

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**OBTENCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A PARTIR DEL
RESIDUO ULTRA FINO DE *SPIRULINA PLATENSIS*, MEDIANTE
DEGRADACIÓN ANAEROBIA EN FASE HIDROLÍTICA.**

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O TÍTULO
DE: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

ELABORADO POR:

ANDREA CAROLINA LÓPEZ KAROLYS

SANGOLQUÍ, DE NOVIEMBRE DEL 2011.

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

ANDREA CAROLINA LÓPEZ KAROLYS

COORDINADOR DE LA CARRERA

ING. TATIANA PÁEZ, M.Sc.

SECRETARIO ACADÉMICO

LIC. MARIO LOZADA

Lugar y fecha: Sangolquí, de noviembre del 2011

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. ANDREA CAROLINA LÓPEZ KAROLYS como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, ... de noviembre del 2011

Ing. Rosa Albuja Yánez

DIRECTORA

Ing. Pablo Araujo Granda

CODIRECTOR

REVISADO POR

Ing. Tatiana Páez, M.Sc.

COORDINADORA DE LA CARRERA

DEDICATORIA

A Dios, porque siempre cuidó de mí y guió mi camino.

*A mis padres, porque son los pilares de mi vida y gracias a su apoyo y esfuerzo
alcance este objetivo.*

A mis hermanos, por su ayuda y apoyo incondicional.

A mi familia, por vivir conmigo cada etapa de mi vida y ser mi soporte.

A mis amigos, gracias por las risas, los buenos momentos y el apoyo.

A mi BFF, por sus sabios consejos y apoyo en los momentos más críticos.

*A mis enemigos, que me mostraron que el camino al éxito no es fácil y que hay
que luchar para alcanzarlo.*

Andrea Carolina López Karolys

AGRADECIMIENTOS

A la Empresa Andesspirulina, por el financiamiento y asesoría técnica del presente Proyecto, también por la colaboración por parte de todo el personal y todos los conocimientos que gracias a ustedes puede obtener.

A mi Directora de Proyecto, Rosa Albuja, por la asesoría y la dedicación que puso a mi proyecto, gracias a usted adquirí herramientas útiles para mi futuro profesional.

A mi Codirector, Pablo Araujo, por los conocimientos impartidos y por el apoyo que mostró para que el Proyecto salga adelante.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera con la realización del proyecto para que este tuviera éxito.

Andrea Carolina López Karolys

INDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
LISTADO DE TABLAS.....	x
LISTADO DE CUADROS.....	xii
LISTADO DE FIGURAS.....	xiii
LISTADO DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	4
1.3 Objetivos de la investigación.....	6
1.3.1 Objetivo General.....	6
1.3.2 Objetivos Específicos.....	6
1.4 Marco Teórico.....	7
1.4.1 La <i>Spirulina platensis</i>	7
1.4.1.1 Estructura de la <i>Spirulina platensis</i>	8
1.4.1.2 Composición química de la <i>Spirulina platensis</i>	10
1.4.1.2.1 Lípidos.....	10
1.4.1.2.2 Pigmentos clorofílicos.....	10
1.4.1.2.3 Hidrocarburos y ésteres.....	11
1.4.1.2.4 Vitaminas.....	11
1.4.1.2.5 Minerales.....	11
1.4.1.2.6 Carbohidratos.....	12
1.4.1.2.7 Proteínas.....	13
1.4.1.2.8 Ficobiliproteínas.....	14
1.4.2 Cultivos masivos de <i>Spirulina platensis</i>	16

1.4.3	Utilidades de la <i>Spirulina platensis</i>	17
1.4.3.1	Biofertilizante a base de aminoácidos.....	17
1.4.4	Los fertilizantes químicos.....	21
1.4.5	La digestión anaerobia.....	22
1.4.5.1	La etapa hidrolítica de macromoléculas en la digestión anaerobia...24	
1.4.6	Sistemas mezclados.....	27
1.4.6.1	Mecanismos de mezcla.....	29
1.4.7	Sistemas de calentamiento.....	29
1.4.8	La estabilización química con cal.....	30
2	CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.1	Participantes.....	32
2.2	Zona de estudio.....	32
2.3	Periodo de tiempo de investigación.....	34
2.4	Procedimiento.....	34
2.4.1	Ensayos preliminares.....	35
2.4.1.1	Preparación de inóculos.....	35
2.4.1.1.1	Inóculo de estiércol de vaca.....	35
2.4.1.1.2	Inóculo de bacterias ácido lácticas.....	35
2.4.1.1.3	Inóculo de agua residual.....	36
2.4.1.2	Concentración de spirulina.....	36
2.4.1.3	Adaptaciones para agitación y calentamiento continuo.....	37
2.4.1.4	Medición de pH.....	38
2.4.1.5	Análisis de laboratorio.....	38
2.4.2	Diseño del biorreactor piloto.....	38
2.4.2.1	Diseño del rodete.....	39
2.4.2.2	Sistema de agitación.....	42
2.4.2.3	Mecanismo reductor de velocidad.....	43
2.4.2.4	Sistema de calentamiento considerado.....	46
2.4.2.5	Conexiones.....	47
2.4.3	Construcción del biorreactor piloto.....	48
2.4.3.1	Tanque del biorreactor.....	49
2.4.3.2	Sistema de calentamiento.....	49
2.4.3.3	Sistema de agitación.....	49

