

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO

Facultad de Ciencias Naturales- Sede Trelew



INFORME FINAL

Año 2022

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Alumno: Matías Germán Narez

Profesor Asesor: Ing.Qca. Ruth Salomón

Instructor: Lic. en Cs. Biológicas María Daniela García

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Contenido

1	AGRADECIMIENTOS	1
2	RESUMEN	2
3	INTRODUCCIÓN	3
3.1	Ultrasonido.....	5
3.2	Microalgas	7
3.2.1	Scenedesmus sp.....	7
3.2.2	Chlorella vulgaris	8
3.2.3	Chlamydomonas reinhardtii	9
3.2.4	Dunaliella salina	10
3.2.5	Nostoc sp	11
4	OBJETIVO GENERAL.....	12
5	MATERIALES Y METODOS	12
5.1	Cepas seleccionadas	12
5.2	Preparación de soluciones y cultivos	13
5.3	Ensayos de aplicación de ultrasonido	14
6	RESULTADOS	16
7	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	20
8	BIBLIOGRAFÍA	22
9	ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO	27
9.1	Medio Detmer modificado	27
9.2	MEDIO BG-11.	28
9.3	Medio Walne.....	29
10	ANEXO II. CONTEO DE NOSTOC sp.....	31
11	ANEXO III: TRADUCCIÓN DEL MANUAL DEL SONICADOR	33
11.1	General.....	33
11.2	Parámetros técnicos.....	33
11.3	Principios de funcionamiento	34
11.4	Explicación de las teclas de funcionamiento del instrumento.....	36
11.5	Explicaciones de operación/funcionamiento	38
11.6	PRECAUCIONES.....	40
11.7	Desmontaje de la barra o sonda (Ver Figura 3).....	41
11.8	Lista de empaque.....	42
12	ANEXO IV: MANUAL DEL SONICADOR PARA EL LABORATORIO DE MICROALGAS ...	44
12.1	General.....	44

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

12.2	Parámetros técnicos.....	44
12.3	Principios de funcionamiento	45
12.4	Explicación de las teclas de funcionamiento.....	46
12.5	Explicaciones de operación/funcionamiento	49
12.6	PRECAUCIONES.....	51
12.7	Desmontaje de la barra o sonda (Ver Figura 3).....	52
12.8	Lista de empaque.....	53

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

1 AGRADecIMIENTOS

Quiero escribir estas líneas para agradecer el apoyo y dedicación de quienes me han acompañado durante la realización de este trabajo.

Por la ayuda incondicional que me han brindado mi tutora, Lic. En Cs. Biológicas María Daniela García y mi profesora asesora Ing. Química Ruth Salomón.

A todas las personas del Laboratorio de Microalgas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco que me han recibido y por su soporte cuando lo he necesitado. Sobre todo, quiero agradecer a Prof. Isabel Albarracín y a la Lic. Química Marcela Cravero por estar pendientes y haber colaborado en todo momento.

Agradecer el apoyo de mi familia, por su constante preocupación por el progreso de este trabajo y el haberme acompañado en todos los aspectos de mi vida.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de todos ustedes.

Gracias.

2 RESUMEN

Las microalgas son reconocidas como fuente de bioproductos de gran importancia económica. Para su obtención es necesario desarrollar e implementar técnicas adecuadas para extraer, cuantificar y conservar metabolitos de interés biotecnológico. Una de ellas consiste en la disrupción celular para la liberación de biocompuestos. El objetivo que se plantea en este trabajo es determinar la efectividad de ruptura celular obtenida por el método de sonicación. Se utilizó un equipo de ultrasonido modelo JY88-II N, y se trataron las especies *Scenedesmus* sp, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, y *Nostoc* sp pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microalgas. Fueron sometidas a pulsos de baja frecuencia (20 kHz) y para evitar el aumento excesivo de temperatura durante el proceso se mantuvieron en un baño con hielo. Las variables consideradas fueron: presencia/ausencia de pared celular, tiempo (1- 20 min) y potencia de sonicación (150 – 200 W). La densidad celular fue evaluada en cámaras de conteo, registrándose el estado de las células al inicio y al final del procedimiento mediante cámara fotográfica adosada al microscopio óptico con el software correspondiente. Se determinó el índice de sonicado (η_S) para valorar la eficiencia del proceso, calculado a partir de las densidades celulares iniciales y finales (N_i y N_f).

C. reinhardtii, *D. salina* y *Nostoc* sp presentaron liberación del contenido celular en 5 minutos de sonicado con una potencia de 150 W, resultado que se corresponde con sus estructuras celulares carentes de pared. Mientras que *Scenedesmus* sp, y *C. vulgaris* requirieron mayor tiempo y potencia (20 minutos y 200 W), dada la presencia y naturaleza de sus paredes celulares. Se comprueba la eficiencia del tratamiento que afecta de manera diferente a las especies estudiadas según la presencia o no de pared celular, factor que condiciona la liberación de los componentes internos.

3 INTRODUCCIÓN

El presente informe es el resultado de la ejecución de la Práctica Profesional de la carrera Licenciatura en Protección y Saneamiento Ambiental, dictada en la sede Trelew de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. La misma se llevó a cabo en el Laboratorio de Microalgas de dicha Facultad.

Las microalgas constituyen el primer nivel trófico en los sistemas acuáticos, del que depende todo el ecosistema. Alrededor de la mitad de la fotosíntesis y la producción mundial de oxígeno se logra mediante estos organismos. Representan el primer eslabón en la cadena alimenticia y juegan un papel importante en el reciclaje de CO₂ a través del proceso fotosintético, que es similar al de las plantas superiores. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se han adaptado a diferentes ambientes con gran diversidad en tamaño, morfología, ciclo de vida, pigmentos, y metabolismo. (Matsunaga y col., 2005).

Actualmente se reconoce su importancia y utilidad a través de un amplio espectro de aplicaciones científicas y tecnológicas.

Pese a no saberse con precisión el número real de especies de microalgas existentes en todo el planeta, su número se presume en un rango entre 300.000 y 1.000.000 de especies. De estas, sólo algunas decenas de miles de especies han sido identificadas a la fecha. A nivel de su industrialización con fines comerciales, el número se reduce a unas 15 a 20 especies empleadas en la actualidad, con otras 15 ó 20 en estudio para determinar su potencial a mediano-largo plazo (Cerón García, 2013).

Las microalgas se han considerado buenos organismos modelo para el estudio de diversos procesos biológicos como la morfogénesis, el reconocimiento celular, los ciclos biológicos, la evolución de procesos y rutas metabólicas y la fisiología y bioquímica de la fotosíntesis.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

En las microalgas se combinan propiedades metabólicas típicamente vegetales con características propias de células microbianas tales como la capacidad de crecimiento rápido en cultivo líquido, simplicidad de requerimientos nutritivos, plasticidad metabólica, tolerancia a condiciones extremas, capacidad de sintetizar y secretar algunos metabolitos y potencialidad de manipulación genética, que les confiere interés biotecnológico (Borowitzka, 2013).

Pueden cultivarse para obtener masa rica en proteínas de uso directo en la alimentación animal, procesadas o como alimento vivo en la cría de diversas especies acuáticas. Algunas especies se utilizan en la depuración de aguas residuales, por su capacidad de extraer nutrientes del agua y transformarlos en biomasa que luego puede tener diferentes aplicaciones como por ejemplo en el área de combustibles y de la agronomía (Albarracín y col., 2011; García Cuadra y col., 2012; Salomón y col., 2014; Hernández Pérez y Labbe, 2014).

Los efectos agronómicos de las algas se pueden justificar por el contenido cuantitativo y cualitativo de sus componentes: polisacáridos matriciales y de reserva, macro y micronutrientes, bioantioxidantes y activadores, fitohormonas y reguladores del crecimiento, biotoxinas, inhibidores y repelentes (García Reina y Martel Quintana, 2000).

Para la obtención de esos productos es necesario desarrollar y complementar diferentes técnicas para extraer, cuantificar y conservar sus metabolitos. Por lo tanto, es importante tener en cuenta las metodologías para optimizar rendimientos. Existen técnicas de tipo mecánico y químico. De las primeras, las más empleadas son la deshidratación por liofilización, congelamiento, reducción de tamaño de partícula, ultrasonido y homogenización en alta presión. Las de rompimiento químico adicionan al material enzimas hidrolíticas o reactivos que generen condiciones extremas de salinidad, presión osmótica o pH (ácidos o básicos), (Lee y col., 1998 y 2010).

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

3.1 Ultrasonido

El ultrasonido o sonicación consiste en la exposición de las microalgas a ondas acústicas de una frecuencia determinada. Un transductor magneto restrictivo o piezoeléctrico convierte la corriente alterna de un oscilador eléctrico en ondas mecánicas que se transmiten a la suspensión a través de una sonda metálica (generalmente hecha de titanio) que vibra con la misma frecuencia que el oscilador. Estas ondas, en ciclos de rápida compresión y descompresión, generan millones de microburbujas que son comprimidas hasta su mínimo luego se expanden y colapsan contra las células (cavitación) produciendo calor en el medio líquido y causando la ruptura de la pared celular por los fuertes esfuerzos de corte producidos. Ha sido demostrado experimentalmente que la aplicación de ultrasonido a baja frecuencia (20 kHz) causa una alta destrucción celular algal, incluso mayor que aplicando ondas de alta frecuencia (Molina Grima y col., 2004; González y col., 2009; Fuentes Campos y Aranda Saldaña, 2013). El sonicador puede operar de dos formas: por pulsos o de manera continua. Cuando es por pulsos, las vibraciones de ultrasonido pueden transmitirse en una solución en un rango de 0,1 a 0,9 pulsos por segundo, permitiendo una adecuada sonicación sin generación importante de calor. En cambio, cuando se aplican las ondas de ultrasonido de forma continua, hasta por 15 minutos, el inconveniente es que se produce una elevada generación de calor. (Sánchez Carmona y col., 2016).

Hay numerosos trabajos que han citado la técnica de sonicación para obtener diversos bioproductos (Lee y col, 1998; González y col., 2009; Lee y col. 2010; Fuentes Campos y Aranda Saldaña, 2013; Zheng y col., 2011; García-Cuadra y col., 2012; Halim y col., 2013; Öğüt y col, 2013; Dos Santos y col.,2015; Onay y col., 2016; Heo y col., 2017; Hildebrand y col, 2020).

Entre las empresas proveedoras de equipos de ultrasonido podemos citar Hielscher, Covaris 2200, Biosafer, entre otras. En las Figuras 1, 2 y 3 se muestran algunos de sus equipos.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”



Un factor relevante a tener en cuenta en la operación de ultrasonido es la resistencia de la pared celular al rompimiento y liberación de los componentes internos.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

3.2 Microalgas

Las especies de microalgas que se utilizaron en el desarrollo de este proyecto fueron: *Scenedesmus* sp, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina* y *Nostoc* sp.

3.2.1 *Scenedesmus* sp (Meyen)

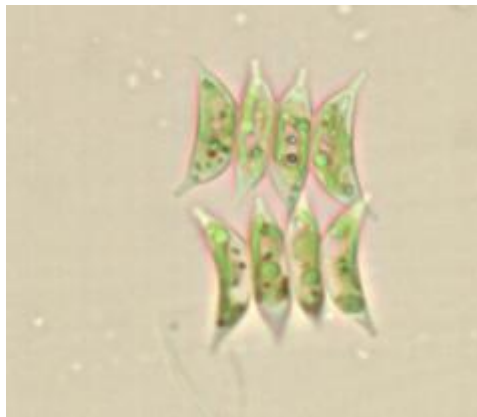


Fig. 4. *Scenedesmus* sp

Tabla 1: Ubicación taxonómica de *Scenedesmus* sp. Fuente: Parra y col., 1983.

TAXONOMÍA	
Phylum	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Sphaeropleales
Familia	Scenedesmaceae
Género	<i>Scenedesmus</i>

Sus células son elipsoidales o fusiformes, forman colonias llamadas cenobios, se encuentran en múltiplos de dos, siendo las más comunes las de cuatro u ocho células. Las células están dispuestas unas al lado de otras con sus ejes mayores paralelos. Los cenobios de ocho células a menudo están constituidos por 2 hileras alternadas de 4 células. Poseen pared lisa o verrucosa. Los polos de las células a menudo están ornamentados con espinas, a veces las células marginales del cenobio están ornamentados de manera diferente a las medianas. Cada célula presenta un cloroplasto con un pirenoide (Lee y col., 2013).

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Scenedesmus sp tiene una de las paredes más resistentes, ya que está compuesta por múltiples capas de celulosa y hemicelulosa en la parte interna y esporopolenina y politerpenos en la parte externa. La esporopolenina es un politerpeno impermeable resistente a los agentes químicos que se encuentra también en la pared de las esporas y del grano de polen, también llamado algaenan. Es un biopolímero hidrocarbonáceo no hidrolizable (Alhattab y col., 2019) Puede decirse que la esporopolenina deriva de diversos precursores que están vinculados químicamente para formar una estructura rígida.

