

MANUAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL EN CONDICIONES DE INVERNADERO

HANDBOOK FOR THE PRODUCTION OF MICROALGAL BIOMASS UNDER GREENHOUSE CONDITIONS

Alberto Oscanoa¹

Miguel Cervantes

Priscilla Febrero

RESUMEN

OSCANOA A, CERVANTES M, FEBRERO P. 2020. *Manual para la producción de biomasa microalgal en condiciones de invernadero*. Inf Inst Mar Perú. 47(3): 332-356.- El Manual para la producción de biomasa microalgal en condiciones de invernadero está basado en las investigaciones efectuadas por la Dirección General de Investigaciones en Acuicultura del Instituto del Mar del Perú (IMARPE). Se presentan los aspectos básicos para el cultivo masivo de microalgas en tanques y biorreactores, en base a las características de la infraestructura del IMARPE. El manual está estructurado en secciones que detallan los procesos, se describen e ilustran los materiales requeridos, el procedimiento a realizar en forma de instrucciones numeradas. Cuenta también, con un glosario de términos y formatos de recolección de datos.

PALABRAS CLAVE: microalgas, cultivo, biorreactores, Perú

ABSTRACT

OSCANOA A, CERVANTES M, FEBRERO P. 2020. *Handbook for the production of microalgal biomass under greenhouse conditions*. Inf Inst Mar Peru. 47(3): 332-356.- The Directorate-General for Aquaculture Research of the Instituto del Mar del Perú (IMARPE) has developed a handbook for the production of microalgal biomass under greenhouse conditions. We present the basic aspects for the massive culture of microalgae in tanks and bioreactors, based on the characteristics of IMARPE's infrastructure. This document is structured in sections that explain the processes, describe and illustrate the materials required and the procedure to be carried out as numbered instructions. It also includes a glossary of terms and data collection formats.

KEYWORDS: microalgae, culture, bioreactors, Peru

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen un grupo diverso de microorganismos que presentan amplio espectro de formas y tamaños que varían de 1 a 200 μm ; tienen pigmentos fotosintéticos como clorofila (a, b, c) y carotenos; su forma de vida puede ser unicelular o colonial (MADIGAN *et al.*, 2004). Fijan más del 40% del carbón de la tierra, ofreciendo a la biósfera oxígeno. Su importancia ecológica está basada en su abundancia, su extrema biodiversidad y la habilidad de sobrevivir en una variedad de ambientes (BERG *et al.*, 2002; NORTON *et al.*, 1996). Para su desarrollo requieren de CO_2 , nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y otros nutrientes menores.

El potencial de las microalgas es alto, sobre todo si tomamos en cuenta que existen varios millones de especies, en comparación con las 250000 especies de plantas terrestres (BRENNAN & OWENDE, 2010). Solo el 1% de las especies

de microalgas han sido estudiadas para la obtención de sustancias bioactivas. Son una gran reserva de nuevos compuestos únicos e interesantes (YAMAGUCHI, 1997). A mediados del siglo XX, fue cuando la biotecnología de microalgas comenzó a desarrollarse y hoy en día existen numerosas aplicaciones comerciales de ellas.

Sin embargo, y a pesar de las primeras expectativas, la explotación comercial de las microalgas se ha visto limitada a un número reducido de especies y a países con gran potencial tecnológico, donde se realizan cultivos tecnificados y relativamente costosos (PULZ & GROSS, 2004). El cultivo de microalgas es una actividad con niveles de producción limitados debido a una serie de factores (MENDOZA *et al.*, 2011). A pesar de estas circunstancias, el cultivo de microalgas a gran escala, en grandes tanques de cultivo a cielo abierto es una actividad que ha propiciado la aparición de grandes y rentables explotaciones.

¹ IMARPE, Dirección General de Investigaciones en Acuicultura. aoscanao@imarpe.pe

En Perú, son escasas las industrias dedicadas a esta actividad, por este motivo el manual tiene por objetivo, proporcionar una guía práctica que permita establecer las nociones básicas para el manejo adecuado que requieren los cultivos de microalgas, teniendo como fuente de producción principal las especies de microalgas marinas; *Nannochloropsis oceanica*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloris maculata* y las de agua dulce *Desmodesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris*, entre otras que pueden ser adaptadas al flujo de cultivo.

La metodología a aplicar en cada uno de los procesos, se basa en los trabajos efectuados en el Laboratorio de Invernadero y Sala de Procesos (Laboratorio de Biotecnología Acuática) en la sede central de IMARPE, información que se pone a disposición de quienes quieran incursionar en esta actividad. El creciente interés por invertir en esta actividad, nos compromete a seguir mejorando los procesos de producción en los diferentes niveles de cultivo, lo que permitirá proporcionar información a futuro, que conlleve a una actividad menos costosa y más rentable, teniendo como base principal el mitigar cualquier impacto negativo al medio ambiente. El manual pretende servir de base para el desarrollo de la producción de biomasa microalgal en condiciones de invernadero en el litoral peruano, rico en lugares idóneos y en especies aptas para su cultivo.

El interés en el cultivo de microalgas para lograr cultivos masivos a fin de obtener compuestos de interés por el potencial biotecnológico llevó al IMARPE a desarrollar investigaciones en estos organismos. En el año 2008, con el apoyo del Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT) se logró el acondicionamiento del Laboratorio de Invernadero y Sala de procesos, el equipamiento del Laboratorio de Análisis Instrumental y se iniciaron las investigaciones para la producción de biomasa microalgal y la determinación de metabolitos de interés científico.

Marco teórico

Las microalgas han sido durante mucho tiempo objeto de un gran interés como una fuente alternativa de alimentos y sustancias bioactivas.

Si bien en un primer momento fueron consideradas como una fuente de proteínas (proteína unicelular), al menos tan buena como otros vegetales y mucho más barata, los estudios realizados a lo largo de la década de los ochenta demostraron que la productividad y los costes de los cultivos intensivos de microalgas distaban de ser plenamente competitivos con la agricultura tradicional (SPOLAORE, 2006). En la actualidad son consideradas una fuente potencial, aún no suficientemente explorada, de sustancias bioactivas de interés en la industria alimentaria, farmacéutica y energética (CLARSSON *et al.*, 2007).

Estas sustancias alcanzan gran valor en el mercado internacional y su demanda va en aumento al mismo ritmo que el desarrollo de la tecnología industrial, la biotecnología y la demanda internacional de nuevos medicamentos y compuestos de alimentación (SKJANES, REBOURS & LINBLAND, 2013). Las microalgas constituyen un grupo de microorganismos cuyos usos potenciales aún no han sido suficientemente estudiados. Se han descrito más de 40000 especies de microalgas, sin embargo, menos del 1% ha sido sometido a trabajos de *screening* para identificación de nuevas sustancias bioactivas o potenciales aplicaciones industriales o agrarias (MENDOZA *et al.*, 2011).

Uno de los primeros trabajos sobre la explotación comercial de las microalgas fue el publicado por BURLEW (1953). Desde entonces han sido diversos los usos potenciales atribuidos a las microalgas y grandes las expectativas que se han forjado en torno a su cultivo, así tenemos, su utilización como piensos para animales, como biofertilizantes o en el tratamiento de aguas residuales, obtención de hormonas como las auxinas y giberelinas (MENDOZA *et al.*, 2011).

Como limitantes en el cultivo de microalgas MENDOZA *et al.* (2011) mencionan los siguientes factores:

- Las microalgas tienen baja eficiencia fotosintética en condiciones de alta irradiación luminosa así como un estrecho margen de respuesta a las variaciones de ella, lo que repercute en tasas de crecimiento bajas y en la dificultad de optimizar su cultivo a gran escala.

- Los cultivos en grandes tanques a cielo abierto, aunque baratos y sencillos, son vulnerables a la contaminación con microdepredadores e incluso con algas oportunistas, también resultan sensibles a las variaciones de las condiciones ambientales. Esto dificulta el control y la estabilidad de los cultivos a gran escala en este tipo de sistemas, reduciendo a un escaso número las especies cultivables, como aquellas adaptadas a condiciones de cultivo extremas que dificultan la contaminación con organismos competidores o depredadores.
- Los sistemas de cultivos cerrados (fotobiorreactores) aunque permiten alcanzar mayores producciones resultan costosos y complejos. A la larga ven mermada su eficiencia productiva por contaminación o pérdida de superficie iluminada, por efectos de adherencias orgánicas, precipitados, astillados o arañazos o la existencia de espacios muertos de baja turbulencia o de renovación.

Para el cultivo de microalgas es necesario el conocimiento de la cinética de crecimiento de cada especie en un determinado volumen. Independientemente de cada especie y el volumen al que se cultiva se puede reconocer el patrón estándar de crecimiento (fases: lag o fase de adaptación, exponencial, declinación relativa de crecimiento, estacionaria y de muerte).