2.4.3.4	Rodete.....	49
2.4.3.5	Placas deflectoras.....	50
2.4.3.6	Conexiones eléctricas.....	50
2.4.4	Implementación y control de parámetros de funcionamiento.....	50
2.4.4.1	Pruebas de funcionamiento	50
2.4.4.2	Carga inicial.....	51
2.4.4.3	Operación y monitoreo.....	51
2.4.5	Estabilización con cal.....	52
2.4.6	Análisis de datos.....	53
2.4.7	Dimensionamiento del biorreactor escala industrial.....	53
2.4.7.1	Dimensionamiento del tanque.....	54
2.4.7.2	Sistema de agitación.....	54
2.4.7.3	Sistema de calentamiento.....	55
2.4.7.4	Tuberías consideradas.....	55
2.4.7.5	Conexiones y automatización.....	56
2.4.7.6	Estructura metálica de soporte.....	56
3	CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
3.1	Resultados de los ensayos preliminares.....	57
3.1.1	Primer ensayo.....	57
3.1.2	Segundo ensayo.....	57
3.1.3	Tercer ensayo.....	59
3.1.4	Cuarto ensayo.....	60
3.1.5	Quinto ensayo.....	61
3.1.6	Sexto ensayo.....	62
3.1.7	Séptimo ensayo.....	62
3.1.8	Resultados de análisis de laboratorio.....	65
3.2	Diseño del biorreactor piloto.....	66
3.2.1	Tanque del biorreactor.....	67
3.2.2	Sistema de agitación.....	67
3.2.3	Sistema de calentamiento.....	67
3.2.4	Conexiones.....	68
3.3	Construcción del biorreactor piloto.....	68
3.4	Puesta en marcha del biorreactor.....	71

3.5 Costos.....	71
3.6 Resultados de análisis de laboratorio.....	72
3.7 Estabilización con cal.....	74
3.7.1 Resultados de análisis de laboratorio	75
3.8 Dimensionamiento del biorreactor a escala industrial.....	76
3.8.1 Dimensionamiento del tanque.....	77
3.8.1.1 Tapa superior abisagrada.....	79
3.8.2 Sistema de agitación.....	79
3.8.2.1 Dimensionamiento del rodete.....	80
3.8.2.2 Placas deflectoras.....	81
3.8.3 Sistema de calentamiento.....	82
3.8.3.1 Cálculo del calor perdido.....	85
3.8.4 Tuberías.....	89
3.8.5 Conexiones.....	89
3.8.6 Resumen de parámetros.....	90
3.8.7 Costos.....	91
3.8.7.1 Costos de construcción.....	91
3.8.7.2 Costos de producción.....	92
3.8.7.3 Mano de obra.....	94
3.8.8 Estabilización del producto.....	97
4 CAPITULO 4: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	98
4.1 Conclusiones.....	98
4.2 Recomendaciones.....	102
5 CAPITULO 5: BIBLIOGRAFIA.....	103

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Parámetros de diseño para definir el tipo de rodete en el biorreactor.....	41
Tabla 2.2. Características del motor disponible para el uso en el biorreactor piloto.....	43
Tabla 3.1. Datos obtenidos del segundo ensayo con rango de temperatura 25 – 38°C.....	58
Tabla 3.2. Datos recolectados correspondientes al tercer ensayo con un rango de temperatura de 35 a 37°C.....	60
Tabla 3.3. Datos recolectados del cuarto ensayo, con rango de temperatura de 38 a 39°C.....	60
Tabla 3.4. Datos recolectados del quinto ensayo con temperatura de 39 a 40°C.....	61
Tabla 3.5. Datos recolectados del sexto ensayo, temperatura entre 40 y 41°C.....	62
Tabla 3.6. Datos recolectados del séptimo ensayo, utilizando únicamente agua residual como inóculo.....	63
Tabla 3.7. Identificación y concentración de aminoácidos en la muestra analizada por el INIAP.....	65
Tabla 3.8. Concentración de aminoácidos en el producto comercial ALGAFERT.....	65
Tabla 3.9. Parámetros considerados para la puesta en marcha del biorreactor.....	71
Tabla 3.10. Lista de materiales adquiridos para la construcción del biorreactor piloto.....	71
Tabla 3.11. En la tabla se muestran los materiales con los que contaba la planta Andesspirulina, y que fueron usados en la construcción del biorreactor.....	72
Tabla 3.12. Parámetros considerados para la construcción del biorreactor a nivel industrial.....	90

Tabla 3.13. Materiales que están disponibles en la planta Andesspirulina y que pueden ser usados en la construcción del biorreactor.....	91
Tabla 3.14. Materiales que deben ser adquiridos, con sus costos aproximados en el mercado ecuatoriano.....	91
Tabla 3.15. Detalle de los rubros implicados en la producción del biofertilizante, con un funcionamiento del biorreactor de 24 horas durante 8 días.....	94
Tabla 3.16. Tabla de cotos de mano de obra para la operación del biorreactor durante 8 días.....	95

LISTADO DE CUADROS.

