalgas

Fecha	Hora	A (*)				B (*)				C (*)				D (*)			
		p1	p2	p3	p4	p1	p2	p3	p4	p1	p2	p3	p4	p1	p2	p3	p4

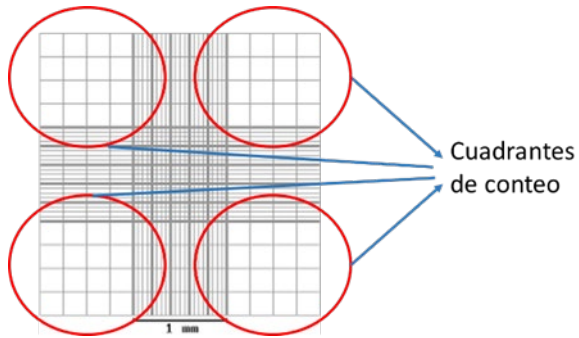
(\*): Puntos de toma de datos: A: Matraces 0,5 L; B: Matraces 1 L; C: Botellas de 7 y 20 L; D: Tanques; p1, p2, p3, p4: puntos dentro de cada nivel.

## Anexo 4. Formato de control de parámetros Físico – Químicos de los cultivos

Fecha	Hora	A(*)								B(*)								C(*)			
		0.5L				1L				7L				20L				250L			
		pH	OD (mg/L)	T° (°C)	Salinidad (ppm)	pH	OD (mg/L)	T° (°C)	Salinidad (ppm)	pH	OD (mg/L)	T° (°C)	Salinidad (ppm)	pH	OD (mg/L)	T° (°C)	Salinidad (ppm)	pH	OD (mg/L)	T° (°C)	Salinidad (ppm)

(\*): Puntos de toma de datos: A: matraces de 0,5 y 1 L; B: Botellas de 7 y 20 L; C: Tanques 250 L

## Anexo 5. Formato de control de la capacidad de carga de los cultivos (Células mayores a 6μ)



$$Nb = \frac{\sum \text{Cel. Cb}}{4} \times 10000$$

Dónde:

Na y Nb: Número de células.

$\sum$  Cel.Ca: Suma de células de la diagonal central de la cámara de Neubauer

$\sum$  Cel.Cb: Suma de células de los cuadrantes externos de la cámara de Neubauer

Fecha	Conteo	Primer cuadrante (*)	Segundo cuadrante (*)	Tercer cuadrante (*)	Cuarto cuadrante (*)	Sumatoria	Promedio	Fórmula a Nb	N° Cel/mL x 10 <sup>6</sup>
	1°								
	2°								
	3°								
	1°								
	2°								
	3°								

(\*): Cuadrantes de la cámara de Neubauer; 1°, 2° y 3°: Número de repeticiones del conteo.



### Anexo 6. Formato de control de la productividad de los cultivos

Fecha	Numero de muestra	PF (g)	PT (g)	Prod x Vol muestra (g)	Prod x L
	1°				
	2°				
	3°				

Pf: Peso filtro solo. PT: Peso filtro y muestra

### Anexo 7. Formato de control parámetros de los cultivos en condiciones de Invernadero

Fecha	Punto control (*)	HORA											
		08:00				12:00				16:00			
		pH	OD (mg/L)	Salinidad (ppm)	Temp (°C)	pH	OD (mg/L)	Salinidad (ppm)	Temp (°C)	pH	OD (mg/L)	Salinidad (ppm)	Temp (°C)

(\*) Indica el lugar donde se toman los datos

### Anexo 8. Formato de control parámetros del Invernadero

Fecha	Punto control (*)	Hora	Luminosidad (lux)	PAR ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ )	Temperatura (°C)	
					Mínima	Máxima

(\*) Indica el lugar donde se toman los datos

## Anexo 9. Obtención del peso de biomasa húmeda

Para obtener el peso húmedo de la biomasa cosechada, emplee la siguiente formula:

$$BH = P_1 - P_2$$

Dónde:

BH = Biomasa húmeda en g.

P<sub>1</sub> = Peso total de biomasa húmeda en g (bandeja de acero y/o placa Petri de vidrio+ biomasa húmeda)

P<sub>2</sub> = Peso de la bandeja de acero y/o placa Petri de vidrio en g.