Sistemas de cultivo

Sistemas cerrados.- Estos sistemas gracias a su diseño presentan una serie de ventajas respecto de los sistemas abiertos, por ejemplo se reduce al mínimo la contaminación biológica garantizando monocultivos, permiten un mejor control sobre los parámetros físicos químicos, reducción de pérdidas de CO₂, presentan mayores productividades y además permiten producción de metabolitos complejos (PALOMINO *et al.*, 2010). Como ejemplos de sistemas de cultivos cerrados tenemos: fotobiorreactor tubular vertical, fotobiorreactor tubular horizontal y fotobiorreactor de columna vertical (UGWU *et al.* 2008) (Fig. 1).

Sistemas abiertos.- Tienen mayor demanda en la realización de cultivos comerciales,

así por ejemplo tenemos lagos, lagunas y estanques tanto naturales como artificiales, la razón de su mayor empleo radica en que son menos costosos y más prácticos de construir y operar, su diseño generalmente está ligado a las condiciones y disposición de materiales locales (RICHMOND, 1999; BECKER, 1994; SUH & LEE, 2003) (Fig. 2).

Parámetros de cultivo

Luz.- La luz ejerce influencia en la composición bioquímica celular de las algas fotosintéticas, además promueve cambios en las propiedades ultraestructurales, biofísicas y fisiológicas, buscando aumentar el crecimiento y fotosíntesis de las microalgas (DUBINSKY *et al.*, 1995).

El nivel de lípidos de ácidos poliinsaturados presenta una relación inversamente proporcional con el nivel de la intensidad de luz (COHEN, 1999).

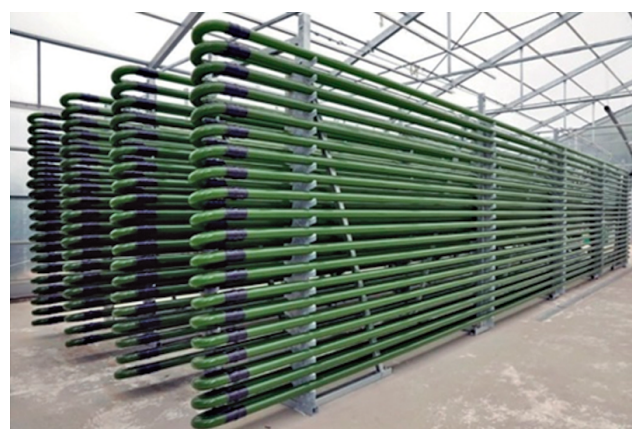


Figura 1.- Sistemas de cultivos cerrados: biorreactor tubular horizontal y biorreactor tubular vertical



Figura 2.- Sistemas de cultivos abiertos: estanques circular y *raceways*

Temperatura.- Es uno de los factores ambientales más importantes a nivel de las reacciones bioquímicas (RICHMOND, 2004). Ejerce influencia en el grado de instauración de los lípidos, por tanto una disminución de la temperatura de crecimiento óptimo, aumenta el grado de instauración de los lípidos (NISHIDA & MURATA, 1996).

pH.- Es importante para el crecimiento de las microalgas, el rango óptimo para el cultivo oscila entre 7 y 9 (Ho *et al.*, 2011). Los valores de pH generan disociación de ciertas sales pudiendo tener efecto tóxico o inhibitorio para el desarrollo de las microalgas (RICHMOND, 1986).

Salinidad.- Este parámetro puede causar efectos negativos en el crecimiento de microalgas, la salinidad de 35% o superior puede conducir a una reducción en tasa de crecimiento, eficiencia de la fotosíntesis y respiración en oscuro (JACOB *et al.*, 1991). La salinidad regula el crecimiento

mediante la ósmosis, siendo muy variable entre microalgas, pudiendo promover efectos letales en el cultivo (BONEY, 1989).

Aireación.- Asegura la distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, de esta manera se generará mayor aprovechamiento mejorando la distribución de la luz asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas, (RICHMOND, 1986).

Nutrientes.- Son importantes para el crecimiento de las microalgas, el más importante es el carbono, cuya fuente principal es el dióxido de carbono, que representa aproximadamente 50% en peso seco (CHISTI, 2007); el nitrógeno representa entre 7 a 10%, en peso seco constituyendo proteínas, clorofila entre otros; el fósforo constituye el 1% en peso seco, e interviene en procesos metabólicos en las microalgas (RICHMOND, 1986).

Técnicas de cosecha

Las microalgas presentan diferentes tamaños, densidad y diferentes fines comerciales, por tanto la elección del método de cosecha depende de las características mencionadas (OLAIZOLA, 2003). Se cuenta con los siguientes métodos de cosecha:

Centrifugación.- Método de cosecha probablemente el más eficaz, pero a su vez el más costoso, ya que requiere de gran consumo energético (MOLINA *et al.*, 2003; RICHMOND & BECKER, 1996).

Filtración.- Es un método que precisa de abundante mano de obra y constante cambio de filtros (BECKER & VENKATARAMAN, 1982)

Flotación.- Proceso de separación por gravedad, consiste en la captura de partículas mediante burbujas de aire o de gas, que luego son transportados a la superficie del líquido (ÁLVAREZ y GALLARDO, 1989). CHEN *et al.* (1998) indican que la flotación es una técnica más beneficiosa y efectiva que la sedimentación.

Sedimentación.- Enfocada para cosecha de diatomeas, ya que para microalgas con diámetros menores que las diatomeas, la sedimentación no es rápida por tanto resulta ser poco eficaz (RICHMOND & BECKER, 1986; REYNOLDS, 1984).

Procesamiento de la biomasa

Obtención de biomasa húmeda.- La recolección de microalgas o cosecha, es una de las etapas claves para la viabilidad del proceso, pues en los cultivos las microalgas están muy diluidas, variando de 0,5 a 1 g/L, lo que dificulta la obtención de la biomasa.

Existen diversos procesos de recolección, pasando desde procesos mecánicos como la centrifugación a biológicos como la biofloculación, además de flotación por surfactantes o floculación con polielectrolitos artificiales o naturales como el quitosano. El éxito de esta etapa depende de varios factores, entre ellos el tipo de alga, el proceso productivo, la presencia de otras algas, la velocidad de producción, etc. (OSORIO, 2008). No existe un solo método genérico aplicable a todos los tipos de cultivo, sin embargo es posible afirmar que los procesos tradicionales como centrifugación o floculación química son recomendables si el producto que se genera es de alto valor comercial, o si hay etapas previas de concentración (OSORIO, 2008). La biomasa húmeda, puede usarse sin necesidad de secarla para obtener concentrados de aminoácidos y bioetanol, lo que repercute en la reducción de costos (GARCÍA *et al.*, 2012).

Otro método es la separación fototáctica, que se basa en la capacidad que tienen algunas microalgas móviles de desplazarse hacia una fuente de luz de determinada longitud de onda, y que sólo se ha realizado en tanques de pequeña superficie y algunos autores consideran que no es aplicable a mayor escala debido a la alta viscosidad del material a filtrar y por presencia de otras partículas en el cultivo que contaminan la biomasa recogida (REDDY, 2001). Un método alternativo de carácter simple y económico es la filtración por gravedad, que se realiza empleando filtros de arena fina, tierra de diatomeas y fibras de celulosa. El medio obtenido tras la filtración puede ser reutilizado, cabe resaltar que las algas colapsan rápidamente el filtro, siendo necesario lavarlo con frecuencia, el costo relativo de este método es mayor que el de la centrifugación (NURDOGAN & OSWALD, 1996).

Obtención de biomasa seca.- La biomasa cosechada es un producto perecedero y debe tratarse con rapidez; para evitar su deterioro

se suele utilizar técnicas de deshidratación o secado para ampliar la viabilidad en función del producto final requerido.

Los métodos que han sido adaptados y desarrollados, además de ser los más utilizados son: el secado al sol que permite obtener biomasa seca con menos de 10% de humedad y biológicamente es catalogada como de buena calidad, además es el método más barato, pero las principales desventajas son los largos tiempos de secado, necesidad de grandes superficies, y el riesgo de pérdida de material (PRAKASH *et al.*, 1997) y el secado por aspersión, el cual es utilizado para la extracción de productos de alto valor, sin embargo es relativamente caro y se corre el riesgo de causar un importante deterioro de algunos pigmentos (DESMORIEUX & DECAEN, 2006).