Cuadro 1.1. Contenido de minerales y nutrientes de la <i>Spirulina platensis</i> , expresados en mg por kg de spirulina.....	12
Cuadro 1.2. Contenido de aminoácidos esenciales y no esenciales en la <i>Spirulina platensis</i>	13

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura en forma de hélice de la <i>Spirulina platensis</i> , A) es en vista de microscópica 10X y B) Vista de microscópica 40X.....	8
Figura 1.2. Modelo de la estructura de un ficobilisoma. 1) Pigmento terminal, 2) Ficoeritrina, 3) Ficocianina, 4) Aloficocianina, 5) PSI y 6) PSII.....	15
Figura 1.3. Fases de la digestión anaerobia, desde polímeros complejos hasta los productos finales: Metano y CO ₂	23
Figura 2.1. Ubicación de la planta Andesspirulina.....	33
Figura 2.2. Ubicación Satelital de la empresa Andesspirulina.....	33
Figura 2.3. Ubicación del punto de toma de aguas residuales, en la planta Andesspirulina.....	36
Figura 2.4. Adaptaciones realizadas para los ensayos preliminares, para suplantar el uso de una incubadora con agitación.....	37
Figura 2.5. Dispositivo LabQuest de Vernier, para la medición de pH y Temperatura.....	38
Figura 2.6. Simulación del flujo dado por la hélice marina y placas deflectoras colocadas perpendicularmente a la pared del tanque.....	42
Figura 2.7. Sistema de poleas, mecanismo reductor de velocidad, en la figura a) eje motriz, b) Polea motriz, c) Correa, d) Eje conducido, e) Polea conducida.....	44
Figura 2.8. Sistema de transmisión compuesto que consta de 4 poleas o ruedas para la reducción de la velocidad de un motor.....	44
Figura 2.9. En la figura el 1) corresponde al eje motriz y su polea de 28mm, 2) el primer sistema de poleas con un diámetro de 171.2 mm y 49 mm, 3) segundo sistema de poleas con 113.47 mm de diámetro.....	46
Figura 2.10. Diseño del sistema de calentamiento, con la resistencia tipo alambre enrollada alrededor del tanque para la distribución del calor.....	47
Figura 2.11. Prueba de funcionamiento de la hélice y verificación de flujo y de fuga.....	51

Figura 3.1. En las fotografías, A y B, corresponden a la <i>Spirulina platensis</i> disuelta en agua al inicio de los ensayos preliminares. C y D, corresponden a <i>Spirulina</i> degradada con pérdida de color y estructura. El inóculo utilizado fue agua residual. Vista de microscopio (40x).....	59
Figura 3.2. Degradación de <i>Spirulina platensis</i> , mediante inóculo de agua residual, fotografía correspondiente al 7 día de ensayo. Vista microscópica de 40X.....	63
Figura 3.3. Variación del tiempo de hidrólisis según el rango de temperatura en los ensayos preliminares, datos presentados a partir del segundo ensayo.....	64
Figura 3.4. Enrollado de la resistencia tipo alambre, cubierta por espagueti de fibra de vidrio, alrededor del tanque del biorreactor piloto.....	68
Figura 3.5. Montaje de la estructura metálica, para el soporte del motor y del mecanismo moto reductor de velocidad mediante poleas.....	69
Figura 3.6. En la imagen A) se muestra el ensamblaje del sistema de poleas como mecanismo moto reductor de velocidad, B) ensamblaje del sistema de poleas en la estructura metálica, que servirá también para el soporte del motor de ½ Hp.....	69
Figura 3.7. Ensamblaje de las cuatro placas deflectoras, todas ubicadas en posición perpendicular a la pared del tanque.....	70
Figura 3.8. En la imagen A) se muestra el ensamblaje del tablero de control, que en su interior contiene al contactor y al relé de sobrecarga térmico, en B) se muestra el biorreactor piloto terminado.....	70
Figura 3. 9. En A) se muestra la adición de cal al biofertilizante para su estabilización, en B) se muestra la toma del valor del pH para comprobar que este haya ascendido a 12 y asegurar la eliminación de los microorganismos.....	75
Figura 3.10. En la figura desde el interior al exterior: A) corresponde a la mezcla de <i>spirulina</i> disuelta en agua, B) se refiere a la capa del tanque, de acero inoxidable, C) capa del aislante térmico, lana de vidrio, D) aire exterior, ambiente. En la figura se muestra la pérdida de calor desde el interior del tanque al ambiente.....	86
Figura 3.11. Vista isométrica del biorreactor a escala industrial, planos realizados en el programa SolidWorks.....	96