## Anexo 10. Formato de control de horas de uso del Liofilizador

Fecha	FREEZONE				STOPPERING TRY DRYER		Usuario (*)	Observaciones
	REFRIGERACION		VACIO		REFRIGERACION			
	TOTAL (h)	SERVICIO (h)	TOTAL (h)	SERVICIO (h)	TOTAL (h)	SERVICIO (h)		

(\*)Usuario: Persona responsable de la anotación de horas de uso del Liofilizador.

## Anexo 11. Obtención del peso de biomasa seca y expresión de resultados

Para obtener el peso seco de la biomasa húmeda, emplee las siguientes formulas:

$$BH = P_1 - P_2$$
$$BS = P_3 - P_4$$
$$T = \frac{BS \times 100}{BH} \%$$

Dónde:

BH = Biomasa húmeda en g.

BS = Biomasa seca en g.

P1 = Peso total de biomasa húmeda en g. (bandeja y/o placa petri + biomasa húmeda)

P2 = Peso de la bandeja y/o placa petri en g.

P3 = Peso total de biomasa seca en g. (bolsa hermética + biomasa seca)

P4 = Peso de la bolsa hermética en g.

T = Porcentaje de conversión de biomasa húmeda a seca

## Anexo 12. Formato de registro de datos después de secado de biomasa microalgal

Fecha	N° de Muestra	Peso húmedo	Peso seco	% de conversión	Hora inicio liofilización	Hora fin liofilización	Usuario (**)	Observaciones

(\*\*)Usuario: Persona responsable del encendido y/o apagado del Liofilizador.

### Anexo 13. Formato final para evaluación de producción de microalgas en condiciones de Invernadero

N°	Fecha Ingreso	Litros Inoculo (L)	Capacidad de carga de inoculo (cel/mL x 10 <sup>7</sup> )	Litros sembrados (L)	Fecha cosecha	código de muestra	Días de cultivo	Concentración Siembra (cel/mL x 10 <sup>7</sup> )	Volumen de cosecha (L)	Capacidad de carga de cosecha (cel/mL x 10 <sup>6</sup> )	Biomasa húmeda (g)	Biomasa seca (g)	BH/BS (%)	Productividad (mg/L/día)	Observaciones

### Anexo 14. Registro de Perfiles proximales de lípidos, proteínas, carbohidratos y humedad de dos cepas de microalgas del género *Desmodesmus*; IMP-BG-214 e IMP-BG-249 en sistema de cultivo tipo Tanque (T), cultivados en condiciones de Invernadero

Código de cepa	Humedad %	Lípidos %	Carbohidratos %	Proteínas %	Cenizas %
IMP-BG-249	4,78 ± 0,16	13,28 ± 0,16	17,20 ± 1,22	26,13 ± 0,59	16,21 ± 0,84
IMP-BG-214	6,26 ± 0,24	10,11 ± 0,8	10,60 ± 0,80	33,16 ± 0,32	5,28 ± 0,08



# AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT) y al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) con sus diferentes programas, por la confianza y el financiamiento de diversos proyectos, como el de *“Determinación de la biomasa microalgal potencialmente acumuladora de lípidos para la obtención de combustibles”*, en el año 2008, en donde el Imarpe participó como entidad ejecutora, así como en el 2013 con el proyecto *“Desarrollo de un protocolo biotecnológico para la obtención de aceite de microalgas rico en DHA utilizando biorreactores tubulares”* en el cual el Imarpe contribuyó como entidad asociada; ambos tuvieron resultados para la aplicación y mejora de los procesos de cultivo microalgal.

Asimismo, nuestro más profundo agradecimiento al Instituto del Mar del Perú (Imarpe), por las facilidades brindadas al contribuir con el financiamiento, el respaldo y apoyo constante desde el año 2002 hasta el 2012, a través de la Asignación Presupuestal que No Resultan en Productos (APNOP) y desde el 2013 hasta la actualidad, con la administración de los recursos financieros del Presupuesto por Resultados (PpR).

También se agradece a las diferentes instituciones académicas tales como la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y la Universidad Nacional del Santa (UNS) en Chimbote, quienes, desde su ámbito de acción, contribuyeron en el proceso de producción de la biomasa microalgal, de igual manera, a todas las personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de este instructivo.

A todos ellos nuestro agradecimiento.









**IMARPE**  
INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ  
Esquina Gamarra y General Valle s/n Chucuito – Callao  
Teléfono: (051) 208-8650  
[www.imarpe.gob.pe](http://www.imarpe.gob.pe)