Otras técnicas utilizadas son: i) secado en tambores o rodillos (PRAKASH *et al.*, 1997) que es uno de los más eficientes en términos de consumo de energía y muy efectivo para secar líquidos con alta viscosidad; consiste en esparcir una capa ligera sobre la superficie de un par de tambores que están girando y siendo calentados por dentro mediante vapor; ii) secado en lecho fluido (LEACH *et al.*, 1997) implica secado, enfriamiento, aglomeración, granulación y revestimiento de los materiales en gránulos, es ideal para una amplia gama de productos sensibles y no sensibles al calor; iii) la tecnología de secado detallado en NINDO *et al.* (2007) ofrece una temperatura en el interior del producto de menos de 70 °C y tiempos de secado cortos, el material se coloca sobre una película de plástico que es transparente a la radiación infrarroja, la película flota en la superficie de agua caliente de modo que la energía térmica para la evaporación de humedad se transfiere desde el agua caliente para el material húmedo principalmente a través de la radiación infrarroja y otras técnicas como la liofilización, es igualmente costosa, especialmente para las operaciones a gran escala, pero facilita la extracción de aceites, ya que los elementos intracelulares, como aceites, son difíciles de extraer de la biomasa húmeda con disolventes sin ruptura de la célula, pero se extraen más fácilmente de la biomasa liofilizada (MOLINA *et al.*, 1994).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

En la Tabla 1 se da a conocer los equipos y materiales para el cultivo de microalgas

Tabla 1.- Equipos y materiales necesarios para el cultivo de microalgas

Equipos	Material	
Microscopio óptico binocular Leitz	Hipoclorito de sodio (lejía) x 2,5 L	Rollo de bolsa de polietileno x 60 kg (200 bolsas)
Traspaleta de 2 TM de capacidad	Lugol	Módulo de metal para biorreactores
Bomba succionadora de agua 1 HP	Detergente granulado x 15 kg	Piedras difusoras de aire de 2 x 1,5 cm para acuario
Bomba succionadora de agua 5 HP	Cámara Neubauer	Plomos cilíndricos para pesca de 50 g
Selladora con alambre de Micrón	Tanque de fibra de vidrio de 300 L, para transporte y acopio de cultivo	Gas carbónico CO ₂ x 30 kg
Contómetro celular	Tanque de fibra de vidrio para siembra	Agua destilada x 1 L
Multiparámetro de campo WTW	Manguera de 1" x m	Balde plástico de 20 L
Sistema de esterilización por UV (biofiltro, conos porta filtro, lámpara UV)	Mangueras siliconadas de 1/8" x m	Malla tipo talega de 1μ
Sistema de aireación	Pipetas Pasteur caja x 1000	Jarras de 1 y 2 L
Blower de alta presión de 3 HP	Portaobjetos caja x 100	
Luxómetro	Cubre objetos	
Sistema de inyección de CO ₂	Vial de 10 mL	
Termómetros de máxima y mínima	Esponja verde lavavajilla	
Módulo de metal para biorreactores	Guantes industriales x 1 par	

IMPLEMENTACIÓN DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO

Limpieza de tanques

Mezcle en una jarra de dos litros, 100 mL de agua potable, 200 mL Hipoclorito de sodio (lejía) 4,5% P/V y 10 g de detergente industrial granulado, homogenice toda la mezcla (Fig. 3a, b, c).

Colóquese guantes de jebe industrial, vierta la mezcla al tanque (Fig. 3d) y con la ayuda de esponja lava vajilla, proceda a limpiar toda la superficie interna del tanque (Fig. 3e).

Enjuague el interior y bordes del tanque con abundantes chorros de agua.

Para implementar el sistema de cultivo en tanques, prepare y coloque de acuerdo al volumen a cultivar, proceda de la misma forma expuesta anteriormente (Fig. 3f).

Transporte y recepción del inoculo

El inóculo, que procede de la Sala de Microalgas (cultivos intermedios), cultivados en tanques cilindro cónicos de 250 L, debe ser verificado antes de iniciar su transporte, utilice un microscopio (comprobar presencia de protozoarios, bacterias y/o hongos) (Fig. 4a).



Figura 3.- Implementación de tanques de cultivo. a) material para el lavado de tanques de fibra de vidrio; b) dilución de hipoclorito de sodio; c) incorporación de detergente granulado; d) Vertido de solución para lavado de tanque; e y f) lavado y enjuague de tanque de fibra de vidrio

De no presentar contaminantes, con la ayuda de una bomba hidráulica de 0,5 Hp, trasvase el inóculo del tanque cilindro cónico al tanque de fibra de vidrio, puede usarse un carro hidráulico para facilitar el transporte (Fig. 4b, c).

Homogenizar el cultivo (Fig. 4d) tome una alícuota del inóculo, fije en Lugol y determine la densidad celular por la técnica de conteo en cámara de Neubauer (Anexo 2).

Sistema de biorreactores tubulares de 30 L

Cortar 2,30 m de largo de láminas tubulares de polietileno (de 8 µm de espesor y 25 cm de ancho) (Fig. 5a).

En un extremo del tubo se forma dobles de 35cm (Fig. 5b), sellar tres veces hasta formar un dobles resistente (Fig. 5c, d), en el extremo opuesto se doblan 10 cm, se sellan dos veces para obtener una bolsa de 180 cm de alto y se colocan en los módulos (Fig. 5e).

Para la implementación de un biorreactor (módulo de cultivo) prepare y coloque 20 bolsas, con mangueras siliconadas de 1/8", 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 CO₂.



Figura 4.- a) Observación microscópica y determinación de densidad celular, b) biorreactores cilindro cónicos con inóculo; c) traslado de inóculo; d) acopio de microalgas, proveniente de la Sala de microalgas (Cultivos intermedios) en el Laboratorio de invernadero y sala de procesos

Siembra de inóculo

Llenar las bolsas de los biorreactores o tanques al 50% con agua filtrada a una micra y pasada por radiación UV, luego iguale los otros 50% con el inóculo (Fig. 6a). Agregue nutriente foliar Bayfolan® en la dosis de 0,07 mL/L.

Encienda la bomba aireadora y el sistema de inyección de CO₂, cerciorándose que cada tanque de cultivo o biorreactor tenga una correcta aireación (Fig. 6b).

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 (Anexo 2).

Mantenimiento de cultivo

Diariamente registre los parámetros abióticos (pH, temperatura de cultivo, oxígeno disuelto, salinidad), empleando un Multiparámetro de campo WTW i305 (Anexo 2). Mantenga el pH en 7 – 7,5 con inyección de CO₂, la temperatura no debe superar los 35 °C ni ser menor a 16 °C.

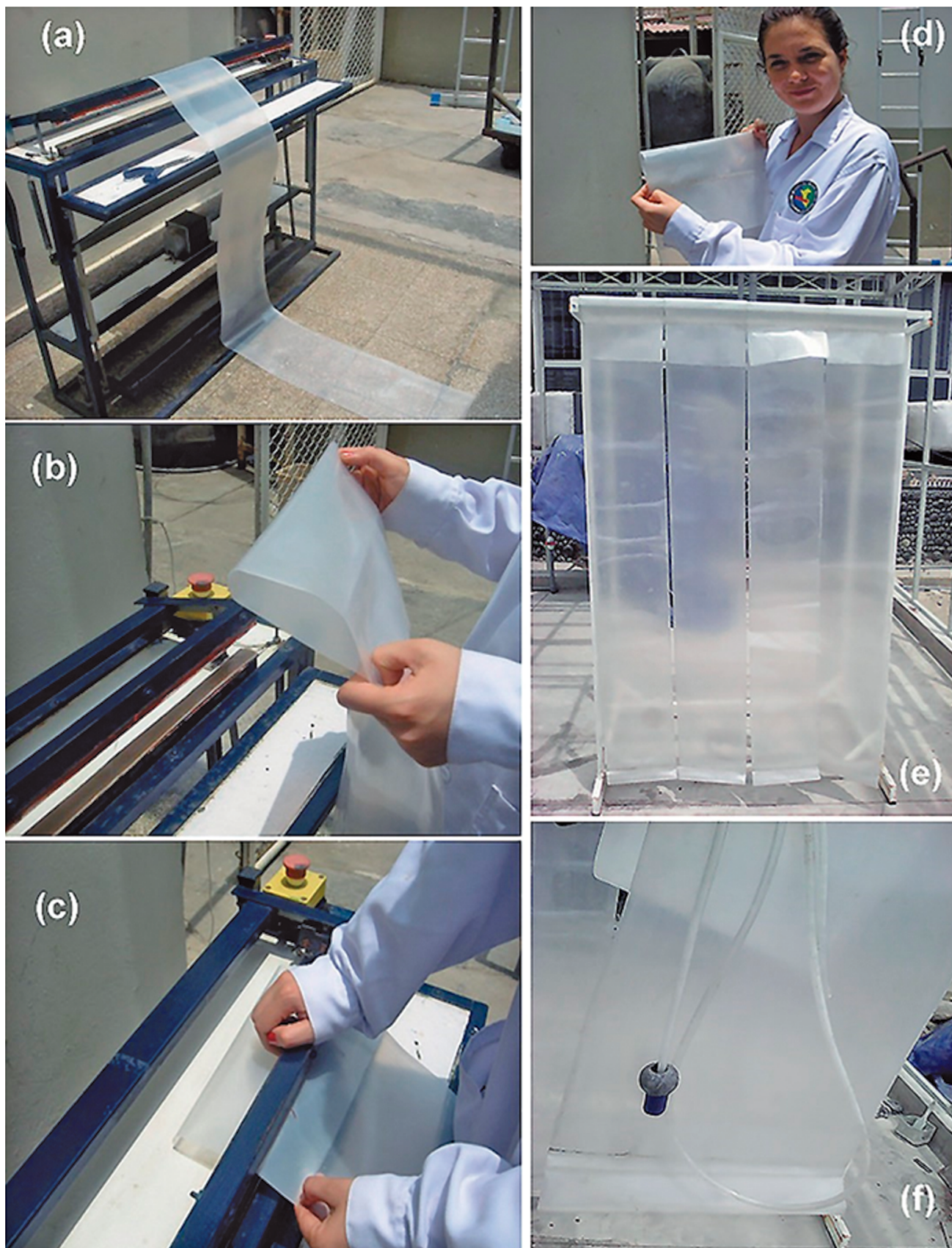


Figura 5.- Implementación de biorreactores; a) selladora y bolsa de polietileno cortada; b) formación de ojal; c) sellado de ojal formado, d) forma final de ojal y sellado; e) disposición final de los módulos, las bolsas y (f) sistema de aireación, implementando los sistemas tipo biorreactores en condiciones de invernadero (Laboratorio de invernadero y sala de procesos)