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A. Diseño del biorreactor piloto en el programa Visimix turbulen SV 2K7.....	108
ANEXO B. Circuito de control de sistema de conexiones para el funcionamiento del biorreactor.....	111
ANEXO C. Planos en SolidWorks del biorreactor piloto.....	113
ANEXO D. Diseño del biorreactor industrial en el programa Visimix turbulent SV 2K7.....	114
ANEXO E. Planos en SolidWorks del biorreactor industrial.....	117
ANEXO F. Glosario de términos.....	118
ANEXO G. Informe de resultados de análisis de laboratorio proporcionado por el INIAP.....	120
ANEXO H. Ficha técnica del producto comercial ALGAFERT.....	121

RESUMEN

La necesidad de nuevas alternativas de fertilización para los cultivos, se ha convertido en una de los motivos para el desarrollo de productos, que sean amigables con el medio ambiente. Los fertilizantes agroquímicos están siendo reemplazados por sustancias de origen natural, que mitigan los efectos nocivos de la fertilización química. Los biofertilizantes a base de aminoácidos constituyen una importante fuente de elementos indispensables para el desarrollo de las plantas, y facilitan la asimilación de estos en los tejidos vegetales. La obtención de un biofertilizante a base de aminoácidos provenientes de la hidrólisis de la proteína que posee la *Spirulina platensis*, fue el objetivo principal de este proyecto. Se empleó una digestión anaerobia en fase hidrolítica, probando diferentes tipos de inóculos como el estiércol de vaca, aguas residuales y cultivos ácido lácticos, con diferentes concentraciones de spirulina para obtener la mejor relación inóculo/sustrato. Se diseñó y construyó un biorreactor a escala piloto como base para el dimensionamiento de un biorreactor a escala industrial. Con una concentración de 60 g/l de spirulina, al cabo de 8 días y gracias a la acción de las enzimas provenientes del metabolismo bacteriano, se obtuvo un producto con una concentración de aminoácidos libres de 3,23 g/l, lo que fue confirmado con análisis de laboratorio. Se comprobó el funcionamiento de un nuevo método, que implica la reducción de costos a diferencia de métodos que incluyen el uso de enzimas aisladas o hidrolización con ácido concentrado, para la elaboración del producto con contenido de aminoácidos libres.

ABSTRACT

The requirement of new alternatives for fertilizer cultivations has become one of the reasons for development of products that are friendly with the environment. Agrochemical fertilizers are being replaced with natural substances, which mitigate the harmful effects of chemical fertilization. The amino acid-based bio-fertilizers are an important source of essential elements for plant growth, and facilitate the absorption of these in plant tissues. Obtaining a biofertilizer based on amino acids from the hydrolysis of the *Spirulina platensis* protein, was the main objective of this project. We used a hydrolytic phase anaerobic digestion, trying different types of inoculums as cow dung, water waste and lactic acid bacteria's with different concentrations of spirulina to get the best seed / substrate relation. Was designed and built a pilot scale bioreactor as a basis for the design of an industrial scale bioreactor. With a 60 g/l spirulina concentration, after 8 days and by the action of enzymes from bacterial metabolism, we obtained a product with a free amino acid concentration of 3.23 g/l, which was confirmed with laboratory analysis. We found a new method, which involves the reduction of costs a difference to methods that include the use of isolated enzymes or hydrolysis with concentrated acid for the manufacture of the product containing free amino acids.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCION

1.1. Formulación del problema

La *Spirulina platensis* es una cianobacteria o microalga, que apareció en la tierra hace más de tres mil quinientos millones de años. Contiene más de cien nutrientes que la convierte en la fuente más completa de nutrición orgánica.

La *Spirulina platensis* es un microorganismo con un alto contenido en micro y macronutrientes, además de un alto porcentaje de proteína que varía entre el 60 y 70%, con todos los aminoácidos esenciales y no esenciales. Posee una abundante cantidad de minerales como: potasio, calcio, zinc, magnesio, manganeso, selenio, hierro y fósforo (Ulianova, 2002).

La *Spirulina platensis* posee vitaminas como la B6, biotina, ácido pantoténico, ácido fólico, inositol, niacina, riboflavina, tiamina, y tocoferol (Ulianova, 2002).

La empresa Andesspirulina se dedica a la producción y comercialización de polvo de spirulina inocuo, para el consumo, principalmente en la alimentación humana.

El proceso de producción del polvo de spirulina consta de tres fases. En la primera se realiza una filtración que elimina el agua del cultivo para obtener una biomasa con una humedad del 75 %. En la segunda fase, la biomasa pasa a ser licuada para reducir el tamaño de la microalga y facilitar el secado de la misma (POE 01. 05. Andesspirulina, 2010).

La tercera fase del proceso, consta de secado por atomización de la spirulina. La biomasa proveniente del licuado, pasa a una torre de atomización donde se fragmenta en gotas diminutas. Se continúa con el secado de dichas gotas hasta convertirlas en polvo empleando aire caliente dentro de una cámara de secado. Posteriormente se descarga la spirulina deshidratada en un ciclón para acabar de formar el producto seco con un porcentaje de humedad menor al 7% (POE 01.05. Andesspirulina 2010).

Producto del proceso de secado de la spirulina, obtenemos un residuo ultra fino que no cumple con las características físicas necesarias para ser vendido como producto de consumo humano, por esta razón se lo almacena e incluso es desperdiciado.