3.2.2 *Chlorella vulgaris* Beijerinck

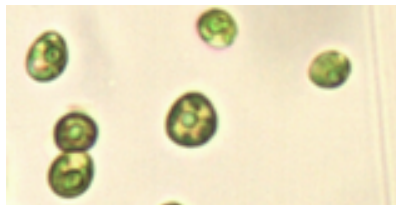


Fig. 5. *Chlorella vulgaris*

Tabla 2: Ubicación taxonómica de *Chlorella vulgaris*. Fuente: Parra y col., 1983.

TAXONOMÍA	
Phylum	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Trebouxiophyceae
Familia	Chlorellaceae
Género	<i>Chlorella</i>
Especie	<i>Chlorella vulgaris</i>

Las células de *Chlorella* son esféricas con un cloroplasto en forma de copa raramente, dos y a veces se observa un pirenoide, siempre con vacuolas contráctiles. Sus células son siempre solitarias, reniformes o elipsoidales, más raramente asimétricas, con pared celular notoria (Lee, 2008).

C. vulgaris posee pared celular constituida por pectina, celulosa y celulosa en combinación con otros polisacáridos (Passos y col., 2014).

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

3.2.3 *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard

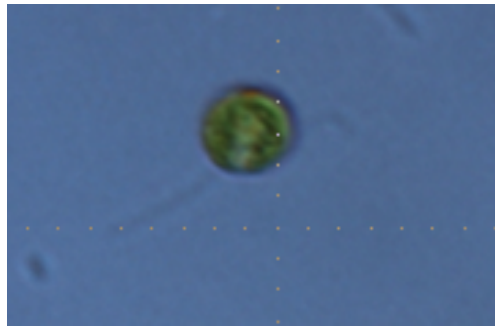


Fig. 6. *Chlamydomonas reinhardtii*

Tabla 3: Ubicación taxonómica de *Chlamydomonas reinhardtii*. Fuente: Parra *et al*, 1983.

TAXONOMÍA	
Phylum	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Volvocales
Familia	Chlamydomonadaceae
Género	<i>Chlamydomonas</i>
Especie	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

El género *Chlamydomonas* presenta células solitarias de forma regular o con dorsiventralidad más o menos marcada, ovoides, elipsoidales, globulosas o fusiformes, con dos flagelos iguales. Su sección transversal es siempre redondeada, raramente un poco elíptica. A veces lleva una papila entre los flagelos, casi siempre lisa. Los cloroplastos pueden ser de formas variadas y el estigma ("mancha ocular", que detecta la luz) estar ausente; con una, dos o varias vacuolas contráctiles. Los pirenoides, cuando presentes, varían de uno a muchos. Los estados palmeloides y gleocistoides son frecuentes (Parra y col., 1983).

La membrana celular de *Chlamydomonas reinhardtii* es una matriz extracelular compuesta por carbohidratos y 20-25 polipéptidos, proporciona soporte estructural a la célula y puede regular el movimiento de moléculas dentro y fuera de la célula.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Esta compleja matriz extracelular está compuesta por carbohidratos y varias proteínas ricas en hidroxiprolina dispuestas en al menos siete capas distintas visibles en el microscopio electrónico, con las capas externas formando una red cristalina. (Imam y col., 1985).

3.2.4 *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco

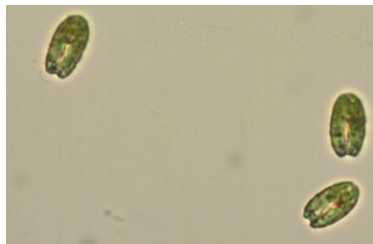


Fig. 7. *Dunaliella salina*

Tabla 4: Ubicación taxonómica de *Dunaliella salina*. Fuente: Throndsen, 1997.

TAXONOMÍA	
Phylum	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Volvocales
Familia	Dunaliellaceae
Género	<i>Dunaliella</i>
Especie	<i>Dunaliella salina</i>

Dunaliella es un género de algas verdes unicelulares, móviles, con forma de varilla a ovoides. Este género tiene representantes marinos y halófilos principalmente, aunque también se han descrito especies de agua dulce. (Throndsen, 1997). *Dunaliella salina* y cepas hipersalinas similares tienen células biflageladas en forma de pera. *Dunaliella* es la principal fuente natural de β -caroteno en altas cantidades, siendo hasta un 16% de su materia seca. Sus células carecen de una pared celular rígida y, en cambio, tienen una fina membrana plasmática elástica.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

3.2.5 *Nostoc* sp (Vaucher ex Bornet et Flahault)



Fig. 8. *Nostoc* sp

Tabla 5: Ubicación taxonómica de *Nostoc* sp. Fuente: (Parra *et al*, 1982)

TAXONOMÍA	
Phylum	Cyanobacteria
Clase	Cyanophyceae
Orden	Nostocales
Familia	Nostocaceae
Género	<i>Nostoc</i>

Filamentos agrupados en cenobios gelatinosos más o menos esféricos a menudo de gran tamaño. Tricomatos entrelazados flexibles, con heterocistos intercalares. A veces cada tricoma conserva una vaina visible, pero a menudo es difluente.

En este trabajo se puso a punto un equipo de ultrasonido para su utilización en la ruptura de la pared celular de microalgas. La propuesta estuvo en el marco del Proyecto: “Capacidad bioestimulante de *Nostoc* sp y *Scenedesmus* sp en la germinación de semillas de *Pappostipa humilis* (Cav.) Romasch (coirón llama) para revegetación de ambientes degradados”. El mencionado proyecto involucró técnicas de cultivo de microalgas y de ruptura de paredes celulares para la liberación de biocompuestos, por ejemplo los que estimulan la germinación de semillas (fitohormonas, auxinas, giberelina).

Se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Microalgas de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud UNPSJB sede Trelew. La técnica de interrupción celular se podrá aplicar en futuras actividades de docencia

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

fortaleciendo líneas de investigación en biotecnología algal.

4 OBJETIVO GENERAL

Poner a punto el equipo de ultrasonido modelo JY88-II N para su aplicación en la ruptura de células de distintas especies de microalgas.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 Cepas seleccionadas

Las cepas que se seleccionaron pertenecientes a la Colección del Laboratorio de Microalgas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, sede Trelew, Provincia del Chubut, Argentina fueron:

- *Scenedesmus* sp (Meyen) Código LMPA 63. Aislada de la Laguna Cacique Chiquichano, Chubut, Argentina y es mantenida en Medio Detmer (Accorinti, 1960).
- *Chlorella vulgaris* (Beijerinck) Código LMPA 39. Aislada del Río Chubut, Chubut, Argentina y es mantenida en Medio Detmer (Accorinti, 1960).
- *Chlamydomonas reinhardtii* (Ehrenberg) Código LMPA 43. Aislada de la Laguna Cacique Chiquichano, Chubut, Argentina y es mantenida en Medio Detmer (Accorinti, 1960).
- *Dunaliella salina* (Teodoresco) Código LMPA 31. Aislada de Playa Cangrejales, Chubut, Argentina y es mantenida en Medio Walne (Walne, 1966).
- *Nostoc* sp (Vaucher ex Bornet et Flahault) Código LMPA 52. Aislada del Río Chubut, Chubut, Argentina y es mantenida en Medio BG11 (Rippka, 1988).

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Todas las cepas son mantenidas en cámara de cultivo a una temperatura de 19 ± 2 °C, Iluminación de $56 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y luz continua.

5.2 Preparación de soluciones y cultivos

Antes de comenzar los ensayos, fue necesaria la preparación de los medios de cultivo específicos de cada especie, descritos en el Anexo I

- Detmer (Accorinti, 1960) para *Scenedesmus* sp, *Chlorella vulgaris* y *Chlamydomonas reinhardtii*
- Walne (Walne, 1966) para *Dunaliella salina*
- BG11 (Rippka, 1988) para *Nostoc* sp

Se realizó el cultivo de las especies seleccionadas en el medio específico de cada una de ellas en recipientes de 250 ml (Erlenmeyers) con un volumen final de 100 ml cada uno. Todos, en condiciones controladas en cámara de cultivo (temperatura 23 ± 2 °C, iluminación 2800 lux, fotoperíodo 12:12) y agitación manual diaria. (Fig. 9).



Fig. 9. Cultivos de las especies seleccionadas

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

5.3 Ensayos de aplicación de ultrasonido



Fig. 10. Vista frontal del sonicador y de la Cámara de aislamiento acústico

Se empleó el equipo de ultrasonido del Laboratorio de microalgas JY88-IIN (Ultrasonic Cell Crusher) (Fig. 10), realizando experiencias con variables del proceso:

- a. Tiempo de sonicación.
- b. Potencia de sonicación

Las muestras de cultivos fueron sonicadas en tubos de centrífuga de plástico de 50 ml. Fueron sometidas a pulsos de baja frecuencia (20 kHz) y para evitar el aumento excesivo de temperatura durante el proceso se mantuvieron en un baño con hielo, el tiempo empleado fue entre 1 y 20 min con una potencia de sonicación de 150 W y 200 W para *Scenedesmus* sp y *Chlorella vulgaris* y 150 W para las otras cepas. Se registró el estado de las células al inicio y a diferentes tiempos mediante cámara fotográfica Infinity adosada al microscopio óptico

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Olympus con el software correspondiente (Fig. 11). Se guardaron alícuotas para su posterior recuento fijadas con Lugol.



Fig. 11. Cámara Infinity adosada al microscopio óptico Olympus.

La densidad celular fue evaluada mediante una cámara de conteo celular (Cámara de Neubauer, Fig. 12) salvo para el caso de la microalga filamentosa *Nostoc* sp- En este caso, por ser un alga filamentosa que con el tratamiento de sonicación se fragmentaba, no era posible usar esta cámara en todo el proceso. Para cuantificar este efecto se contaron las células presentes en 8 zonas del campo registrado por una fotografía tomada con aumento 200X (Anexo II).



Fig. 12. Cámara de Neubauer

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Se determinó el índice de sonicado (η_S) para valorar la eficiencia del proceso, calculado a partir de las densidades celulares iniciales y finales (N_i y N_f) mediante la ecuación:

$$\eta_S = \frac{N_i - N_f}{N_i} \times 100$$

6 RESULTADOS

En las figuras 13 a 17 se muestran las fotografías tomadas con el objetivo 20X a los cultivos sonicados a una potencia de 200 W en el caso de *Scenedesmus* sp y *C. vulgaris*, y a 150 W en el de las otras cepas. Los tiempos se indican en el epígrafe. *C. reinhardtii*, *D. salina* y *Nostoc* sp .presentaron liberación del contenido celular a los 5 y 6 minutos de sonicado. *Scenedesmus* sp y *C. vulgaris* requirieron mayor tiempo (20 minutos).

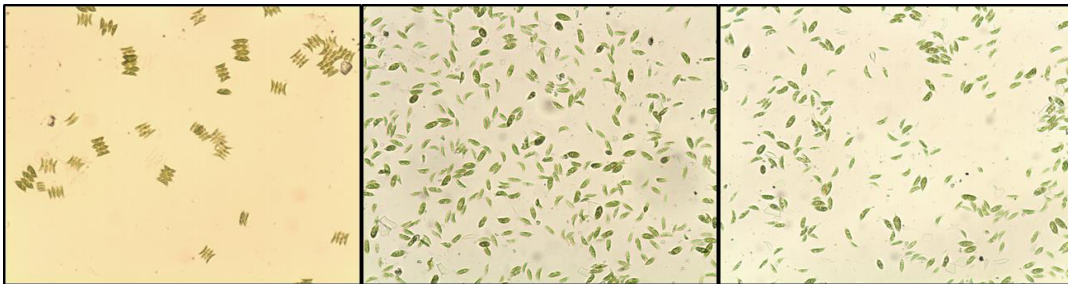


Fig. 13. *Scenedesmus* sp: 0, 10 y 20 min (200 W)