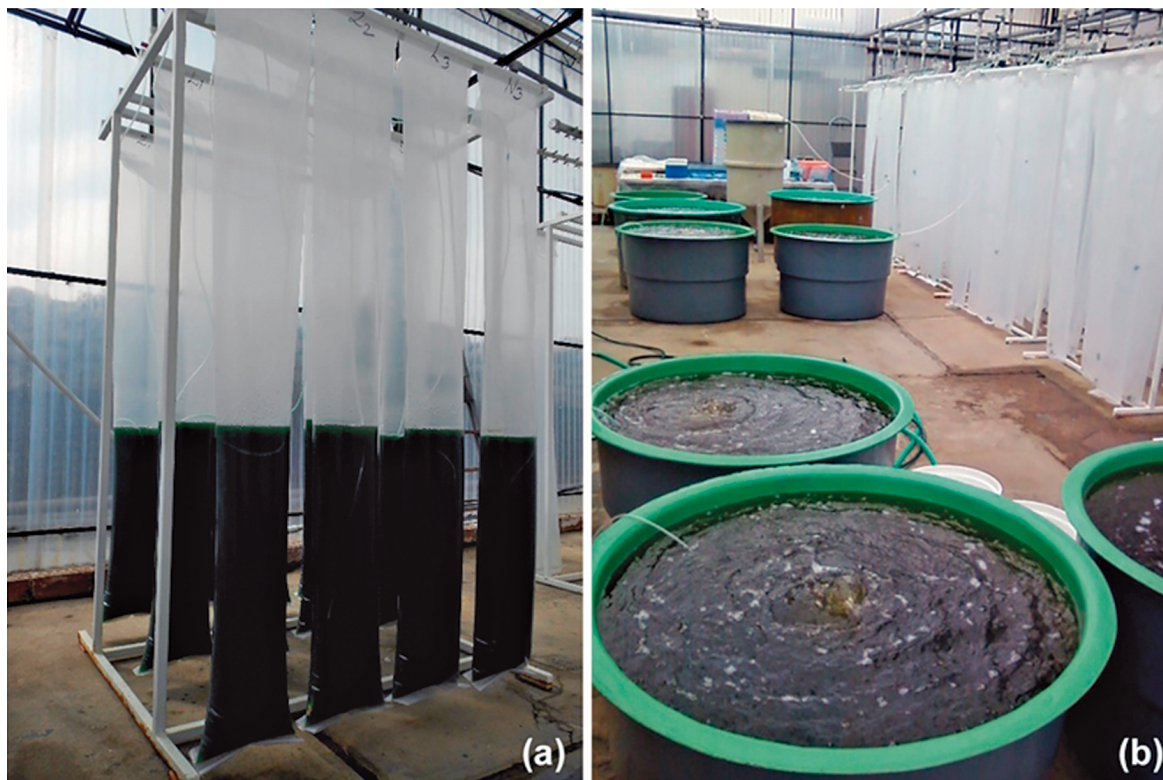


Figura 6.- a) Siembra en los módulos de biorreactores tubulares verticales b) Siembra en los tanques de fibra de vidrio, con la adecuada aireación, cultivos realizados en condiciones del laboratorio de Invernadero y Sala de procesos

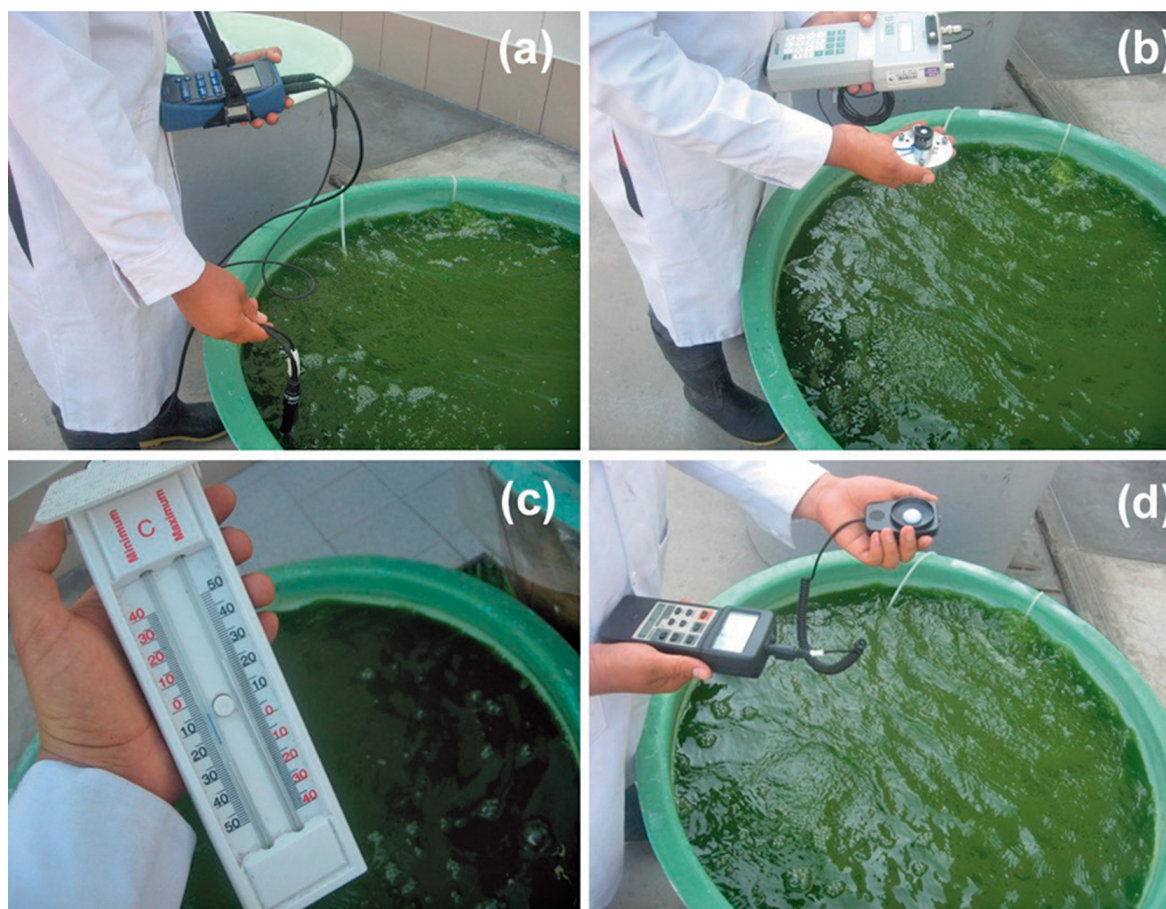


Figura 7.- Medición de parámetros bióticos y abióticos. a) medición de parámetros abióticos de cultivo, b) medición de la radiación fotosintéticamente activa; c) medición de la temperatura del ambiente, y d) medición de la intensidad luminosa

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 (Figs. 7b, c, d, Anexo 4).

Finalmente, también tome muestras del cultivo y revise el tamaño celular fijando con Lugol la muestra y haga el conteo celular en cámara de Neubauer, también revise la contaminación (Anexo 2).

Cosecha y obtención de biomasa húmeda

En la Tabla 2 se enlista el equipo y material necesario para esta actividad

Tabla 2.- Equipo y material para cosecha de microalgas

Equipo	Material
Centrífuga de limpieza manual GEA WESTFALIA modelo OTC2	Bandeja rectangular de acero inoxidable de 38 x 36 x 3 cm
Bomba de succión Nemo®	Placa Petri de vidrio de 60 x 15; 100 x 20; 150 x 25 o 150 x 30 mm
Congeladora (Temperatura promedio -20°C)	Espátula de plástico con mango de madera de 20 cm
Balanza analítica y/o electrónica	Cuchara espátula de metal de 120 mm
Calculadora	Bandeja rectangular de acero inoxidable de 38 x 36 x 3 cm

Acopio de cultivos

Acopie todo el cultivo a cosechar en un tanque de 300 o 600 L, para lo cual puede aplicar la técnica del sifoneo (Fig. 8).