Uno de los principales problemas en las industrias es el desperdicio de materia prima y/o de producto. Lo que ocasiona pérdidas económicas y un desfase en el balance de producción-venta.

Según Guañua, (2010) el hombre empezó a cultivar las tierras desde hace miles de años. La historia de la fertilización comenzó cuando los primeros agricultores descubrieron que determinados suelos dejaban de producir correctamente si eran cultivados continuamente. Y descubrieron a la par de esto, que el añadir estiércol o residuos vegetales ayuda a restaurar la fertilidad del suelo.

Con el incremento de la población mundial en los últimos años, existen nuevos retos a la agricultura para proporcionar un mayor número de alimentos, desde el inicio del siglo XIX la población se ha incrementado en un 550% (Hoy.com, 2006). Para poder incrementar la producción agrícola y abastecer al crecimiento de la población, existen solo dos posibilidades: Aumentar las superficies de cultivo, que ya son limitadas. Y proporcionar a los suelos, minerales adicionales en formas asimilables por las plantas para incrementar el rendimiento de los cultivos (Guañuana, 2010).

En cuanto a los fertilizantes químicos, estos no fomentan la salud del suelo, sino que debilitan su estructura y afectan a los componentes naturales del mismo. Las plantas que se desarrollan en suelos altamente afectados por químicos no cuentan con una resistencia natural a las enfermedades. Hay que destacar que los fertilizantes químicos también ocasionan la muerte de importantes organismos como lombrices de tierra, que ayudan en la oxigenación del suelo, proceso relacionado directamente con la liberación de minerales y micronutrientes (Revista Masdatos.com, 2004).

La muerte de organismos presentes en el suelo, es solo una de las causas, por las cuales los fertilizantes químicos únicamente contribuyen al debilitamiento de los suelos y a la dependencia de estas sustancias por parte de las plantas, ya que sin ellos las plantas pierden la capacidad de absorber importantes sustancias de la tierra.

El uso repetido de los fertilizantes químicos, acaba con la población bacteriana necesaria para mantener buenas características en el suelo, esto produce que las plantas, al no poder tomar los nutrientes que son escasos ya en la tierra, se vuelvan dependientes de químicos para su desarrollo (Masdatos.com, 2004).

En el año 2003, con nuevas tecnologías de cultivo y una gama de extractos de macroalgas y microalgas marinas, se desarrolló un producto ecológico que puede sustituir a los fertilizantes y pesticidas. El producto se llama Algacan y es el resultado de la investigación del Centro de Algología Aplicada de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria (Menéndez, 2004).

El extracto de algas rico en aminoácidos se lo obtiene por reacciones hidrolíticas empleando enzimas o ácido clorhídrico en altas concentraciones y en elevadas temperaturas. Estos dos métodos resultan ser costosos lo que influencia directamente en el costo del producto final.

En la producción de fertilizantes, se presentan obstáculos que están relacionados con el precio del producto final, debido a que la materia prima

necesaria para elaborar estos productos puede tener altos costos, y presentar mayormente problemas de logística, en la importación de ciertos componentes que deben ser introducidos al país bajo ciertas normas y disposiciones.

1.2. Justificación del problema

La FAO en el año de 1981, documentó la posibilidad de que las algas verde-azules remplazaran a los fertilizantes químicos y reconstituyan la estructura de los suelos debilitados (FAO, 1981).

Los fertilizantes a base de spirulina tienen más bajos costos y son preferidos sobre los fertilizantes orgánicos (Zeenat, 1990).

Según Sosa, (2002) los biofertilizantes orgánicos a base de aminoácidos, sin duda alguna, poseen una gran ventaja sobre la utilización de la fertilización química. Estos tienen una influencia específica como biocatalizador en los procesos enzimáticos y nutricionales sobre los cultivos.

Se ha demostrado la efectividad de los biofertilizantes a base de spirulina, debido a que presentan un alto porcentaje de aminoácidos libres, y otros macro y micro nutrientes los cuales están en bajas concentraciones en un suelo en condiciones normales y por lo tanto incrementa la fertilidad del mismo. (FAO, 1981).

En la actualidad, para la elaboración de biofertilizantes, a partir de cianobacterias, se emplean enzimas, que a elevadas temperaturas, dan como resultado la transformación de proteínas en aminoácidos libres, listos para ser usados sobre los cultivos (Richmond, 2004). Sin embargo este método, aunque eficiente, resulta costoso, debido al precio de las enzimas y la dificultad que se presenta el momento de importarlas.

La digestión anaerobia es uno de los procesos más antiguos empleados principalmente en el tratamiento de aguas residuales, y tiene importantes

beneficios como: la utilización de altas cargas orgánicas, alta destrucción de patógenos y producción de metano como fuente de energía (Bastone, et. al, 2002). La fase hidrolítica de esta digestión, es importante debido al desdoblamiento de moléculas complejas en moléculas más sencillas, por ejemplo la hidrólisis de proteínas en aminoácidos libres (Retamal, et. al, 2004).