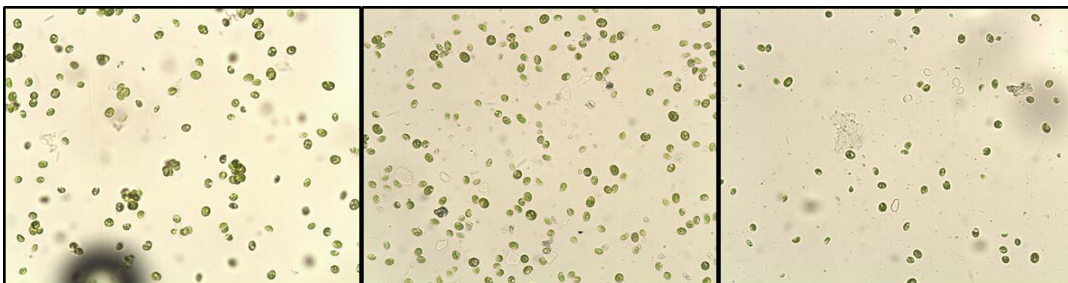


Fig. 14. *Chlorella vulgaris*: 0, 10 y 20 min. 200 W

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

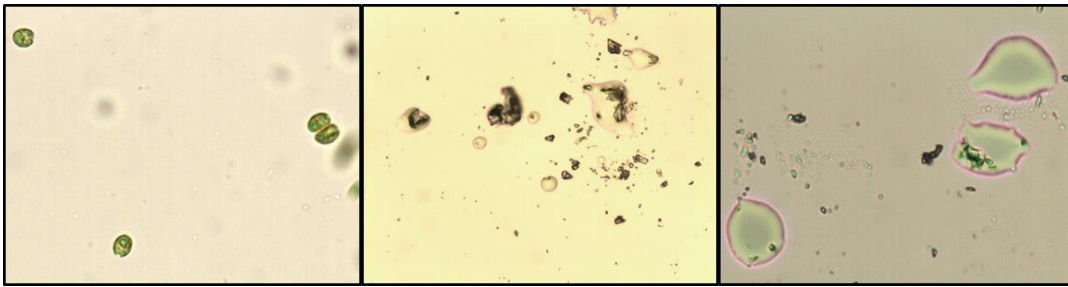


Fig. 15. *Chlamydomonas reinhardtii* 0, 5 y 10 min. 150 W

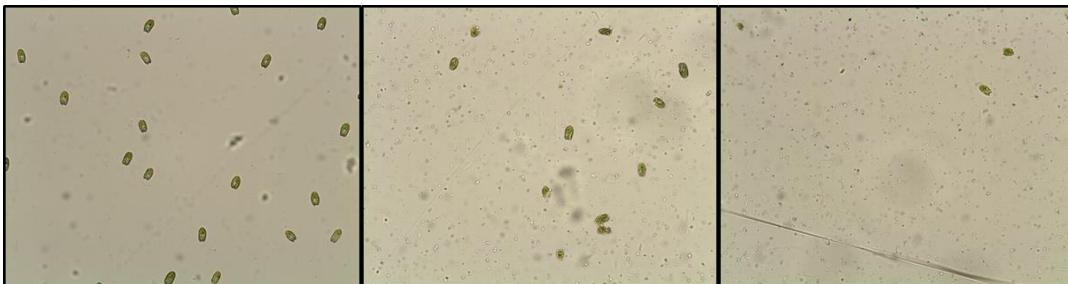


Fig. 16. *Dunaliella salina*: 0, 3 y 6 min. 150 W

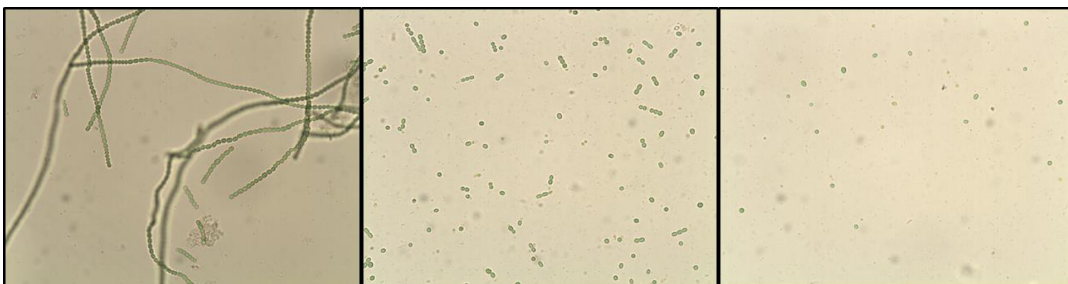


Fig. 17. *Nostoc* sp: 0, 1 y 5 min. 150 W

La Tabla 6 muestra los conteos realizados para la determinación de las densidades celulares. En cada caso, se trató de contabilizar las células cuya estructura se veía completa.

En la última columna se muestran las densidades celulares, salvo para *Nostoc* sp que muestra los conteos celulares en el campo capturado en la fotografía (Anexo II).

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Tabla 6. Tabla de conteos de densidades celulares

(Aclaración: Para *Nostoc* sp conteo celular en el campo capturado en la fotografía).

Cepa	Potencia (W)	Tiempo (min)	n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	n8	MEDIA	DESVIO	F dilución	N°cel/ml
<i>Scenedesmus</i> sp	150	0	72	76	89	88	129	76	127	94	93,88	22,38	10	9.387.500
	150	5	70	75	88	89	103	75	108	95	87,88	13,82	10	8.787.500
	150	10	76	77	79	92	105	69	87	89	84,25	11,35	10	8.425.000
	150	15	80	79	75	95	97	79	80	92	84,63	8,57	10	8.462.500
	150	20	90	94	70	80	81	89	84	88	84,50	7,52	10	8.450.000
	200	10	75	84	91	79	77	86	79	97	83,50	7,56	10	8.350.000
	200	15	95	69	80	87	68	78	91	86	81,75	9,82	10	8.175.000
	200	20	86	82	78	84	64	84	80	87	80,63	7,35	10	8.062.500
<i>Chlorella vulgaris</i>	200	0	84	94	87	75	77	87	109	108	90,13	12,81	10	9.012.500
	200	5	82	79	55	70	78	80	83	75	75,25	9,16	10	7.525.000
	200	10	75	62	50	66	65	81	67	65	66,38	9,10	10	6.637.500
	200	15	63	41	42	64	54	78	57	53	56,50	12,13	10	5.650.000
	200	20	62	47	43	60	53	65	55	53	54,75	7,46	10	5.475.000
<i>Dunaliella salina</i>	150	0	21	19	28	23	22	21	17	15	20,75	3,96	10	2.075.000
	150	1	22	26	20	25	15	19	11	18	19,50	4,99	10	1.950.000
	150	3	5	3	4	3	2	8	2	5	4,00	2,00	10	400.000
	150	6	2	1	2	1	0	2	0	1	1,13	0,83	10	112.500
<i>Chlamydomonas</i> sp	150	0	67	58	72	98	77	87	59	67	73,13	13,79	10	7.312.500
	150	5	1	1	1	0	3	0	0	1	0,88	0,99	10	87.500
	150	10	0	1	1	0	1	1	0	0	0,50	0,53	10	50.000
<i>Nostoc</i> sp	150	0	127	180	149	75	68	49	44	26	89,75	55,49	1	897.500
	150	1	21	26	14	17	5	14	22	13	16,50	6,52	1	165.000
	150	2	7	5	7	2	5	3	3	12	5,50	3,21	1	55.000
	150	5	4	3	2	4	1	3	4	1	2,75	1,28	1	27.500

Las figuras 18 a 22 muestran las densidades celulares iniciales y a distintos tiempos de sonicación de las cepas tratadas.

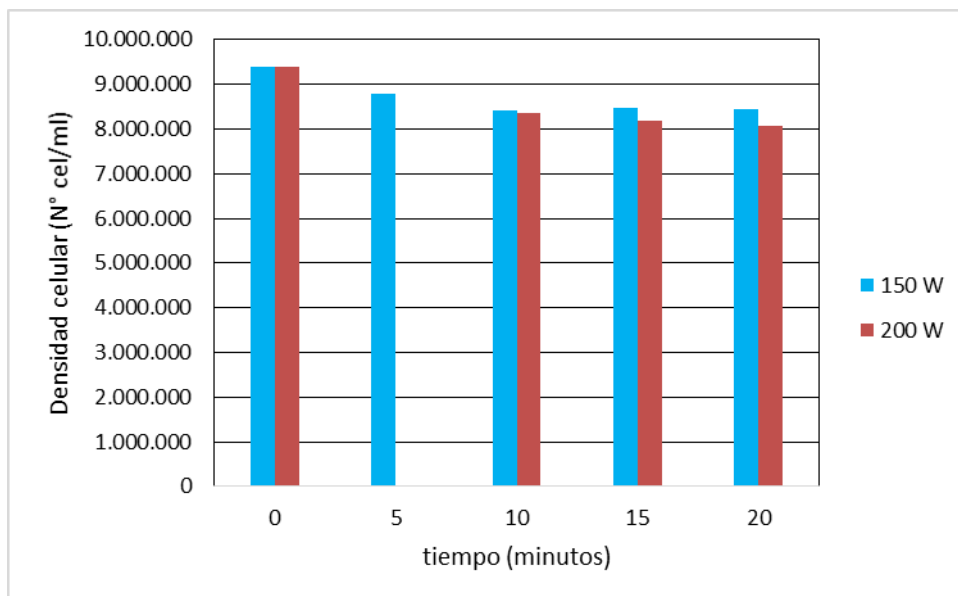


Fig. 18 Densidades celulares del Ensayo de sonicación de *Scenedesmus* sp.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

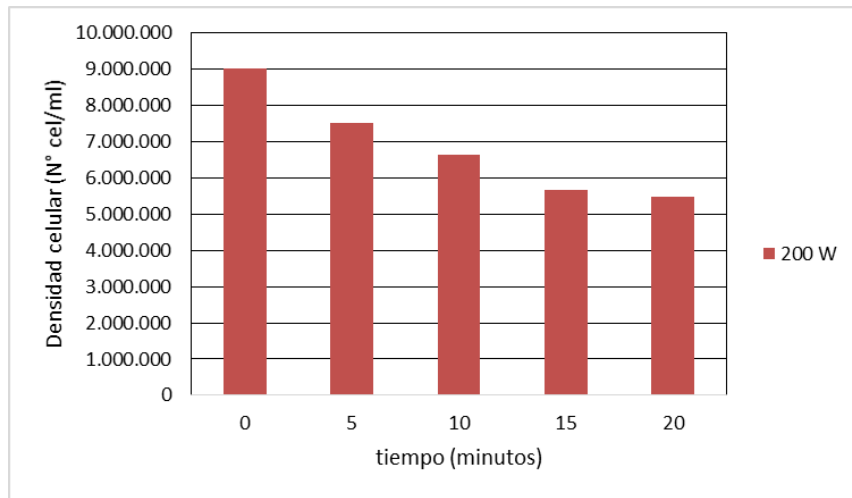


Fig. 19 Densidades celulares del Ensayo de sonicación de *C. vulgaris*.

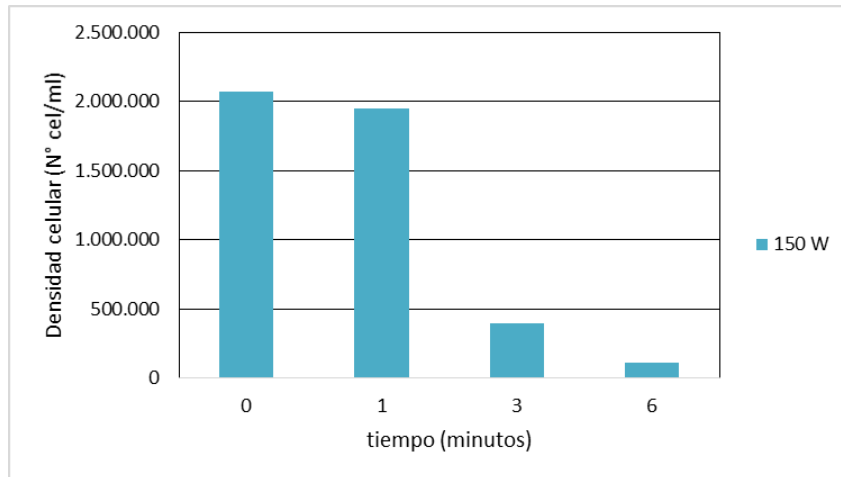


Fig. 20 Densidades celulares del Ensayo de sonicación de *D. salina*.