Instalación y manejo del equipo de centrifugación

Un recipiente de 80 L de capacidad llenarlo con agua potable, colocar la manguera de succión que está conectada a la bomba de succión Nemo® (Fig. 9), coloque la manguera de retorno en la canaleta de desagüe, encienda la bomba y empleando el variador de velocidad Allen Bardley ajústelo a una velocidad media de salida de 20 L/h, para cebar y limpiar la bomba, transcurrido 3 minutos apagar.

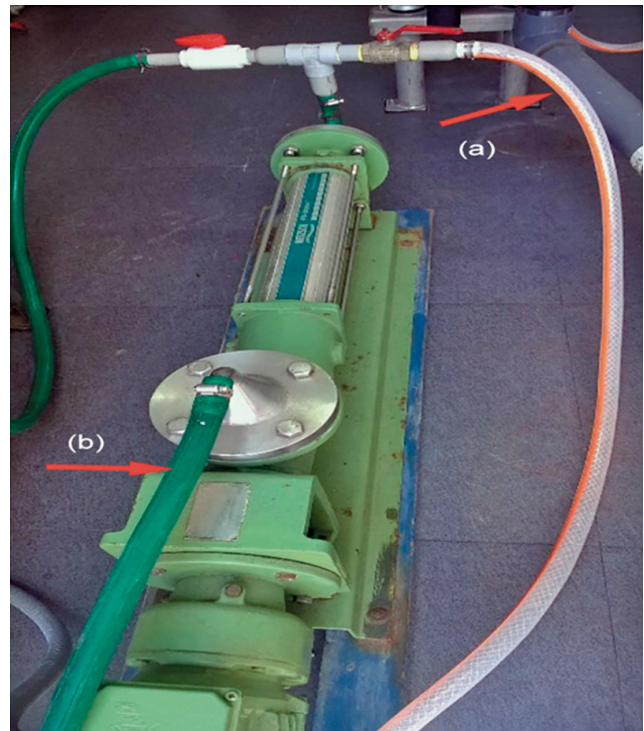


Figura 8.- Mangueras de sifoneo



Figura 9.- Disposición final de sistema de recirculación por bomba de succión. (a) Manguera de retorno de cultivo, (b) manguera de succión centrifugación

Arme la centrífuga de limpieza manual, apilando los discos en el eje del cabezal (Fig. 10a), encima de ellos colocar el separador de discos y seguidamente coloque el bowl (Fig. 10b).

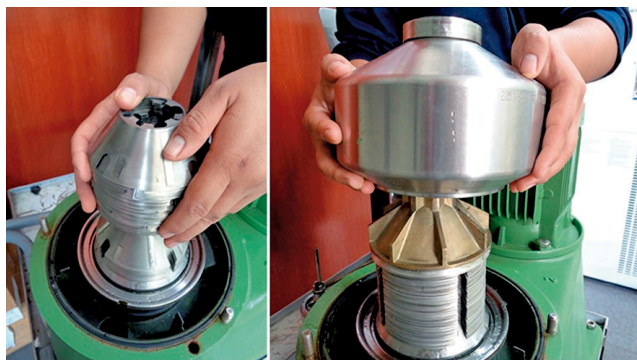


Figura 10.- Disposición de discos sobre eje de centrifuga, posición final de separador de discos y colocación de colector

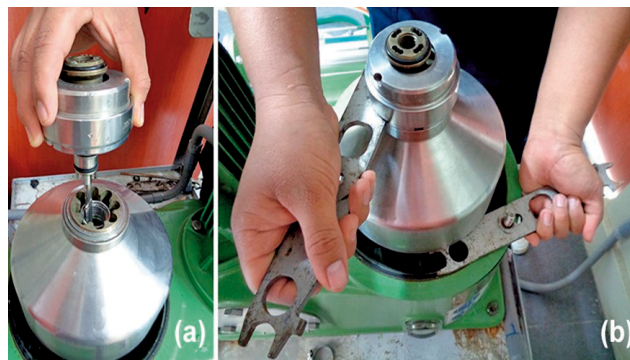


Figura 11.- a) Ensamblaje de anillo enroscado a colector, b) ajuste y posición final de colector y anillo enroscado

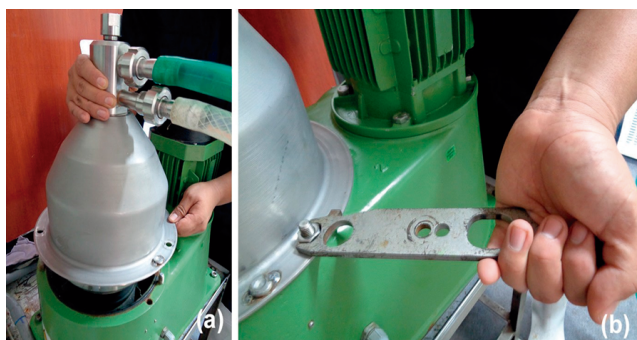


Figura 12.- a) Disposición de campana; b) Ajuste de tuercas de seguridad

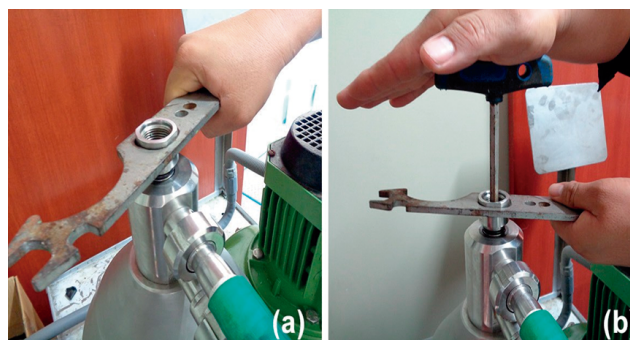


Figura 13.- a) Posición correcta de llave gancho, b) ajuste y llave tipo T

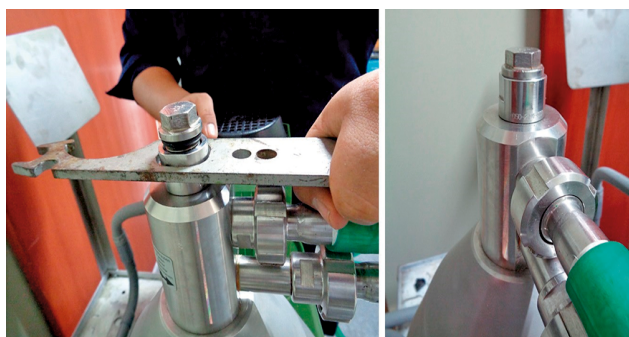


Tabla 14.- Conclusión de instalación de centrifuga

En la parte superior del *bowl* acople el anillo roscado (Fig. 11a), para su correcto posicionamiento emplear dos llaves de gancho, con una de ellas se fija el *bowl* y con la segunda se coloca el anillo roscado a la parte superior del *bowl* para lo cual se gira la llave en sentido antihorario (Fig. 11b).

Seguidamente coloque la campana encima del *bowl* (Fig. 12a) y fíjela empleando las 3 tuercas de aseguramiento, para lo cual se emplea la llave de gancho que tiene cuencas hexagonales (Fig. 12b).

En la parte superior de la campana existe una conexión empuñadora, disponer en ella la llave de gancho, por la cavidad que calza con la conexión (Fig. 13a), seguidamente introducir la llave tipo T, presione y gire la llave de gancho en sentido antihorario (Fig. 13b). El armado de la centrifuga concluye al enroscar la tapa rosca en la conexión empuñadora (Fig. 14).

Una vez armada la centrifuga de limpieza manual, proceda a encenderla, para lo cual en el panel electrónico gire la llave de encendido a 1 y pulse ON (botón negro) (Fig. 15a), esperar que



Figura 15.- Proceso de centrifugación: a) a la izquierda panel electrónico de la centrífuga, a la derecha el variador de velocidad A. Bardley, b) sistema de recirculación de cultivo, bomba de succión Nemo® (flecha amarilla), tanque de acopio de cultivo (flecha roja), c) disposición final de sistema de centrifugación, centrífuga de limpieza manual (flecha roja), bomba de succión (flecha amarilla), posición final de llaves de paso del sistema de recirculación e ingreso de cultivo hacia centrífuga (círculo rojo); d) posición final de mangueras de ingreso (flecha roja) y mangueras de salida después de centrifugación (flecha amarilla)

la centrífuga alcance la 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, observe salida del cultivo, inmediatamente sumérgalo al tanque y continúe con la recirculación (Fig. 15b).

Coloque la manguera en la llave de ingreso hacia centrífuga y abra llave de paso hacia la centrífuga y cierre gradualmente llave de paso de manguera de retorno de cultivo (Fig. 15c), dependiendo del tipo y tamaño de las microalgas el flujo de salida de cultivo centrifugado varía entre 120 – 200 L/hora (Fig. 15d).