En la fase hidrolítica de la digestión anaerobia, el desdoblamiento de proteínas, lípidos e hidratos de carbono es realizada a través de enzimas sintetizadas por microorganismos (Retamal, et. al, 2004).

Los mecanismos empleados para esto son: 1) enzimas secretadas por microorganismos al medio líquido y adsorción al sustrato para liberar un sustrato soluble (Jain, et. al, 1992). y 2) los microorganismos tienen la capacidad de adherirse al sustrato, y secretar enzimas en las proximidades del mismo, y a la vez se benefician de los sustratos disueltos liberados. (Retamal, et. al, 2004).

Lo más importante en la elaboración de un producto es la reducción de costos, al emplear consorcios bacterianos para una etapa hidrolítica en una digestión anaerobia, evitamos el uso directo de enzimas aisladas y minimizamos el costo que implica el uso de las mismas.

Los biofertilizantes, al ser estos de origen natural, mejorarán la resistencia de las plantas y su calidad sin provocarles efectos secundarios (CASAFE, 2005). La *Spirulina platensis* posee una alta concentración de aminoácidos, fitohormonas, oligoelementos, antioxidantes y polisacáricos, por esta razón puede constituir un excelente complemento biológico. Un biofertilizante hecho a base de *Spirulina platensis*, debido al contenido de aminoácidos libres, actuará sobre las células en el crecimiento de las plantas, sobre el tejido radicular secundario, sobre la multiplicación de nuevos brotes, flores y para la obtención de frutos con mayor consistencia y uniformidad (Gómez, 2009).

El costo de un biofertilizante es diez veces menor al de un agroquímico, además de que su aplicación también es menos costosa. Ya que la base de la producción de estos, son medios biológicos que tampoco son agresivos con el medio ambiente. Por esta razón el biofertilizante representa menores gastos de producción. Desde la perspectiva conservacionista, la fabricación de los fertilizantes químicos consumen grandes cantidades de energía, y debemos mencionar que la eficiencia de los mismos es limitada (Iglesias, 2010).

Uno de los problemas de los fertilizantes químicos, en su aplicación a los cultivos, es que los componentes de los mismos pueden perderse por lixiviación o drenaje del suelo, ocasionando contaminación de acuíferos, ríos y océanos, o estos pueden volatilizarse hacia la atmósfera. Por el contrario, la producción de biofertilizante implica menos recursos y menos efectos sobre el medio ambiente (Morte, et. al, 2004).

El darle una utilidad al residuo ultra fino producido en la empresa Andesspirulina, resultado de la producción masiva de *Spirulina plantesis*, puede traer consigo ventajas no solo económicas sino también ambientales para aquellos que usarían este producto como un medio de fertilización alternativa.

1.3. Objetivos de la Investigación.

1.3.1. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO.

- Obtener un biofertilizante a partir del residuo ultra fino de *Spirulina platensis*.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Emplear la digestión anaerobia en fase hidrolítica para la transformación de las proteínas de la *Spirulina platensis* en aminoácidos libres.
- Realizar pruebas con diferentes consorcios bacterianos, y establecer con cuál de estos se obtiene una mejor degradación de proteínas.

- Controlar parámetros de operación durante los ensayos preliminares.
- Diseñar y construir un biorreactor piloto, para la obtención del biofertilizante.
- Dimensionar el biorreactor a escala industrial para la producción del biofertilizante en la empresa Andesspirulina.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. La *Spirulina platensis*

Según Vonshak (1996), la *Spirulina platensis* es una cianobacteria planctónica que forma poblaciones masivas en cuerpos de agua tropicales y subtropicales caracterizados por altos niveles de carbonato y bicarbonato y alto pH. A pesar de la gran simplicidad de la misma, esta cianobacteria es capaz de sintetizar sustancias nutritivas que son almacenadas en su citoplasma (Gershwin & Belay, 2008).

Las cianobacterias poseen una fisiología versátil y una amplia tolerancia ecológica. Por lo general se encuentran en la mayoría de hábitats naturales y son especies cosmopolitas con una amplia distribución (Betancourt, 1997).

Las cianobacterias se encuentran como componentes del plancton, en lagos y océanos tropicales y templados. Existen especies adaptadas a hábitats terrestres en suelos tropicales y terrenos inundados (Betancourt, 1997).

La spirulina también es considerada una microalga, de color verde-azul, que realiza procesos fotosintéticos y es de estructura multicelular filamentosa con forma helicoidal. Las dos especies más importantes son la *Spirulina maxima* y *Spirulina platensis* (Sánchez, et. al, 2007).

La spirulina crece en agua, puede ser cosechada y procesada debido a su alto contenido en macro y micronutrientes. Las personas que viven cerca de

lagos alcalinos en donde es naturalmente encontrada la spirulina, han usado esta como suplemento alimenticio (Ahsan, et. al, 2008).

Un ejemplo de esto, la población cercana al Lago Chad en la región de Kanem, con altos índices de mala nutrición, usa la spirulina en un alimento denominado dihé. Este fue re descubierto por una misión científica Europea y fue popularizado alrededor de todo el mundo. En países como África es usado por su alto contenido en proteínas y al ser de fácil recolección, es secado y es consumido. (Ahsan, et. al, 2008).