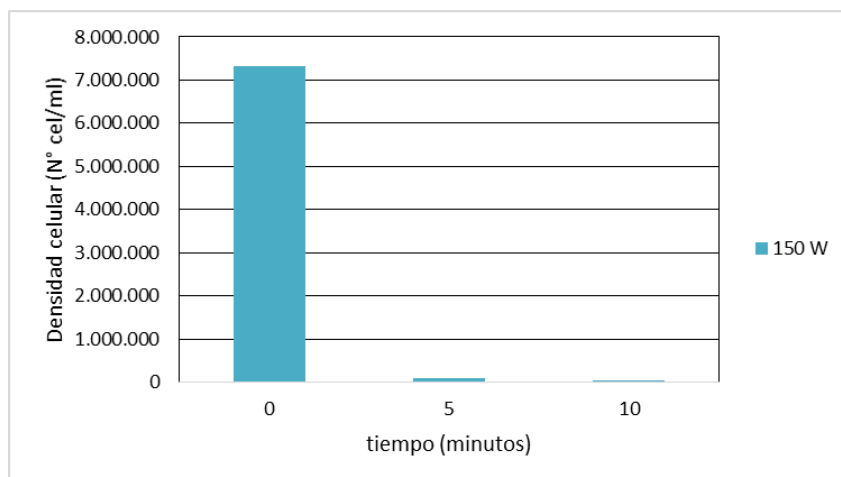


Fig. 21 Densidades celulares del Ensayo de sonicación de *C. reinhardtii*.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

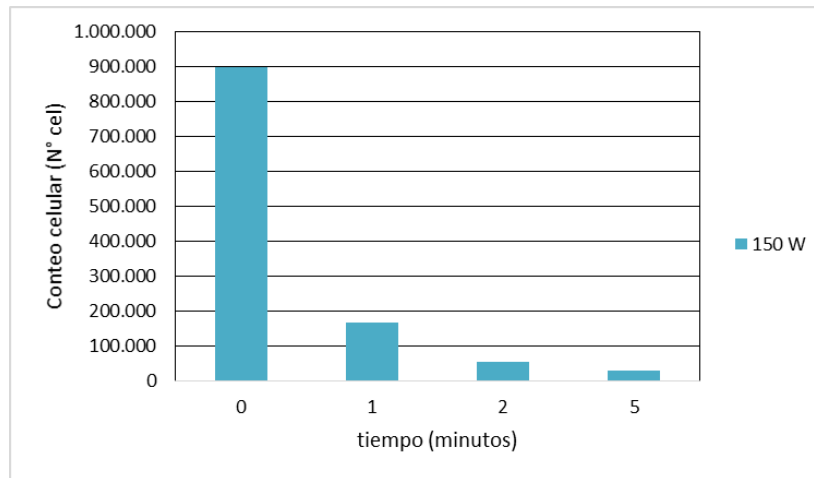


Fig. 22. Conteo celular del Ensayo de sonicación de *Nostoc* sp

La Tabla 7 presenta los Índices de sonicación. A los 20 minutos, para *Scenedesmus* sp fueron de 9,98 % y 14,11 % a 150 W y 200 W, respectivamente y para *C. vulgaris*, de 39,25 % a 200 W. Para *D. salina*, *C. reinhardtii* y *Nostoc* sp los valores fueron más altos, 94,57, 99,31 % y 96.93 % , a 6 , 10 y 5 minutos, respectivamente

Tabla 7. Índices de sonicación

Cepa/Potencia	Potencia	Tiempo	Indice de sonicación
<i>Scenedesmus</i> sp	150 W	20 min	9,98 %
<i>Scenedesmus</i> sp	200 W	20 min	14,11 %
<i>C. vulgaris</i>	200 W	20 min	39,25 %
<i>D. salina</i>	150 W	6 min	94,57 %
<i>C. reinhardtii</i>	150 W	10 min	99,31 %
<i>Nostoc</i> sp	150 W	5 min	96,93 %

7 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De acuerdo a estos resultados se concluye que:

El tratamiento afecta de manera diferente a las especies estudiadas según la presencia o no de pared celular, factor que condiciona la liberación de los componentes internos.

La cuantificación visual con microscopio es un método rápido y eficaz para comprobar la efectividad del sonocado. La cantidad de células dañadas (muertas)

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

presentes en las muestras es proporcional a la energía aplicada en el tratamiento y, por tanto, a medida que aumenta la energía aplicada también lo hace el porcentaje de células no viables, pero esto se dificulta en especies como *Scenedesmus* sp y *C. vulgaris* que tienen la pared celular más resistente y eso se ve reflejado en el índice de sonicación obtenido (14,11% en *Scenedesmus* sp y 39,25 % en *C. vulgaris* para las mejores condiciones de sonicación obtenidas) que es mucho menor que para el resto de las especies (94,57 % para *D. salina*, 99,31 % para *C. reinhardtii* y 96,93% para *Nostoc. sp*).

En el caso de *Scenedesmus* sp las muestras sonicadas no tenían una evidencia visual de rompimiento celular. Sin embargo, al utilizar 200 W y 20 minutos de sonificado el efecto del mismo se observó claramente en extractos etanólicos por la diferencia de intensidad del color (Fig. 23). Estos extractos fueron obtenidos por la Lic. Miras Gagliardi y fueron usados en los ensayos de estimulación de germinación de semillas de Coirón llama (Miras Gagliardi, 2021).

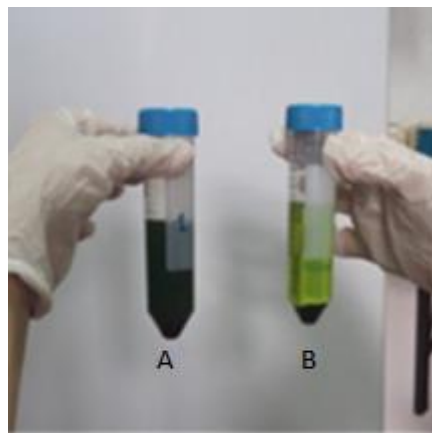


Fig.23. Extracto etanólico de cultivo de *Scenedesmus* sonicado (A) y sin sonificar (B)
Foto usada con el permiso de la Lic. María Belén Miras Gagliardi

La elección de un método de extracción eficaz depende del tipo de microalga utilizada. Estudios anteriores enfatizaron la importancia de seleccionar un método de extracción óptimo, adecuado para cada microalga considerando diferentes tamaños de células, estructura de la pared celular y las características de los compuestos que se desean extraer. La sonicación tiene la ventaja de poder romper las células a temperaturas relativamente bajas en comparación con aplicación de microondas y autoclavado, lo que lleva a una menor

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

desnaturalización térmica de proteínas. Además, el uso de ultrasonido no requiere la adición de perlas o productos químicos como NaCl (para el choque osmótico), que tienen que ser eliminados más adelante en el proceso, lo que aumenta el costo de procesamiento (Gerde y col., 2012). Además, los dispositivos ultrasónicos permiten levantar su escala y operar de forma continua.

El Anexo III presenta la traducción del manual del sonicador y el Anexo IV, una adaptación para el uso del Laboratorio de microalgas.

8 BIBLIOGRAFÍA

Accorinti, J. (1960). Cultivo Unialgal y Masivo de “*Scenedesmus obliquus*” Turp Ktz. Técnicas de Obtención. Museo Argentino de Cs. Naturales “Bernardino Rivadavia” e Instituto Nacional de Investigación de Ciencias Naturales. Cs Botánicas, T.I, Nº 9, Ministerio de Educación y Justicia de la Nación, Dirección General de Cultura. Ed. “Coni”.

Alhattab, M., Kermanshahi-Pour, A. & Brooks, M.S.L. (2019). Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. *Journal of Applied Phycology* 31 (1): 61-88.

Albarracín, I., Cravero, M., Salomón, R., Parra, A., Quintero, R. & García, D. (2011) Ensayo preliminar de diferentes condiciones de cultivo para optimizar el crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* y *Dunaliella salina* en efluentes urbanos de la ciudad de Trelew. Chubut. Argentina. Publicado en Actas del II Congreso Internacional de Ambiente y Energías Renovables. Universidad Nacional de Villa María. Córdoba. Pp. 364-371.

Borowitzka MA. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*. 25(3): 743-756.

Cerón García MC. 2013. Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales. Cuadernos de estudios agroalimentarios. Pp 87-105.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Dos Santos, R.R., Mendonça Moreira, D., Kunigami, C.N., Gomes Aranda, D.A. & Lapa Teixeira, C.M.L. (2015) Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. *Ultrason. Sonochem.* 22: 95-99.

Fuentes Campos, M.E. & Aranda Saldaña, M.D. (2013). Metodología para extracción de aceite de la microalga *Nannochloropsis oculata* usando ultrasonido. *Rev. del Instituto de Investigación (RIIGEO), FIGMMG-UNMSM* 16(32): 34-37.

García-Cuadra, F., Jawiarczyk, N., González-López, C.V., Fernández-Sevilla, J.M. & Acién Fernández, F.G. (2012). Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal* 3(2):147-161.

García Reina, G. & Martel Quintana, A. (2000). Usos y aplicaciones de microalgas y cianobacterias en agricultura ecológica. *Actas del IV Congreso SEAE (Sociedad Española de Agricultura Ecológica), Córdoba, 19-23 de setiembre de 2000.*

Gerde, J.A., Montalbo-Lomboy, M., Yao, L., Grewell, D. & Wanga, T. (2012) Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*, 125: 175-181.

González, A.D., Kafarov, V. & Guzmán Monsalve, A. (2009). Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *Prospect.* 7(2): 53-60.

Halim, R., Rupasinghe, T.W.T., Tull, D.L. & Webley, P.A. (2013). Mechanical cell disruption for lipid extraction from microalgal biomass. *Bioresource Technology* 140: 53-63.

Heo, Y.M., Lee, H., Lee, C. , Kang, J. , Ahn, J.W. , Lee, Y.M., Kang, K.Y., Choi, Y.E. & Kim, J.J. (2017). An integrative process for obtaining lipids and glucose from *Chlorella vulgaris* biomass with a single treatment of cell disruption. *Algal Research*, 27: 286-294.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Hernández-Pérez, A. & Labbé, J.I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2): 157-173.

Hildebrand, G., Poojary, M.M., O'Donnell, C., Lund, M.N., Garcia-Vaquero, M. & Tiwari, B.K. (2020) Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology* 32:1709–1718.

Imam, S.H., Buchanan, M.J., Shin, H.C. & Snell, W.J. (1985). The *Chlamydomonas* cell wall: Characterization of the wall framework. *Journal of Cell Biology*, 101: 1599-1607.

Lee, S.J., Yoon, B.D. & Oh, H.M. (1998). Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus Braunii*. *Biotechnology Techniques*, 2(7): 553-556.

Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y. & Oh, H.M. (2010) Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101 (1): 75-77.

Lee, Y.K., Chen. W., Shen, H., Han. D., Li, Y., Jones, H.D.T. & Timlin, J.A., Hu, Q. (2013) Basic Culturing and Analytical Measurement Techniques. In: *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, Second Edition. Ed. Amos Richmond and Qiang Hu.

Matsunaga, T., Takeyama, H., Miyashita, H. & Yokouchi H. (2005). Marine microalgae. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 96:165-188.

Miras Gagliardi, M.B. (2021) Utilización de la microalga *Scenedesmus brevispina* cultivada en efluente de matadero como bioestimuladora en la germinación de semillas de *Pappostipa humilis* (coirón llama) para la revegetación de ambientes degradados en la Provincia del Chubut. Informe de Práctica Profesional.

Molina Grima, E., Ación Fernández, F.G. & Robles Medina, A. (2004). Downstream processing of cell-mass and products. En: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* Ed. Richmond A, Blackwell Publishing Ltd. Pp. 215-251.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Öğüt, G.C., Konaklı, B., Çalicioğlu, O., Ergüder, T.H., Uludağ-Demirer, S., Kaymak, B. & Demirer, G.N. (2013) Biogas generation from microalgal biomass and the effect of pretreatment. Digital Proceeding Of THE ICOEST '2013, Cappadocia, Ozdemir, C., S. Şahinkaya, S., E. Kalıpcı, E. & M.K. Oden, M.K. (editors).

Onay, M., Sonmez, C., Oktem, H.A. & Yücel, M. (2016). Evaluation of Various Extraction Techniques for Efficient Lipid Recovery from Thermo-Resistant Microalgae, American Journal of Analytical Chemistry, 7: 141-150.

Parra, O.A., González, M., Dellarosa, V., Rivera, P. & Orellana, M. (1982). Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. Tomo I. Cyanophyceae. Univ. de Concepción. Chile

Parra, O.A., González, M. & Dellarosa, V. (1983). Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. Tomo V. Chlorophyceae. Univ. de Concepción. Chile.

Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H. & Ferrer, I. (2014) Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. Bioresource Technology 172: 403-412.

Rippka, R. (1988). Recognition and identification of Cyanobacteria. En: Methods in Enzymology. Volumen 167. Cyanobacteria. Packer, L.; Glazer, A.N. (eds). Academic Press, Inc. pp. 28-67

Salomón, R., Cravero, M., Rost, E., Carstens, M., Parra, A. & Albarracín I. (2014). Cultivo en efluentes urbanos del alga *Scenedesmus quadricauda* (Sphaeropleales: Scenedesmaceae) y su potencial para biodiesel: perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos. Cuadernos de Investigación UNED. 6(2): 213-221.

Sánchez Carmona, R., Martín García, I. & Draissi, K.F. (2016) Efectos del tratamiento ultrasónico sobre las microalgas y algunos parámetros relacionados con la calidad del agua en una balsa de riego. Tecnoagua 18: 74-84.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Throndsen, J.C.R. (1997). The planktonic marine flagellates. In: Thomas, J. Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press. Florida. pp 858.