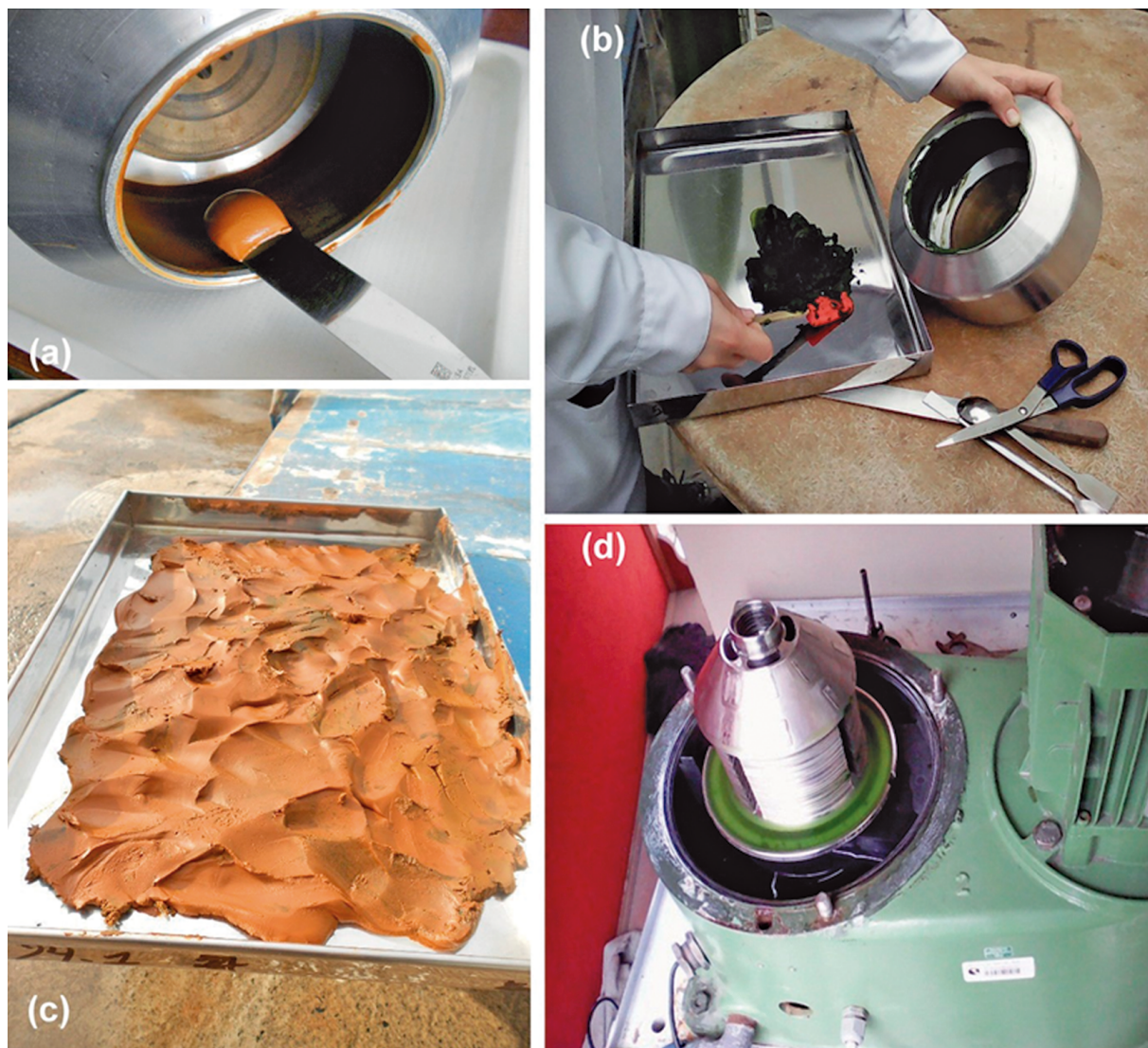


Figura 16.- a) Colector *bowl* con biomasa húmeda, b) retiro de biomasa húmeda, c) biomasa húmeda esparcida en envase (bandejas de acero inoxidable de 38 x 36 x 3 cm), d) limpieza de accesorios de centrífuga de limpieza manual (discos de separación)

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

Prepare un envase con aproximadamente 80 L de agua potable, antes que termine de centrifugar el cultivo, cierre llave de paso de manguera que ingresa cultivo a centrífuga y realice recirculación del equipo de succión con el agua potable recolectada aproximadamente por cinco minutos y apague el variador de velocidad, realice este procedimiento a fin de dejar limpio el equipo de succión.

Cuando comience el enjuague del equipo de succión, también apague la centrífuga, 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 centrífuga proceda de manera inversa al procedimiento de armado de centrífuga.

Retiro de biomasa húmeda

Una vez desarmado el equipo retire el *bowl* (Fig. 16a), en seguida con la ayuda de una espátula extraiga toda la biomasa recolectada (Fig. 16b), esparza la biomasa en recipientes, máximo espesor de 1,5 cm de altura, finalmente limpie y lave los accesorios de la centrífuga y materiales utilizados.

Para terminar el proceso, pese y rotule el envase donde fue recolectada la biomasa húmeda (Anexo 5). Para su conservación y continuar con el siguiente proceso coloque el envase en una congeladora -20 °C.

BIOMASA SECA

En la Tabla 3 se dan a conocer el equipo y los materiales necesarios.

Instalación del Liofilizador

Antes de encender el liofilizador, limpie el cubículo del StopperingTrayDryer (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 cerradas, verifique el colector, la llave central, que intercomunica ambas partes, y el sistema de vacío, de manera que no tenga ninguna fuga (Fig. 17).

Verifique que el equipo mantenga la programación establecida.

- *Stoppering Tray Dryer* (Panel superior)
 - Ubique el *DISPLAY* en *MANUAL LabconcoTraydry*, versión 104117D

- Modo manual, P1/Seg 1 Ramp 0,40 °C.Mn, Hold -35 °C, time 12.0.
- *FreeZone* o *Freeze Dry Systems* 18L (Panel inferior)
 - Presione *MENU*
 - *Labconco Freezdry*, versión 10411E
 - Modo automático, *Vacuum set point*: 0.100 mbar, *R5-232 Transmission Rate*: 10 seg

Antes de iniciar cada proceso de liofilización, anote en formato las horas de uso tanto de *Stoppering Tray Dryer* y como del *FreeZone* (Fig. 18, Anexo 6).

- *Stoppering Tray 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 anote.
- *FreeZone* (panel inferior) Encienda el *switch*, presione el botón *MENU* hasta ubicar *REFRIG TOTAL HOUR* y *SERVICE HOUR*, presionar una vez más y anotar *REFRIG TOTAL HOUR* y *VACUUM HOUR*, las horas de *VACUUM* no deben exceder las 1000 horas, caso contrario reinicie conteo, presionando *SELECT* por 5 segundos y luego aceptar reinicio.

Tabla 3.- Equipo y materiales para obtención de biomasa seca

Equipos	Materiales	
Liofilizador LABCONCO de 18 L de capacidad (Modelo: 7755042/790480401622, incluye bomba de vacío)	Bandeja rectangular de acero inoxidable de 38 x 36 x 3 cm	Linterna de mano
Congeladora (Temperatura promedio -20°C)	Placa Petri de vidrio de 60 x 15; 100 x 20; 150 x25 o 150 x 30 mm	Mascarilla de jebe C/ filtro para partículas
Balanza analítica y/o electrónica	Espátula de plástico con mango de madera, 20 cm de longitud	Guantes quirúrgicos descartables
Liofilizador LABCONCO de 18 L de capacidad (Modelo: 7755042/790480401622, incluye bomba de vacío)	Mortero C/pilón de porcelana, capacidad de 400 g	
Congeladora (Temperatura promedio -20°C)	Bolsas plásticas con cierre hermético (de 2,5 x 2,5 a 38 x 41 cm)	
Balanza analítica y/o electrónica	Bandeja rectangular de acero inoxidable de 38 x 36 x 3 cm	