1.4.1.1. Estructura de la *Spirulina platensis*

En cuanto a su morfología, la *Spirulina platensis*, es de estructura filamentososa, compuesta por tricomas cilíndricos multicelulares, que se ordenan en forma de una hélice abierta, como se puede observar en la figura 1.1, a lo largo de su longitud (Vonshak, 1996). Los factores ambientales, como la temperatura y condiciones físicas y químicas, afectan la geometría de la hélice (Carr & Whitton, 1982).

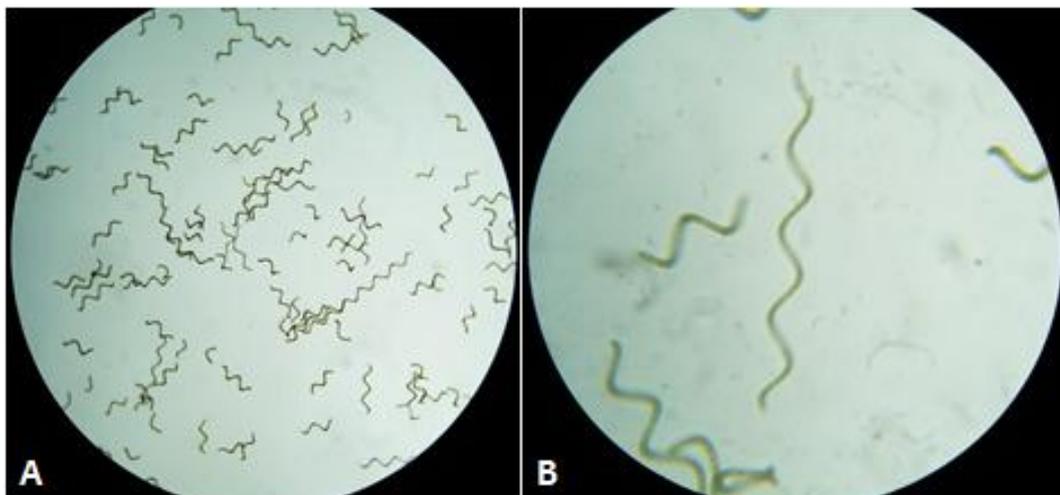


Figura 1.1. Estructura en forma de hélice de la *Spirulina platensis*, A) es en vista de microscópica 10X y B) Vista de microscópica 40X (López, 2011).

Posee una cápsula de estructura fibrilar y esta cubre cada filamento de la spirulina, protegiéndolo. Los tricomas varían entre 6 y 12 μm , y están compuestos por células cilíndricas. El diámetro de la hélice varía entre 30 y 70 μm (Sánchez, et. al, 2007).

En este microorganismo la clorofila (a), carotenos y ficobilisomas, que contienen la ficocianina, se localizan en el sistema tilacoidal. La spirulina posee varias inclusiones periféricas asociadas al sistema tilacoidal, estos son: gránulos de cianoficina, cuerpos poliédricos, gránulos de poliglucanos, gránulos lipídicos y gránulos de polifosfatos (Sánchez, et. al, 2007).

Los gránulos de cianoficina, o gránulos de reserva, son importantes para la naturaleza química de la spirulina y para el grupo de pigmentos que esta posee. Los cuerpos polyhedrales o carboxisomas contienen la enzima ribulosa 1,5-difosfato, que ayuda a la fijación de CO_2 en los organismos fotosintéticos (Ciferri, 1983).

Según Vincenzini (1980), los gránulos de poliglucanos, o gránulos de glucógeno, son polímeros de glucosa que son fácilmente difundidos en el espacio inter tilacoidal.

Los gránulos lipídicos son depósitos de reserva, constituidos principalmente por poly- β -hidrobutirato. El PHB funciona como una reserva de carbono y de energía.

1.4.1.2. Composición química de la *Spirulina platensis*

La spirulina ha sido analizada químicamente, y ha demostrado ser una excelente fuente de proteínas, vitaminas y minerales. Entre los principales componentes químicos tenemos a:

1.4.1.2.1. Lípidos

La spirulina contiene de 6-13% de lípidos, y la mitad de estos son ácidos grasos. Los que se encuentran en mayor porcentaje son: Monogalactosildiacilglicerol (MGDG), sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) y fosfatidilglicerol (PG). Cada uno se encuentra en un porcentaje entre 20 y 25 %. Otros lípidos en forma de pigmentos no contienen ácidos grasos (Vonshak, 1996).

En la spirulina también se encuentra el ácido linoleico (GLA), conocido principalmente por sus propiedades medicinales (Castillo, et. al, 2007). Los sulfolípidos provenientes de las cianobacterias, han demostrado ser efectivos contra los virus del HIV (Vonshak, 1996).

1.4.1.2.2. Pigmentos clorofílicos

La composición de pigmentos de la spirulina, es la misma de cualquier cianobacteria.