Walne, P.R. (1966) Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L Fish Inv. Ser. II, vol. XXV, núm. 4. En: Walne, P.R. 1974. Culture of Bivalve Molluscs: 50 years experience at Conwy. Fishing News (Books) Ltd. 205 p

Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X. & Dou, C. (2011) Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis and Microwaves. Appl. Biochem. Biotechnol.164:1215–1224.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

9 ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO

9.1

Medio Detmer modificado

Fuente: Accorinti, 1960

Solución A (Macronutrientes)

Compuesto	Solución Stock (M)	Solución Stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentración en la solución final de medio (M)
Ca(NO ₃) ₂	6,09 x 10 ⁻²	10,0	1,52 x 10 ⁻³
KH ₂ PO ₄	1,84 x 10 ⁻²	2,5	4,59 x 10 ⁻⁴
MgSO ₄	2,08 x 10 ⁻²	2,5	5,19 x 10 ⁻⁴
KCl	3,35 x 10 ⁻²	2,5	8,37 x 10 ⁻⁴

Solución B (Tartrato férrico)

Compuesto	Solución Stock (M)	Solución Stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentración en la solución final de medio (M)
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	3,36 x 10 ⁻²	9,1	3,36 x 10 ⁻⁵
Acido tartárico(C ₄ H ₆ O ₆)	3,33 x 10 ⁻²	5,0	3,33 x 10 ⁻⁵

Nota: El Cl₃Fe ataca al papel de aluminio. El Ácido tartárico se agrega al medio para evitar la precipitación del Fe durante la esterilización.

Solución C (Micronutrientes)

Compuesto	Solución Stock (M)	Solución Stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentración en la solución final de medio (M)
H ₃ BO ₃	4,63 x 10 ⁻²	2,86	4,63 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ · 4H ₂ O	9,15 x 10 ⁻³	1,81	9,15 x 10 ⁻⁶
ZnCl ₂	8,07 x 10 ⁻⁴	0,11	8,07 x 10 ⁻⁷
CuCl ₂	3,72 x 10 ⁻⁴	0,05	3,72 x 10 ⁻⁷

Observaciones: Para 1 litro de solución final de medio se necesita:

Solución A: 25 mL

Solución B: 1,0 mL

Solución

C: 1,0 mL

Se utiliza agua destilada para llevar a 1 litro de solución final.

Se debe ajustar el pH de la solución final a 6,8 con NaOH 0,40 % (m/v).

Se esteriliza en autoclave a 120 °C y 1,5 kg/cm² durante 25 minutos.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

9.2 MEDIO BG-11.

Fuente: Rippka, 1988.

Compuesto	Cantidad	Solución stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentración en la solución final (M)
Ácido cítrico	1 mL	6	3,13 x 10 ⁻⁵
Citrato amónico férrico		6	1,01 x 10 ⁻⁵
NaNO ₃	1,5 g	---	1,76 x 10 ⁻²
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1 mL	40	1,75 x 10 ⁻⁴
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 mL	75	3,04 x 10 ⁻⁴
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 mL	36	2,45 x 10 ⁻⁴
Na ₂ EDTA (Na ₂ C ₁₀ O ₈ N ₂ H ₁₄ · 2H ₂ O)	1 mL	1,004	2,70 x 10 ⁻⁶
Na ₂ CO ₃	1 mL	20	1,89 x 10 ⁻⁴
Solución de Micronutrientes	1 mL		

Solución de micronutrientes (A5 + Co).

Compuesto	Solución Stock (M)	Solución Stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentración en la solución final de medio (M)
H ₃ BO ₃	4,62 x 10 ⁻²	2,86	4,62 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ · 4H ₂ O	9,15 x 10 ⁻³	1,81	9,15 x 10 ⁻⁶
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	7,65 x 10 ⁻⁴	0,22	7,65 x 10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1,61 x 10 ⁻³	0,39	1,61 x 10 ⁻⁶
CuSO ₄ · 5H ₂ O	3,16 x 10 ⁻⁴	0,079	3,16 x 10 ⁻⁷
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	1,68 x 10 ⁻⁴	0,049	1,68 x 10 ⁻⁷

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

9.3 Medio Walne

Fuente: Walne (1966)

Solución 1

Compuesto	Masa (g)	Concentración en la solución stock (M)	Solución Stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentración en la solución final de medio (M)
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1,30	0,0048	1,30	4,81 x 10 ⁻⁶
Na ₂ EDTA(anhidro)	45,00	0,1338	45,00	1,34 x 10 ⁻⁴
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,36	0,0018	0,36	1,82 x 10 ⁻⁶
H ₃ BO ₃	33,60	0,5434	33,60	5,43 x 10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ 2 H ₂ O	20,00	0,1282	20,00	1,28 x 10 ⁻⁴
NaNO ₃	100,00	1,1765	100,00	1,18 x 10 ⁻³
Solución de oligoelementos	1 mL			
Agua destilada	Hasta 1 L			

Solución de Oligoelementos

Compuesto	Masa (g)	Concentración en la solución stock (M)	Solución Stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentración en la solución final de medio (M)
ZnCl ₂	2,1	0,154	21	1,54 x 10 ⁻⁷
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,0	0,0841	20	8,41 x 10 ⁻⁸
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,9	0,0072	9	7,28 x 10 ⁻⁹
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,0	0,0801	20	8,01 x 10 ⁻⁸
Agua destilada	Hasta 100 mL			

Es necesario acidificar esta disolución con HCl para obtener un líquido transparente.

Solución 2

Compuesto	Masa (g)	Concentración en la solución stock (M)	Solución stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentración en la solución final de medio (M)
Na ₂ SiO ₃	4	0,3279	40	3,28 x 10 ⁻⁵
Agua destilada	Hasta 100 mL			

Solución 3 (Vitaminas)

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Compuesto	Masa (g)	Concentración en la solución stock (M)	Solución stock (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentración en la solución final de medio (M)
B₁₂(Cyanocobalamina)	0,005	$3,69 \times 10^{-5}$	0,05	$3,69 \times 10^{-8}$
B₁ (Tiamina)	0,100	$3,33 \times 10^{-3}$	1,00	$3,33 \times 10^{-6}$
Agua destilada	Hasta 100 mL			

Observaciones: Para 1 litro de solución final de medio se necesita:

Solución 1: 1 mL

Solución 2: 0,1 mL

Solución 3: 1 mL

Se lleva a 1 Litro con agua de mar filtrada.

Se esteriliza en autoclave a 120 °C y 1,5 kg/cm² durante 25 minutos

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

10 ANEXO II. CONTEO DE NOSTOC sp



Fig. 23. Fotografía de la muestra inicial de *Nostoc* sp. (Tomada con objetivo 20X)

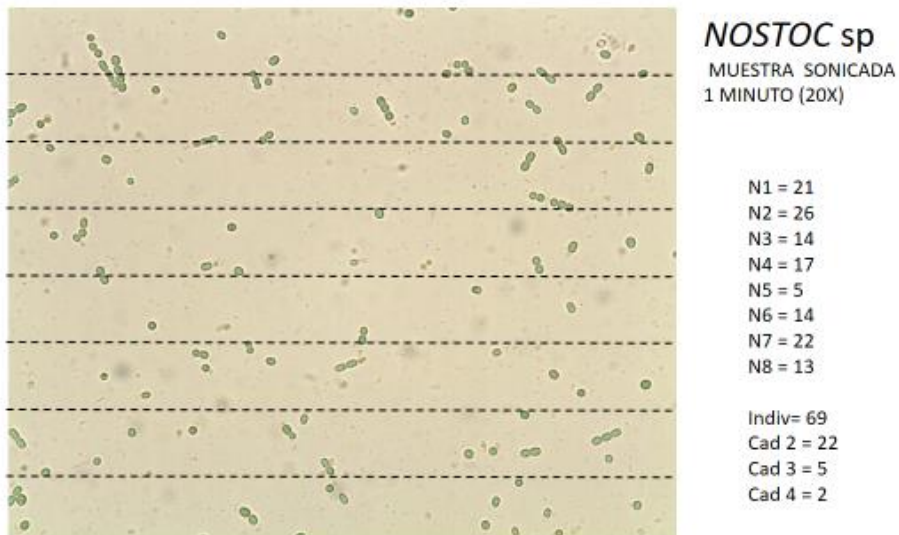


Fig. 24. Fotografía de muestra de *Nostoc* sp sonicada durante 1 minuto. (Tomada con objetivo 20X).

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”



Fig. 25. Fotografía de muestra de *Nostoc* sp sonicada durante 2 minutos. (Tomada con objetivo 20X)



Fig. 26. Fotografía de muestra de *Nostoc* sp sonicada durante 5 minutos. (Tomada con objetivo 20X).

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

11 ANEXO III: TRADUCCIÓN DEL MANUAL DEL SONICADOR

Manual de operación del Homogeneizador ultrasónico JY88-IIN

11.1 General

Los homogeneizadores ultrasónicos JY88 –II N y JY 96 – II N son aparatos multifuncionales que pueden someter a distintos materiales a ondas ultrasónicas fuertes, creando un efecto de cavitación en un medio líquido. Se utilizan para romper tejidos de animales y plantas, células, bacterias y esporas de bacterias, y emulsionar, separar, mezclar dichos materiales, y además para desgaseificar, eliminar espumas, y acelerar reacciones químicas. Son herramientas ideales para separar, reformar y recombinar sustancias orgánicas, inorgánicas y nano-materiales. Este instrumento puede utilizarse en investigación y en producción en los campos de la bioquímica, microbiología, química médica, química de superficie, química inorgánica, física, zoología, y otros.

11.2 Parámetros técnicos

(1) Rango de frecuencia de trabajo: 20-25 kHz, seguimiento automático con frecuencia

Potencia de salida del generador:

JY88- II N: 250 W (máx)

JY96- II N: 150 W (máximo).

(2) Rango de ajuste de potencia

JY88- II N: 20-250 W (ajuste continuo)

JY96- II N: 20-150 W (ajuste continuo)

(3) Precisión en el control de tiempo: configuración aleatoria dentro del 10%

(4) Establecimiento del tiempo de trabajo: 1-99 minutos, pantalla digital

Configuración del tiempo de trabajo ultrasónico: 1 -99% (relación de tiempo de modulación de pulsos)

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

(5) Diámetros del extremo de la barra de cambio de amplitud

J Y 88- II N: se puede seleccionar entre Φ 2, Φ 3, Φ 6, Φ 8.

JY96- II N: se puede seleccionar entre Φ 2, Φ 3, Φ 6.

(6) Voltaje de trabajo: 220 V AC \pm 5%, 50 Hz

(7) Ambiente de trabajo: 0-40°C, Humedad Relativa: 80, Presión: 760 \pm 30 mmHg

(8) Dimensiones externas.

Generador: 220x280x400 mm

Caja de aislamiento acústico: 250x270x170 mm

(9) Peso neto: 23 Kg.

11.3 Principios de funcionamiento

El instrumento está compuesto por dos partes principales: un generador de ondas ultrasónicas y un dispositivo de conversión de energía de las ondas ultrasónicas.

El generador de ondas ultrasónicas (fuente de alimentación) puede cambiar la energía eléctrica comercial de 220 V AC y 50 Hz en otra de 600 V AC y 20-25 kHz, lo que permite al dispositivo de conversión de energía vibrar longitudinalmente con una impedancia y potencia adecuadas. Las ondas de vibración producen el efecto de cavitación a través de la barra de titanio en la solución de muestra y da como resultado la vibración de las partículas biológicas en el medio, provocando la ruptura de las células.

El generador de ondas ultrasónicas (fuente de alimentación) se compone de un sistema de cambio de frecuencia, interruptores, amplificador de potencia, controlador de tiempo, seguidor de frecuencias, dispositivos de ajuste e inspección de potencia y de protección; además, adopta una tecnología de seguimiento de frecuencias con enganche automático de fase, que extiende la vida útil de la barra de cambio de amplitud. Tiene características sobresalientes,

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

tales como tamaño pequeño, liviano, alta eficiencia de cambio. En la Figura 1 se ve en detalle la estructura de trabajo.

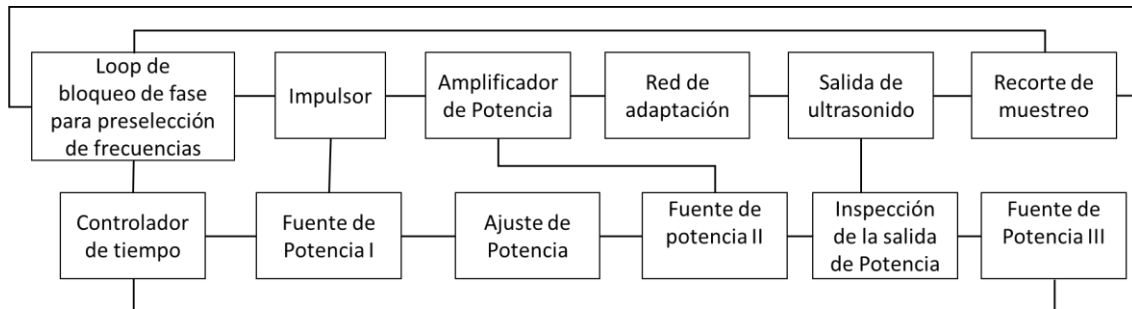


Figura 1. Detalle la estructura de trabajo

La tecnología de seguimiento automático de frecuencia, que incluye el recorte de muestreo, frecuencia de fase móvil preseleccionada y tecnología de lazo de seguimiento de fases, puede mantener el equipo funcionando en la frecuencia de vibración óptima. El circuito de alimentación es un circuito de conmutación de medio puente.