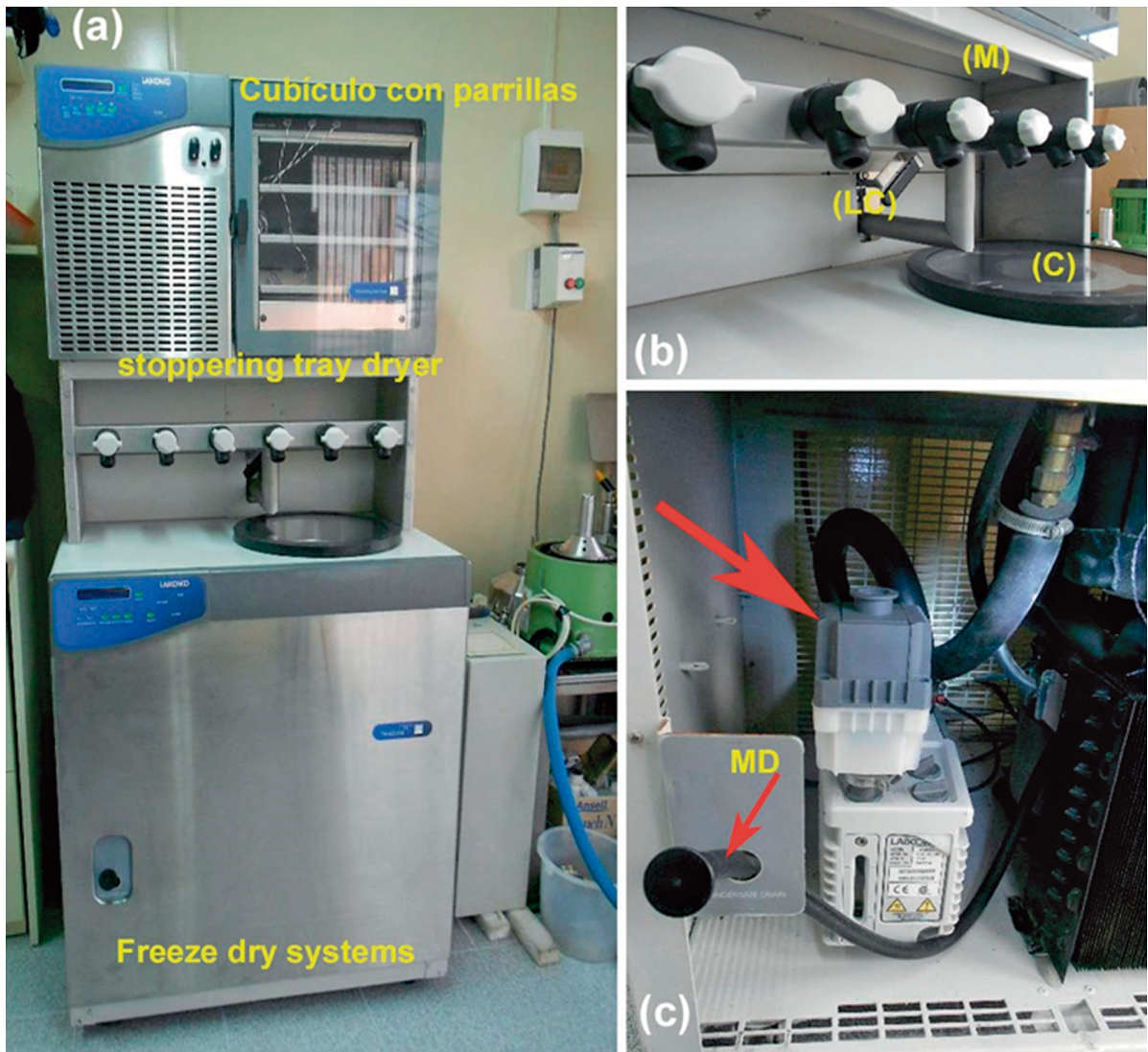


Figura 17.- a) Liofilizador LABCONCO de 18 L modelo 7755042/790480401622, b) sistema de vacío, (M) Manifolds (llaves cerradas, parte lisa hacia arriba), c) bomba de vacío LABCONCO Modelo 195(A65412906) (M) Manguera de desagüe del colector



Figura 18.- Tableros de mando del Liofilizador LABCONCO de 18 L (Modelo 7755042/790480401622)

Proceso de liofilización

Preparación de la muestra.- Es importante resaltar que el equipo tiene capacidad máxima de dos kilogramos para procesar cualquier tipo de biomasa húmeda homogenizada, repartida entre sus tres parrillas, además cada una tiene un sensor de temperatura (Fig. 17a).

- Previo al proceso, registre el peso de las bandejas y/o placas Petri vacías.
- Esparza las muestras sobre las bandejas de acero y/o placas Petri, y pese nuevamente, registre el peso obtenido.
- Verifique que el grosor de la biomasa esparcida tenga como máximo 1,5 cm de espesor (Figs. 21a, b, c).
- Finalmente, congele las muestras (- 20 °C).

Realice este proceso 24 horas antes de pasar al siguiente proceso de liofilización.

Liofilización.-

1. Encienda el *switch* del *STOPPERING TRAY DRYER*.
2. Anote las horas de uso, con el botón *DISPLAY* ubíquese en *MANUAL* y con el botón *PROGRAM* haga descender la temperatura hasta -15 °C y presione *ENTER*.
3. Finalmente 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*) (Fig. 19). El equipo tardará tres horas hasta llegar a los -15 °C.
4. Una vez encendido el panel superior, continúe con el panel inferior.
5. Encienda el *switch* de *FREEZONE*, anote horas de uso, luego presione *AUTO*.
6. Observe el descenso de la temperatura del recolector, que varía entre -50 y -56 °C, luego de diez minutos se activará automáticamente el vacío, *VACUUM*.
7. Observe en el tablero el encendido de las luces ámbar y verde, este último cuando ya todo el sistema esté con la temperatura y vacío adecuado (0,022 – 0,070 mBar).
8. Todo este proceso demora treinta minutos (Fig. 20).
9. Cuando la zona del *STOPPERING TRY DRYER*, descienda hasta -15 °C, en tres horas, coloque las muestras rápidamente con mucho cuidado.
10. Espere una hora más hasta que las muestras y parrillas estén a la misma temperatura, observe el monitor.
11. 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 recolector y vacío variaran en los rangos ya descritos, durante todo el proceso (Fig. 21d).
12. Luego de seis 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*.
13. Con *DISPLAY* ubíquese en *MONITOR* y observe el aumento de la temperatura.
14. Luego de catorce horas, nuevamente en *STOPPERING TRY DRYER* y con el botón *DISPLAY* ubíquese en *MANUAL* y con el botón *PROGRAM* aumente la temperatura hasta 15 °C y presionar *ENTER* por 3 horas.
15. Concluidas las tres horas, aumente la temperatura (para el secado final) hasta veinticinco 25 °C por siete horas.
16. En este punto, verifique cada hora y con la ayuda de la linterna de mano, el proceso de secado de la muestra.
17. Luego de treinta y cuatro horas, tiempo que demora el proceso de liofilización, inicie el apagado del equipo.

18. En el panel inferior, *FREEZONE*, presione *VACUUM*, espere 10 segundos y presione *AUTO*.
19. Abra 2 o 3 Manifolds (Partes lisas hacia abajo) a fin de eliminar el vacío.
20. Luego de eliminar el vacío, ubíquese en el panel superior el *STOPPERING TRY DRYER* y presione *RUN/STOP*.
21. Con los pasos previos, se termina el proceso de liofilización de la(s) muestras.
22. Finalmente apague ambos *switch*.
23. Retire las bandejas y/o placas Petri.
24. Con la ayuda de las espátulas remueva las muestras y páselas al mortero.
25. En el mortero realice el homogenizado de las muestras.
26. Pese las muestras.
27. Vierta la muestra homogenizada en bolsas plásticas, con cierre hermético.

28. Una vez la muestra esté embolsada, pese nuevamente y anote el peso total.
29. Codifique y almacene la muestra para su posterior análisis.
30. Asegúrese que las muestras se mantengan protegidas de la humedad y la luz.
31. Registre los datos obtenidos en el Formato de Registro de Datos (Ver Anexo 8).

Control de calidad

- Verifique la calidad de la biomasa seca, realizando un análisis de humedad al liofilizado.
- Emplee el método de estufa de aire caliente (50 °C) por cinco horas, hasta que el peso sea constante.
- El rango de humedad aceptable para biomasa con peso superior a un kilogramo, está entre 5 y 7%.

Si el porcentaje de humedad es mayor o la muestra no logra secar, nuevamente proceda a congelar y realizar la liofilización.



Figura 19.- Tablero de mando del *Stoppering Tray Dryer*
 Flecha roja= temperatura promedio de sensores
 Flecha amarilla= modo de funcionamiento del *Stoppering tray dryer*



Figura 20.- Tablero de mando del Free zone, del Liofilizador



Figura 21.- a) Biomasa microalgal esparciéndose en bandeja de acero inox.; b, c) biomasa húmeda esparcida de 2 microalgas diferentes, d) equipo realizando proceso de liofilización (flecha roja señala la posición final de llave central, indica que vacío se realiza en todo el equipo), e) muestras en placas Petri de 150x25 mm, f, g) muestras liofilizadas en bandejas de acero inox de 38 x36 x3 cm, h) homogenización mecánica de muestras, i) muestras liofilizadas en placas Petri de 150x25 mm, j) muestras embolsadas y rotuladas para análisis o almacenamiento, k) colector abierto para descongelamiento del agua que fue recolectado durante el proceso de liofilización (flecha roja señala el agua captada de las muestras en estado sólido)

Agradecimientos

El Presente trabajo se realizó dentro del financiamiento de la Asignación Presupuestal que No Resultan en Productos (APNOP 2002 – 2012), el Presupuesto por Resultados (PpR desde 2013 – 2016); también contó con el apoyo de proyectos del Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT): “Determinación de la biomasa microalgal potencialmente acumuladora de lípidos para la obtención de combustibles (2008) y “Desarrollo de un protocolo biotecnológico para la obtención de aceite de microalgas rico en DHA utilizando biorreactores tubulares (2013)”. También, agradecemos la colaboración de Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Universidad Nacional Federico Villareal (UNFV), Universidad de la República de Uruguay (UDELAR), Universidad Nacional de Colombia. Del mismo modo a las empresas privadas GEA Westfalia S.A., Merck Millipore Corporation, INDURA Grupo AIR PRODUCTS, REFABELT EIRL., LAVAYET SAC., MAIPASAC S.R.L., SPENAFISH, quienes colaboraron en diferentes aspecto logísticos. Especial reconocimiento a la Msc. Carla Aguilar Samanamud, Directora General Científica Ejecutiva del IMARPE, por la guía y recomendaciones al trabajo. Finalmente agradecemos a Iliana Chang Ávila, Gheraldine Ynga Huaman y Claudia Illa Garcia, por su valiosa colaboración en los trabajos de laboratorio.