El controlador de tiempo se configura con el interruptor de código de circuito de base de tiempo estándar 8421, que muestra la información digitalmente.

Se adopta para el ajuste de potencia el circuito de ajuste lineal de presión externa, que puede hacer que el circuito sea simple, confiable y eficiente en el ajuste.

La potencia de salida se indica con un medidor de potencia indexado.

La fuente de alimentación II es de 300 V, que se obtiene de la electricidad comercial después de rectificación y filtrado.

Las fuentes de alimentación I y III son de 24 V y +12-5 V respectivamente, que se suministran por un transformador.

El dispositivo de conversión de energía está compuesto por un sistema de conversión de energía, la barra de cambio de amplitud y el soporte. El sistema de conversión de energía transforma la potencia alterna ultrasónica alimentada en energía mecánica que vibra longitudinalmente; la función de la barra de cambio de amplitud es acumular y cambiar la amplitud. La energía de vibración amplificada ingresa al líquido desde el extremo de la barra en forma de onda

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

expansiva, y produce un efecto de explosión por cavitación y luego produce el efecto residual del ultrasonido, como por ejemplo, ruptura o emulsificación.

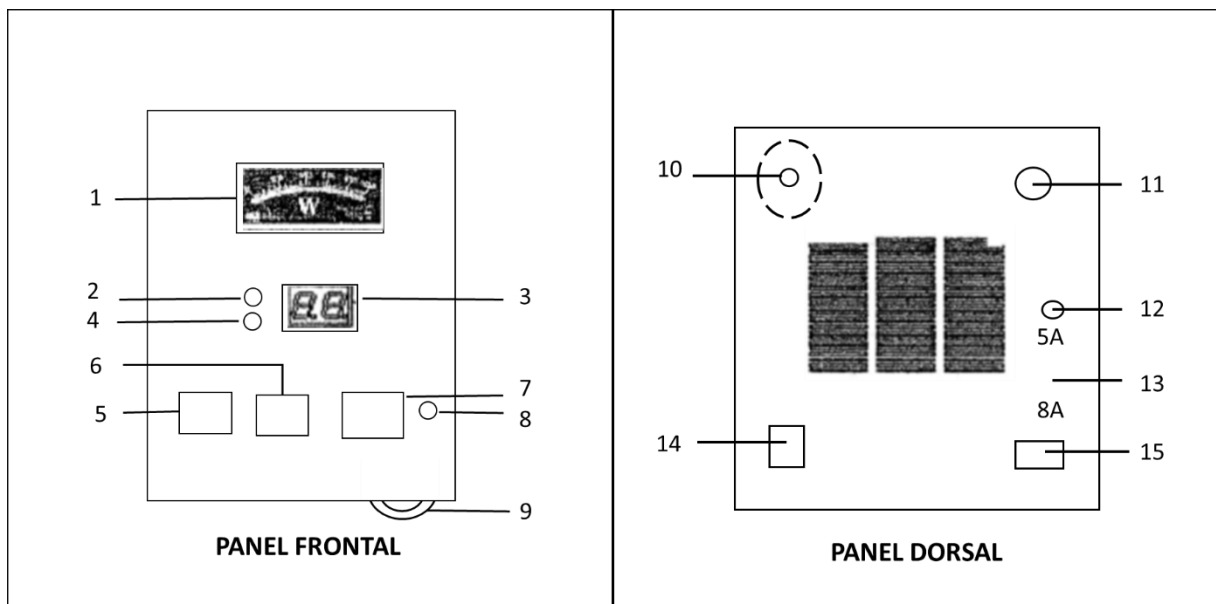
11.4 Explicación de las teclas de funcionamiento del instrumento

La máquina está compuesta por dos partes, un generador de ultrasonidos (energía eléctrica) y un dispositivo de conversión de energía, conectados por un cable especial, que hace que la máquina sea más flexible.

La sonda o barra metálica puede seleccionarse según el propósito.

La máquina está equipada con una sonda; JY88-II N y JY96-IIN están equipados con una barra F6. También están disponibles las barras de F2, F3 y F 8. Se suministra una llave especial con la máquina para el cambio de las barras.

Advertencia: inserte la sonda sumergiéndola en la solución entre 10 y 15 mm; el extremo de la barra deberá estar al menos a 30 mm del fondo. Está prohibido hacer vibrar la barra sin insertarla en la solución.



1) indicador de potencia

2) Indicador ultrasónico

3) indicador de tiempo

4) indicador de descanso

5) restablecimiento del trabajo

9) ajuste de potencia

10) interruptor de selección de la sonda

11) toma de conversión de energía

12) Fusible 5A

13) fusible 8A

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

6) restablecimiento de protección 7) configuración de datos 8) pulso	14) Fuente de Poder 15) Toma de entrada (Para la conexión a la red eléctrica).
--	---

Figura 2. Vista Frontal y Dorsal del equipo.

Descripción	Funciones
1 Indicador de Potencia ("Power display")	Indicación de la potencia emitida (W)
2. Indicador ultrasónico	Si se prende este indicador significa que el equipo ha estado trabajando durante demasiado tiempo.
3. Indicador de Tiempo ("Time display")	El tiempo que se muestra en esta ventana es el tiempo total del período establecido por el usuario. Después de todo el período, esta ventana muestra "se acabó el tiempo" ("time is up") y se detiene, lo que le recuerda al usuario que apague o reinicie el aparato.
4. Indicador de descanso	El encendido de este indicador significa que la máquina ha estado trabajando durante demasiado tiempo.
5. Restablecimiento del trabajo ("Working/ Return")	La tecla de restablecimiento también es la tecla de arranque del ultrasonido; presione esta tecla nuevamente después de algún problema de sobrecarga (para reiniciar el equipo).
6. Restablecimiento de protección ("Protect/Return")	Cuando la máquina está con una carga excesiva, se enciende el indicador de esta tecla, la onda ultrasónica deja de funcionar; presione esta tecla nuevamente después de la resolución del problema.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

7 Configuración de datos (“Setting”)	Establece el tiempo total de trabajo
8. Pulso (“Pulse”)	Ajusta la relación de trabajo entre la onda ultrasónica y el tiempo libre
9. Ajuste de potencia	Ajusta la potencia de la onda ultrasónica
10. Interruptor de selección de la barra magnética o sonda	Selecciona la inductancia coincidente con el tamaño de la barra
11. Toma de conversión de energía	Zócalo para receptáculo especial del dispositivo de conversión de energía.
12. 5 A	Fusible 5 ^a
13. 8 A	Fusible 8 ^a
14. Interruptor de encendido	Interruptor de alimentación general
15. Toma de entrada	Conecta el equipo a la red eléctrica

11.5 Explicaciones de operación/funcionamiento

Conecte la toma de entrada (15) en la parte posterior del generador con potencia comercial (220 VCA) con una línea de alimentación especial.

1) Conecte el enchufe de entrada de señal del dispositivo de conversión de energía con el de salida de señal (11) del generador; la instalación del equipo ha terminado.

El botón (9) en la parte inferior derecha del panel frontal del generador es el botón de ajuste de potencia, que se puede usar para ajustar la potencia de salida del equipo; la potencia de salida se muestra con el medidor de potencia (1).

La perilla (8) es para el ajuste de pulso, se usa para establecer el tiempo en el que se aplica ultrasonido y el intervalo libre, el tiempo total de trabajo se ajustará con el interruptor (7). Después de configurar con (7) y (8), presione la tecla de inicio de trabajo (5) y la tecla de establecimiento de protección (6) para ingresar al estado de trabajo ultrasónico.

2) Seleccione un recipiente adecuado (tubo de ensayo, vaso o tubo de centrífuga) según sea la cantidad de muestra; fije o coloque el recipiente, ajuste

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

la posición del dispositivo de conversión de energía de modo que el extremo de la sonda pueda insertarse en la solución entre 10 y 15 mm, y en el centro del recipiente (para evitar el contacto directo de la barra y el recipiente). El extremo de la barra debe estar al menos a 30 mm del fondo del recipiente. Cuando la solución es relativamente menor, esta distancia puede ser inferior a 30 mm.

3) Gire el botón de ajuste de potencia en el sentido contrario a las agujas del reloj hasta la posición mínima, ajuste el tiempo de trabajo, el tiempo de ultrasonidos y el intervalo libre adecuados. (generalmente, el tiempo de trabajo no debe ser muy largo, y el intervalo libre debe ser más largo que el tiempo de trabajo). Después de dicha preparación, enciéndalo, el indicador se ilumina, presione el botón de reinicio de la protección una vez (6) y luego presione reiniciar el trabajo (5), la máquina ingresa al estado de trabajo después del intervalo de tiempo establecido. Después de que se haya visualizado el tiempo de trabajo, gire el botón de ajuste de potencia lentamente en el sentido de las agujas del reloj hasta la potencia necesaria para alcanzar el efecto de trabajo ideal. Una vez que haya pasado el tiempo de trabajo establecido, la ventana de visualización de la hora (3) muestra ese tiempo total. El equipo deja de vibrar. Si el usuario necesita volver a hacer el trabajo, presiona la tecla de reinicio del trabajo (5); si el usuario no desea volver a hacer el trabajo, apaga el equipo y corta la conexión de alimentación.

4) Si el indicador de protección (4) se enciende durante el tiempo de trabajo (en la tecla de restablecimiento de protección), la potencia del equipo es demasiado alta y el equipo entra en estado de protección; se debe disminuir la potencia, presionar la tecla de reinicio de la protección una vez (6) y la tecla de reinicio del trabajo (5), luego el equipo arranca nuevamente. ■

5) Cuando reemplace la sonda, ajuste el interruptor de selección de diámetro de la barra según la especificación de la sonda (10) (en la parte posterior de la carcasa del equipo); si el usuario encuentra que la máquina no puede emitir ondas ultrasónicas, gire el interruptor de selección hasta que el equipo emita ondas ultrasónicas normalmente.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

11.6 PRECAUCIONES

- 1) Está prohibido encender el equipo cuando la barra no se ha insertado en la solución, de lo contrario pueden dañarse el dispositivo de conversión de energía o el generador de ondas ultrasónicas.
- 2) El dispositivo de conversión de energía se fijará firmemente sobre el soporte para evitar que se deslice desde la columna de repente. El extremo de la barra metálica no debe tocarse para evitar deformaciones o daños.
- 3) Seleccione el mejor valor de cantidad de células, tiempo y potencia, de acuerdo con la experiencia del usuario.
- 4) Si el extremo de la barra metálica se ha corroído, limarlo o rasparlo con una piedra de afilar o un raspador para evitar un impacto negativo en los resultados del trabajo.
- 5) El valor mostrado por el medidor de potencia puede verse afectado por el voltaje, la profundidad de la barra insertada en la solución y la carga (concentración y densidad de las muestras que se van a tratar). El valor mostrado puede ser un poco menor si el voltaje es inferior a 220V, la barra está insertada demasiado en la solución o la solución es demasiado densa; a la inversa, el valor será más alto. Sin embargo, el valor mostrado es un parámetro simulado, su alteración, no afectará la potencia real de la onda ultrasónica.
- 6) El equipo no necesita precalentamiento, debe estar equipado con una buena puesta a tierra.
- 7) Al romper el material con ondas ultrasónicas, debido al efecto de la cavitación de la onda en la solución, la temperatura de la solución aumentará rápidamente; el usuario debe prestar atención a la temperatura máxima que puedan soportar las diferentes células. Sugerimos sonicar el material muchas

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

veces en tiempos cortos (menos de 5 segundos por vez) y enfriar el material con un baño de hielo.

8) El equipo se utilizará con el interruptor sin el transformador de frecuencia, y se evitará el contacto después de que se haya abierto la caja del generador para evitar impactos. El equipo es confiable y no se dañará. Contactarse con el proveedor del equipo si hubiera algún daño.

9) El equipo debe colocarse en un lugar seco, evitando los lugares húmedos, calientes o con gases contaminantes y corrosivos.

10) La experiencia muestra que sonicar repetidamente en poco tiempo es mejor que el sonicado continuo en un tiempo prolongado para evitar el calentamiento de la solución; se puede establecer un largo tiempo de intervalo entre sonicado y sonicado. Además, el trabajo continuo en tiempo prolongado puede acortar la vida útil del equipo.

11.7 Desmontaje de la barra o sonda (Ver Figura 3)

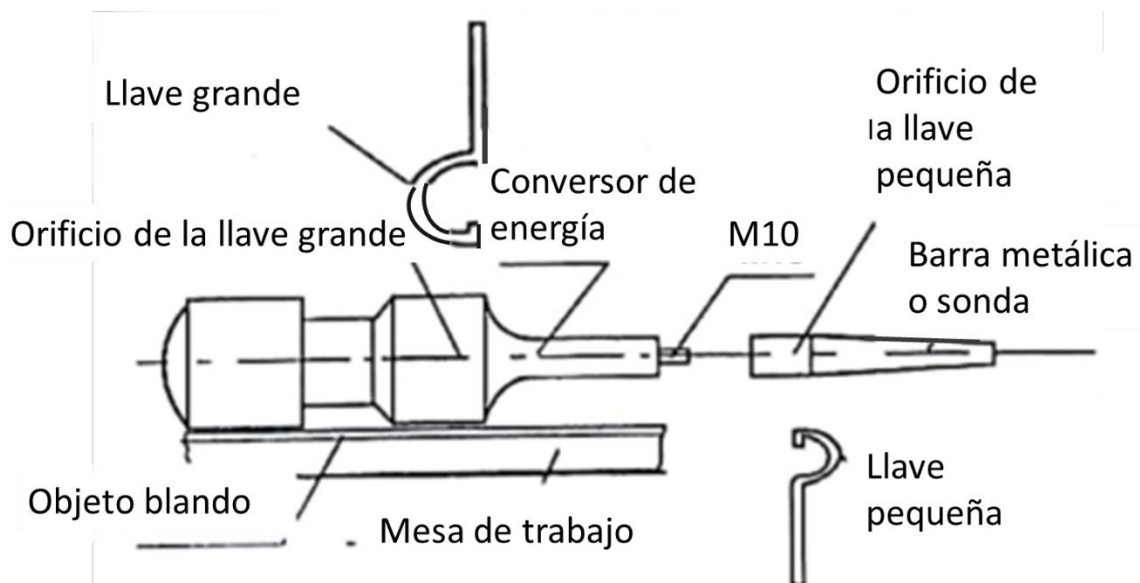


Figura 3. Desmontaje de la sonda

Coloque el dispositivo de conversión de energía en una silla sobre un objeto blando (como una toalla), coloque la llave pequeña en el orificio de la sonda y luego coloque la llave grande en el orificio del dispositivo de conversión de

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

energía. Cuando empuje y coloque la llave pequeña y la grande, aplique las fuerzas horizontalmente.

Tome la llave pequeña con la mano izquierda y la llave grande con la mano derecha, las dos manos actuando al mismo tiempo; girar hacia abajo, es para soltar los pernos. Al tomar la llave grande con la mano izquierda y la llave pequeña con la mano derecha, las dos manos actuando al mismo tiempo, al girar hacia abajo, se apretan los pernos.

La barra está equipada con tornillos M10, cuando el usuario reemplaza la barra, sacará el tornillo y luego colocará el tornillo en el dispositivo de conversión de energía, y apretará los tornillos. Si es difícil apretar los tornillos en la barra de cambio de amplitud, golpee la barra con tornillos contra una madera, los tornillos de esta manera pueden apretarse.

11.8 Lista de empaque

1. Conjunto de generador de ondas ultrasónicas	1
2. Sistema de vibración (máquina de cambio de energía)	1 conjunto
3. Caja a prueba de sonidos	1
4. Pinza cruzada (en la caja a prueba de sonidos)	1 conjunto
5. Abrazadera del tubo de prueba (en caja a prueba de sonido)	1 conjunto
6. Toma de cable de suministro de energía	1 pieza
7. Llave especial (para desmantelar la sonda)	1 juego
8. Fusibles	4 piezas
9. Manual de operación	1 copia
10. Certificado de calidad	1 copia
11. Documento de garantía de calidad (garantía de calidad)	1 copia

+ La compañía puede realizar la reparación, renovación e instalación de la sonda para los sonicadores ultrasónicos hechos en Norte América, Reino Unido, Japón y Alemania.

+ La compañía compra los sonicadores viejos y reemplaza equipos viejos por nuevos.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Agradecimiento:

Al Ing. Electrónico Marcos Blasco por la lectura y corrección de esta traducción y sus valiosas sugerencias.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

12 ANEXO IV: MANUAL DEL SONICADOR PARA EL LABORATORIO DE MICROALGAS

Manual de operación del Homogeneizador ultrasónico JY88-IIN

12.1 General

Los homogeneizadores ultrasónicos JY88 –II N y JY 96 – II N son aparatos multifuncionales que pueden someter a distintos materiales a ondas ultrasónicas fuertes, creando un efecto de cavitación en un medio líquido. Se utilizan para romper tejidos de animales y plantas, células, bacterias y esporas de bacterias, y emulsionar, separar, mezclar dichos materiales, y además para desgasificar, eliminar espumas, y acelerar reacciones químicas. Son herramientas ideales para separar, reformar y recombinar sustancias orgánicas, inorgánicas y nano-materiales. Este instrumento puede utilizarse en investigación y en producción en los campos de la bioquímica, microbiología, química médica, química de superficie, química inorgánica, física, zoología, y otros.

12.2 Parámetros técnicos

(10) Rango de frecuencia de trabajo: 20-25 kHz, seguimiento automático con frecuencia

Potencia de salida del generador:

JY88- II N: 250 W (máx)

JY96- II N: 150 W (máximo).

(11) Rango de ajuste de potencia

JY88- II N: 20-250 W (ajuste continuo)

JY96- II N: 20-150 W (ajuste continuo)

(12) Precisión en el control de tiempo: configuración aleatoria dentro del 10%

(13) Establecimiento del tiempo de trabajo: 1-99 minutos, pantalla digital

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Configuración del tiempo de trabajo ultrasónico: 1 -99% (relación de tiempo de modulación de pulsos)

(14) Diámetros del extremo de la barra de cambio de amplitud

J Y 88- II N: se puede seleccionar entre Φ 2, Φ 3, Φ 6, Φ 8.

JY96- II N: se puede seleccionar entre Φ 2, Φ 3, Φ 6.

(15) Voltaje de trabajo: 220 V AC \pm 5%, 50 Hz

(16) Ambiente de trabajo: 0-40°C, Humedad Relativa: 80, Presión: 760 \pm 30 mmHg

(17) Dimensiones externas.

Generador: 220x280x400 mm

Caja de aislamiento acústico: 2 50x270x170 mm

(18) Peso neto: 23 Kg.

12.3 Principios de funcionamiento

El instrumento está compuesto por dos partes principales: un generador de ondas ultrasónicas y un dispositivo de conversión de energía de las ondas ultrasónicas.

El generador de ondas ultrasónicas (fuente de alimentación) puede cambiar la energía eléctrica comercial de 220 V AC y 50 Hz en otra de 600 V AC y 20-25 kHz, lo que permite al dispositivo de conversión de energía vibrar longitudinalmente con una impedancia y potencia adecuadas. Las ondas de vibración producen el efecto de cavitación a través de la barra de titanio en la solución de muestra y da como resultado la vibración de las partículas biológicas en el medio, provocando la ruptura de las células.

El generador de ondas ultrasónicas (fuente de alimentación) se compone de un sistema de cambio de frecuencia, interruptores, amplificador de potencia, controlador de tiempo, seguidor de frecuencias, dispositivos de ajuste e inspección de potencia y de protección; además, adopta una tecnología de seguimiento de frecuencias con enganche automático de fase, que extiende la

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

vida útil de la barra de cambio de amplitud. Tiene características sobresalientes, tales como tamaño pequeño, liviano, alta eficiencia de cambio.

El dispositivo de conversión de energía está compuesto por un sistema de conversión de energía, la barra de cambio de amplitud y el soporte. El sistema de conversión de energía transforma la potencia alterna ultrasónica alimentada en energía mecánica que vibra longitudinalmente; la función de la barra de cambio de amplitud es acumular y cambiar la amplitud. La energía de vibración amplificada ingresa al líquido desde el extremo de la barra en forma de onda expansiva, y produce un efecto de explosión por cavitación y luego produce el efecto residual del ultrasonido, como por ejemplo, ruptura o emulsificación.

12.4 Explicación de las teclas de funcionamiento del instrumento

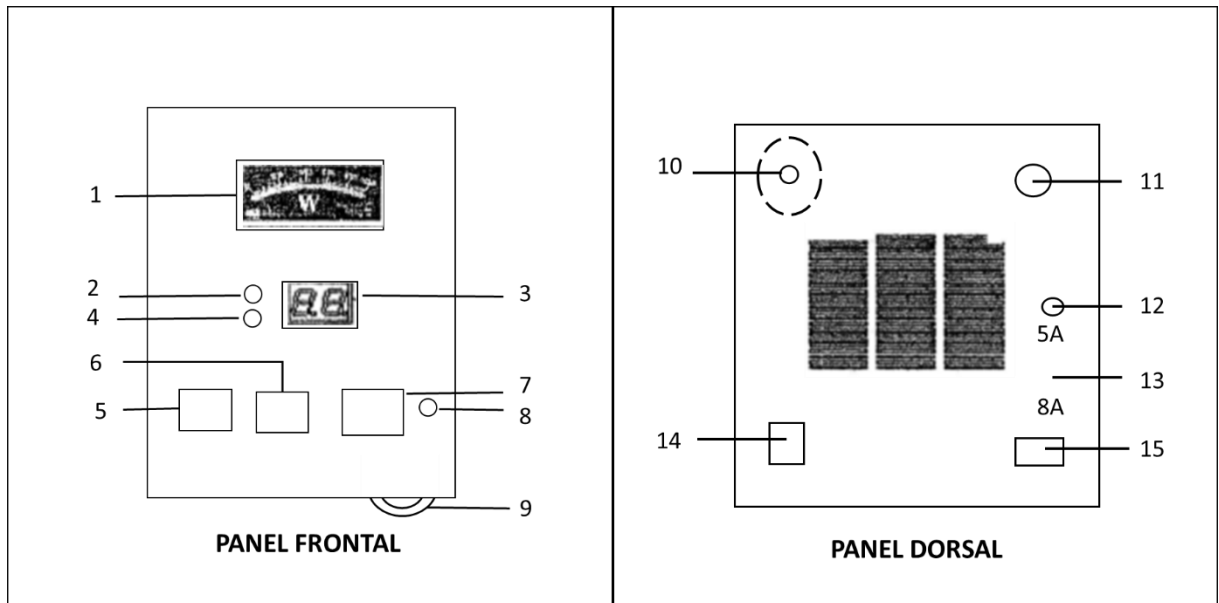
La máquina está compuesta por dos partes, un generador de ultrasonidos (energía eléctrica) y un dispositivo de conversión de energía, conectados por un cable especial, que hace que la máquina sea más flexible.

La sonda o barra metálica puede seleccionarse según el propósito.

La máquina está equipada con una sonda; JY88-II N y JY96-IIN están equipados con una barra F6. También están disponibles las barras de F2, F3 y F 8. Se suministra una llave especial con la máquina para el cambio de las barras.

Advertencia: inserte la sonda sumergiéndola en la solución entre 10 y 15 mm; el extremo de la barra deberá estar al menos a 30 mm del fondo. Está prohibido hacer vibrar la barra sin insertarla en la solución.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”



1) indicador de potencia

2) Indicador ultrasónico

3) indicador de tiempo

4) indicador de descanso

5) restablecimiento del trabajo

6) restablecimiento de protección

7) configuración de datos

8) pulso

9) ajuste de potencia

10) interruptor de selección de la sonda

11) toma de conversión de energía

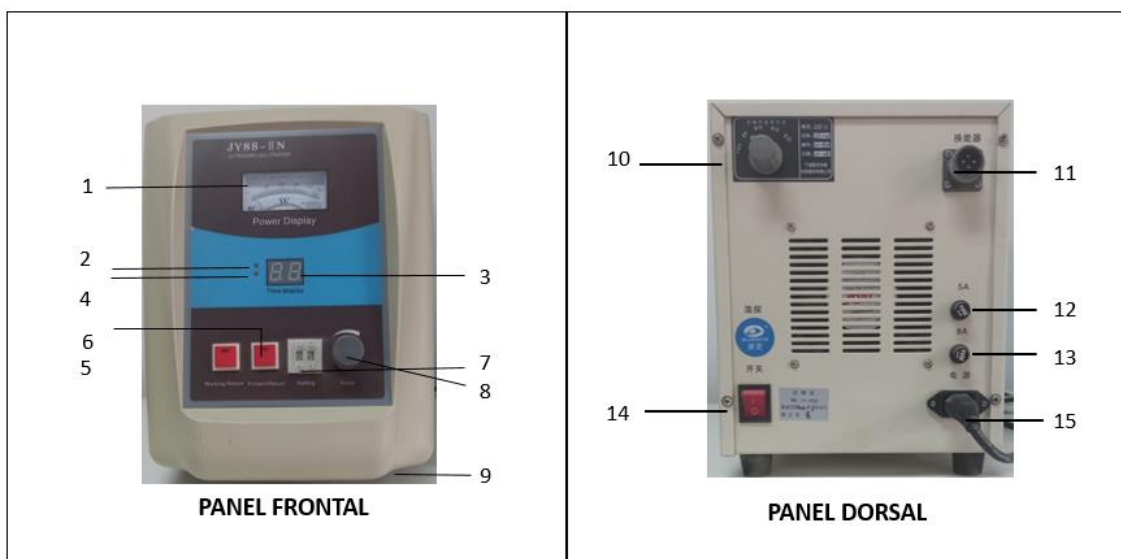
12) Fusible 5A

13) fusible 8A

14) Fuente de Poder

15) Toma de entrada (Para la conexión a la red eléctrica).