REFERENCIAS

- ÁLVAREZ COBELAS M, GALLARDO T. 1989. Una revisión sobre la biotecnología de las Algas. Bot. Complutensis. 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.
- BONEY D. 1989. Phytoplankton. 2nd ed. Edward Arnold, London. 118 pp.
- BRENNAN L, OWENDE P. 2010. Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14: 557-577.
- BURLEW J. 1953. Algal culture, from laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington, Washington.
- 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.
- CLARSSON A, BEILEN J, MOLLER R, CLAYTON D. 2007. Micro- and macro-algae: Utility for industrial applications. CPL Press. UK.
- COHEN Z. 1999. Chemicals from Microalgae. Taylor Y Francis, London. 419 pp.
- DESMORIEUX H, DECAEN N. 2006. Convective drying of spirulina in thin layer. Journal of Food Engineering. 66 (4): 497-503.
- DUBINSKY Z, MATSUKAWA R, KARUBE I. 1995. Photobiological aspects of algal mass culture. J. Mar. Biotechnol. 2: 261-265.
- GARCÍA 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.
- HO S, CHEN C, LEE D, CHANG J. 2011. Perspectives on microalgal CO₂ 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.
- LEACH G, OLIVEIRA G, MORAIS R. 1998. Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a β-carotene rich powder. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 20 (2): 82-85.
- MADIGAN M, MARTINKO J, PARKER J. 2004. Brock, Biología de los microorganismos. 10a Edición. Prentice Hall. 1089p.
- MENDOZA H, DE LA JARA A, PORTILLO E. 2011. Planta piloto de cultivo de microalgas: Desarrollo potencial de nuevas actividades económicas asociadas a la biotecnología en Canarias, 60 pp. Instituto Tecnológico de Canarias, Santa Cruz de Tenerife.
- 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): 955-959.
- 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.
- NINDO C, POWERS J, TANG J. 2007. Influence of Refractance Window evaporation on quality of juices from small fruits. Journal Food Science & 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
- NURDOGAN Y, OSWALD W. 1996. Tube settling rate of high rate pond algae. *Water Science Technology*. 33: 229–241.
- OLAIZOLA M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the market place, *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 Congresso Brasileiro de Mamona e I Simposio Internacional de Oleaginosas Energéticas, João Pessoa, PB.
- PRAKASH J, PUSHARAJ B, CARLOZZI P, TORZILLO G, MONTAINI E, MATERASSI R. 1997. Microalgae drying by a simple solar device. *International Journal of Solar Energy*. 18(4): 303–311.
- PULZ O, GROSS W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, 65: 635–648.
- REDDY S. 2001. *University botany: Algae, Fungi, Bryophyta and Pteridophyta*, Vol1. New Age International.
- REYNOLDS C. 1984. *Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge, 184pp
- RICHMOND A. 1986. Cell response to environmental factors. En: Richmond, A. (Ed). *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press. Inc., E.U.A.U.S.A. P: 69-99
- RICHMOND A. 1999. Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. In: *Chemicals from Microalgae* (ed. Z. Co-hen), 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. 245– 63 pp.
- SKJANES K, REBOURS C, LINBLAND P. 2013. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical Review in Biotechnology*. 1549-7801 pp.
- SPOLAORE P. 2006. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87-96 pp.
- SUH I, LEE C. 2003. Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 6(8): 313-321.
- 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.

Anexo 1

Glosario

Biomasa.- Biomasa sust. (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; (3) en biotecnología, la materia microbiana del sistema.

Biorreactor.- Son recipientes en los cuales 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.

Bomba de succión.- Encargada de proveer un caudal constante y controlado de cultivo a la centrífuga.

Capacidad de carga.- Tamaño máximo de una población de una especie biológica que el ambiente puede soportar indefinidamente en un periodo determinado.

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.

Cepa.- Cultivo puro de una especie determinada de microorganismos. (Manual para el cultivo de microalgas.

Cosecha.- Extracción de microalgas del recipiente de cultivo una vez que han alcanzado una densidad deseada.

Cultivo masivo.- Se aplica a las especies marinas que son cultivadas en recipientes con una capacidad de volumen de 2,5; 15; 80, 1000 litros y volúmenes superiores.

Densidad.- Número de algas contenido en un volumen determinado de cultivo.

Inóculo.- Conjunto de microorganismos que se agregan a un medio de cultivo para su crecimiento.

Invernadero.- Recinto cerrado, que se destina a la producción de cultivos, dotado habitualmente de una cubierta exterior translúcida de vidrio o plástico, que permite el control de la temperatura, la humedad y otros factores ambientales para favorecer el desarrollo de los organismos acuáticos de agua de mar y continental.

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 desde el estado sólido al gaseoso del ambiente 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.

Microalgas.- Organismos microscópicos unicelulares, capaces de convertir la energía solar en energía química por medio de la fotosíntesis. Contienen numerosos compuestos bioactivos que pueden ser aprovechados para uso comercial.

Siembra.- Introducción de un concentrado conocido de volumen microalgal (inóculo) a recipientes con medio líquido. Esto marca el inicio de la etapa de cultivo.

Anexo 2. Expresión de los resultados

Para la evaluación de la densidad celular de los cultivos se emplea la técnica de conteo de Neubauer para: células menores a 6µ:

$$Na = (\sum Cel. Ca/5) * 25000$$

Células mayores a 6µ:

$$Nb = (\sum Cel. Cb/4) * 10000$$

Dónde:

Na y Nb = Número de células por mL (cel/mL)

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

$\sum Cel. Cb$ = Suma de células en 4 cuadrantes externos de la cámara de Neubauer

Anexo 3. Formato de control parámetros de los cultivos

		Hora											
Fecha	Punto control (*)	08:00				12:00				16:00			
		pH	Oxígeno disuelto (g/L)	Salinidad (ppm)	Temp (°C)	pH	Oxígeno disuelto (g/L)	Salinidad (ppm)	Temp (°C)	pH	Oxígeno disuelto (g/L)	Salinidad (ppm)	Temp (°C)
	Promedio												
	Desv.est												
	Promedio												
	Desv.est												

(*) Indica el lugar donde se toman los datos

Anexo 4. Formato de control parámetros del invernadero

Fecha	Punto control (*)	Hora	Luminosidad (lux)	PAR (µmol/m ² /seg)	Temperatura (°C)	
					Mínima	Máxima
	Promedio					
	Desv. est					

(*) Indica el lugar donde se toman los datos

Anexo 5. Obtención del peso de biomasa húmeda

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

$$BH = P1 - P2$$

Dónde:

BH = Biomasa húmeda en gramos

P1 = Peso total de biomasa húmeda en g (bandeja de acero y/o placa Petri de vidrio+ biomasa húmeda)

P2 = Peso de la bandeja de acero y/o placa Petri de vidrio en gramos

Anexo 6. Formato de control de horas de uso del Liofilizador

Fecha	Freezone				Stoppering try dryer		Usuario (*)	Observaciones
	Refrigeración		Vació		Refrigeración			
	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 7. Obtención del peso de biomasa seca y expresión de resultados

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

$$BH = P1 - P2 \quad BS = P3 - P4$$

$$T = (BS * 100 / BH) \%$$

Dónde:

BH = Biomasa húmeda en gramos

BS = Biomasa seca en gramos

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

P2 = Peso de la bandeja y/o placa Petri en gramos

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

P4 = Peso de la bolsa hermética en gramos

T = Porcentaje de conversión de biomasa húmeda a seca

Anexo 8. Formato de registro de datos después de secado de biomasa microalgal

Fecha de análisis	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 9. Formato final para evaluación de producción de microalgas en condiciones de invernadero

Nº	Fecha ingreso	Litros inóculo	Capacidad carga inóculo (cel/mL*10 ⁶)	Litros sembrados	Fecha cosecha	Código de muestra	Días de cultivo	Concentración de siembra (cel/mL*10 ⁷)	Volumen de cosecha (L)	Capacidad carga cosecha (cel/mL*10 ⁶)	Biomasa húmeda (g)	Biomasa seca (g)	BH/BS (%)	Productividad (mg/L/día)	Observaciones