Figura 2. Vista Frontal y Dorsal del equipo.



“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Descripción	Funciones
1 Indicador de Potencia ("Power display")	Indicación de la potencia emitida (W)
2. Indicador ultrasónico	Si se prende este indicador significa que el equipo ha estado trabajando durante demasiado tiempo.
3. Indicador de Tiempo ("Time display")	El tiempo que se muestra en esta ventana es el tiempo total del período establecido por el usuario. Después de todo el período, esta ventana muestra "se acabó el tiempo" ("time is up") y se detiene, lo que le recuerda al usuario que apague o reinicie el aparato.
4. Indicador de descanso	El encendido de este indicador significa que la máquina ha estado trabajando durante demasiado tiempo.
5. Restablecimiento del trabajo ("Working/ Return")	La tecla de restablecimiento también es la tecla de arranque del ultrasonido; presione esta tecla nuevamente después de algún problema de sobrecarga (para reiniciar el equipo).
6. Restablecimiento de protección ("Protect/Return")	Cuando la máquina está con una carga excesiva, se enciende el indicador de esta tecla, la onda ultrasónica deja de funcionar; presione esta tecla nuevamente después de la resolución del problema.
7 Configuración de datos ("Setting")	Establece el tiempo total de trabajo
8. Pulso ("Pulse")	Ajusta la relación de trabajo entre la onda ultrasónica y el tiempo libre

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

9. Ajuste de potencia	Ajusta la potencia de la onda ultrasónica
10. Interruptor de selección de la barra magnética o sonda	Selecciona la inductancia coincidente con el tamaño de la barra
11. Toma de conversión de energía	Zócalo para receptáculo especial del dispositivo de conversión de energía.
12. 5 A	Fusible 5 ^a
13. 8 A	Fusible 8 ^a
14. Interruptor de encendido	Interruptor de alimentación general
15. Toma de entrada	Conecta el equipo a la red eléctrica

12.5 Explicaciones de operación/funcionamiento

Conecte la toma de entrada (15) en la parte posterior del generador con potencia comercial (220 VCA) con una línea de alimentación especial.

6) Conecte el enchufe de entrada de señal del dispositivo de conversión de energía con el de salida de señal (11) del generador; la instalación del equipo ha terminado.

El botón (9) en la parte inferior derecha del panel frontal del generador es el botón de ajuste de potencia, que se puede usar para ajustar la potencia de salida del equipo; la potencia de salida se muestra con el medidor de potencia (1).

La perilla (8) es para el ajuste de pulso, se usa para establecer el tiempo en el que se aplica ultrasonido y el intervalo libre, el tiempo total de trabajo se ajustará con el interruptor (7). Después de configurar con (7) y (8), presione la tecla de inicio de trabajo (5) y la tecla de establecimiento de protección (6) para ingresar al estado de trabajo ultrasónico.

7) Seleccione un recipiente adecuado (tubo de ensayo, vaso o tubo de centrífuga) según sea la cantidad de muestra; fije o coloque el recipiente, ajuste la posición del dispositivo de conversión de energía de modo que el extremo de la sonda pueda insertarse en la solución entre 10 y 15 mm, y en el centro del recipiente (para evitar el contacto directo de la barra y el recipiente). El extremo

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

de la barra debe estar al menos a 30 mm del fondo del recipiente. Cuando la solución es relativamente menor, esta distancia puede ser inferior a 30 mm.

8) Gire el botón de ajuste de potencia en el sentido contrario a las agujas del reloj hasta la posición mínima, ajuste el tiempo de trabajo, el tiempo de ultrasonidos y el intervalo libre adecuados. (generalmente, el tiempo de trabajo no debe ser muy largo, y el intervalo libre debe ser más largo que el tiempo de trabajo). Después de dicha preparación, enciéndalo, el indicador se ilumina, presione el botón de reinicio de la protección una vez (6) y luego presione reiniciar el trabajo (5), la máquina ingresa al estado de trabajo después del intervalo de tiempo establecido. Después de que se haya visualizado el tiempo de trabajo, gire el botón de ajuste de potencia lentamente en el sentido de las agujas del reloj hasta la potencia necesaria para alcanzar el efecto de trabajo ideal. Una vez que haya pasado el tiempo de trabajo establecido, la ventana de visualización de la hora (3) muestra ese tiempo total. El equipo deja de vibrar. Si el usuario necesita volver a hacer el trabajo, presiona la tecla de reinicio del trabajo (5); si el usuario no desea volver a hacer el trabajo, apaga el equipo y corta la conexión de alimentación.

9) Si el indicador de protección (4) se enciende durante el tiempo de trabajo (en la tecla de restablecimiento de protección), la potencia del equipo es demasiado alta y el equipo entra en estado de protección; se debe disminuir la potencia, presionar la tecla de reinicio de la protección una vez (6) y la tecla de reinicio del trabajo (5), luego el equipo arranca nuevamente. ■

10) Cuando reemplace la sonda, ajuste el interruptor de selección de diámetro de la barra según la especificación de la sonda (10) (en la parte posterior de la carcasa del equipo); si el usuario encuentra que la máquina no puede emitir ondas ultrasónicas, gire el interruptor de selección hasta que el equipo emita ondas ultrasónicas normalmente.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

12.6 PRECAUCIONES

- 11) Está prohibido encender el equipo cuando la barra no se ha insertado en la solución, de lo contrario pueden dañarse el dispositivo de conversión de energía o el generador de ondas ultrasónicas.
- 12) El dispositivo de conversión de energía se fijará firmemente sobre el soporte para evitar que se deslice desde la columna de repente. El extremo de la barra metálica no debe tocarse para evitar deformaciones o daños.
- 13) Seleccione el mejor valor de cantidad de células, tiempo y potencia, de acuerdo con la experiencia del usuario.
- 14) Si el extremo de la barra metálica se ha corroído, limarlo o rasparlo con una piedra de afilar o un raspador para evitar un impacto negativo en los resultados del trabajo.
- 15) El valor mostrado por el medidor de potencia puede verse afectado por el voltaje, la profundidad de la barra insertada en la solución y la carga (concentración y densidad de las muestras que se van a tratar). El valor mostrado puede ser un poco menor si el voltaje es inferior a 220V, la barra está insertada demasiado en la solución o la solución es demasiado densa; a la inversa, el valor será más alto. Sin embargo, el valor mostrado es un parámetro simulado, su alteración, no afectará la potencia real de la onda ultrasónica.
- 16) El equipo no necesita precalentamiento, debe estar equipado con una buena puesta a tierra.
- 17) Al romper el material con ondas ultrasónicas, debido al efecto de la cavitación de la onda en la solución, la temperatura de la solución aumentará rápidamente; el usuario debe prestar atención a la temperatura máxima que puedan soportar las diferentes células. Sugerimos sonicar el material muchas veces en tiempos cortos (menos de 5 segundos por vez) y enfriar el material con un baño de hielo.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

- 18) El equipo se utilizará con el interruptor sin el transformador de frecuencia, y se evitará el contacto después de que se haya abierto la caja del generador para evitar impactos. El equipo es confiable y no se dañará. Contactarse con el proveedor del equipo si hubiera algún daño.
- 19) El equipo debe colocarse en un lugar seco, evitando los lugares húmedos, calientes o con gases contaminantes y corrosivos.
- 20) La experiencia muestra que sonicar repetidamente en poco tiempo es mejor que el sonicado continuo en un tiempo prolongado para evitar el calentamiento de la solución; se puede establecer un largo tiempo de intervalo entre sonicado y sonicado. Además, el trabajo continuo en tiempo prolongado puede acortar la vida útil del equipo.

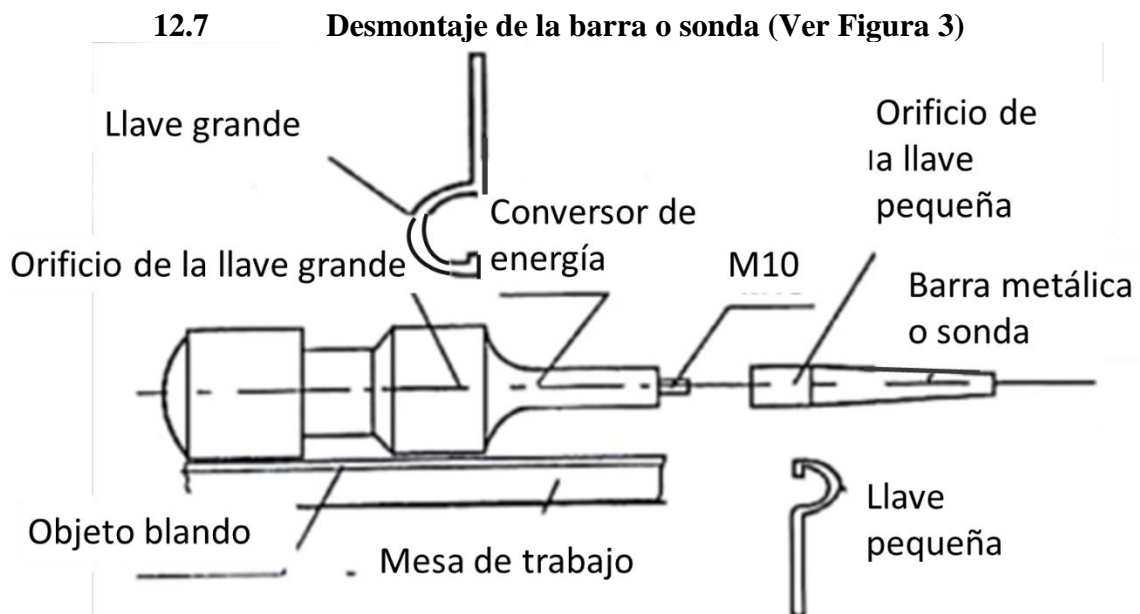


Figura 3. Desmontaje de la sonda

Coloque el dispositivo de conversión de energía en una silla sobre un objeto blando (como una toalla), coloque la llave pequeña en el orificio de la sonda y luego coloque la llave grande en el orificio del dispositivo de conversión de energía. Cuando empuje y coloque la llave pequeña y la grande, aplique las fuerzas horizontalmente.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

Tome la llave pequeña con la mano izquierda y la llave grande con la mano derecha, las dos manos actuando al mismo tiempo; girar hacia abajo, es para soltar los pernos. Al tomar la llave grande con la mano izquierda y la llave pequeña con la mano derecha, las dos manos actuando al mismo tiempo, al girar hacia abajo, se apretan los pernos.

La barra está equipada con tornillos M10, cuando el usuario reemplaza la barra, sacará el tornillo y luego colocará el tornillo en el dispositivo de conversión de energía, y apretará los tornillos. Si es difícil apretar los tornillos en la barra de cambio de amplitud, golpee la barra con tornillos contra una madera, los tornillos de esta manera pueden apretarse.

12.8 Lista de empaque

1. Conjunto de generador de ondas ultrasónicas	1
2. Sistema de vibración (máquina de cambio de energía)	1 conjunto
3. Caja a prueba de sonidos	1
4. Pinza cruzada (en la caja a prueba de sonidos)	1 conjunto
5. Abrazadera del tubo de prueba (en caja a prueba de sonido)	1 conjunto
6. Toma de cable de suministro de energía	1 pieza
7. Llave especial (para desmantelar la sonda)	1 juego
8. Fusibles	4 piezas
9. Manual de operación	1 copia
10. Certificado de calidad	1 copia
11. Documento de garantía de calidad (garantía de calidad)	1 copia

+ La compañía puede realizar la reparación, renovación e instalación de la sonda para los sonicadores ultrasónicos hechos en Norte América, Reino Unido, Japón y Alemania.

+ La compañía compra los sonicadores viejos y reemplaza equipos viejos por nuevos.

“Puesta a punto de un equipo sonicador y su implementación en la técnica de ruptura celular de distintas especies de microalgas”

12.9 Potencias y tiempos sugeridos para la sonicación de algunas microalgas.

La siguiente tabla presenta valores de potencia y tiempos sugeridos para el sonificado de especies utilizadas durante la Práctica Profesional.

Cepa/Potencia	Potencia	Tiempo
<i>Scenedesmus</i> sp	200 W	20 min
<i>Chlorella vulgaris</i>	200 W	20 min
<i>Dunaliella salina</i>	150 W	6 min
<i>Chlamydomonas. reinhardtii</i>	150 W	10 min
<i>Nostoc</i> sp	150 W	5 min