El único pigmento clorofílico presente es la clorofila a, en un porcentaje de entre 0.8 y 1.5 del peso seco (Paoletti, 1980). Otro carotenoide que se encuentra en proporciones considerables, es la mixoxantofila en un 37% (Vonshak, 1996).

1.4.1.2.3. Hidrocarburos y esteroides

El hidrocarburo encontrado en mayor cantidad en la *Spirulina platensis* es el n-C-17, en un 64-84 % de total de los hidrocarburos en las diferentes cadenas. Además nueve esteroides han sido identificados el principal de estos es el clionasterol en un 33-51 % (Vonshak, 1996).

1.4.1.2.4. Vitaminas

La spirulina presenta altos niveles de provitamina A, además posee altas concentraciones de vitamina B12, por esta razón, esta cianobacteria puede ser un excelente suplemento en el tratamiento de la anemia (Belay, 1997).

1.4.1.2.5. Minerales

El hierro en algunos suplementos nutricionales no es absorbido correctamente, en la spirulina el hierro es un 60% mejor absorbido que el sulfato de hierro y otros suplementos. Por esta razón representa una excelente fuente de hierro con propiedades alimenticias y medicinales (Pyufoulhoux, et. al, 2001).

En la spirulina también se presentan un gran número de minerales, que contribuyen a los beneficios nutricionales de esta cianobacteria, en el cuadro 1.1 se muestra la lista y el contenido presente en *Spirulina platensis*.

Cuadro 1.1. Contenido de minerales y nutrientes de la *Spirulina platensis*, expresados en mg por Kg de spirulina.

Minerales	Contenido mg/Kg.
Calcio	4700
Magnesio	4383
Potasio	10243
Hierro	807
Fósforo	8400
Sodio	6540
Zinc	33
Cobre	12
Manganeso	40
Cromo	25
Selenio	1,3
Germanio	6
Litio	0,4
Molibdeno	
Boro	

Fuente: Andesspirulina, 2008.

1.4.1.2.6. Carbohidratos

Los polímeros de glucosa se encuentran en una cantidad del 15 al 20 % de peso seco de la spirulina (Ciferri, 1983). Según Vonshak (1996), el azúcar más abundante es la glucosa en una cantidad del 7 al 8 %. Además encontramos otros carbohidratos como el polihidroxitirato, que es un polímero fácilmente encontrado en un gran número de bacterias fotosintéticas, además de servir como una reserva de carbono en procariontas.

Polisacáridos como la glucosa, galactosa y xilosa, son carbohidratos que forman parte también de la *Spirulina platensis*. Los liposacáridos se encuentran en una cantidad del 1.5 % del peso seco (Sánchez, et. al, 2007).

1.4.1.2.7. Proteínas

Las dos principales especies de spirulina, *Spirulina platensis* y *Spirulina maxima* poseen altas concentraciones de proteínas, entre un 60 y 70% de su peso seco (Sánchez, et. al, 2007).

La *Spirulina platensis* contiene 16 aminoácidos, ocho de los cuales son esenciales. Los aminoácidos que se encuentran en mayor cantidad son: el ácido glutámico en un 17.4%, el ácido aspártico en un 12.2%, la leucina en un 10.9 %, la valina en un 7.5% y la isoleucina 6.8%, como se puede ver en el cuadro 1.2. La spirulina puede almacenar aminoácidos a bajas temperaturas, cuando el crecimiento es bajo y la demanda de aminoácidos se reduce (Vonshak, 1996).

Según Chronakis (2001). Las regiones de interacción hidrofóbica en altas temperaturas y los puentes de hidrógeno en bajas temperaturas son factores de agregación y solidificación de las proteínas de la spirulina.

Cuadro 1.2 Contenido de aminoácidos esenciales y no esenciales en la *Spirulina platensis*

Aminoácidos esenciales	Contenido g/Kg.
Isoleucina	33,8
Leucina	50,1
Lisina	27,5
Metionina	13,7
Fenilalanina	27
Treonina	30
Triptófano	8,8
Valina	38,7
Aminoácidos no-esenciales	
Alanina	46,7
Arginina	45
Ácido aspártico	66,9
Cistina	58
Ácido glutámico	87,7
Glicina	31,9
Histidina	12,5
Prolina	25,9
Serina	29
Tirosina	26,9

Fuente: Andesspirulina, 2008

1.4.1.2.8. Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas son los pigmentos fotosintéticos más importantes en las cianobacterias. Pueden ser aislados fácilmente como complejos pigmento-proteína, además son muy solubles en agua e intensamente fluorescentes (Glazer, 1981).

Las ficobiliproteínas, se dividen en tres grupos:

- Las ficoeritrinas (FE). De color rojo o naranja fosforescente.
- Las ficocianinas (FC). De color azul.
- Las aloficocianinas (AFC). De color púrpura.

Las ficocianinas son las que predominan en las cianobacterias o algas verde-azules.

Según Gantt (1981), las ficobiliproteínas constan de un núcleo denominado apoproteína, a esta estructura se encuentran adheridos los cromatóforos, como se puede observar en la figura 1.2. De los tipos de cromatóforos y la forma en que ambos se enlazan dependerá el color y las características de absorción de la ficobiliproteína.

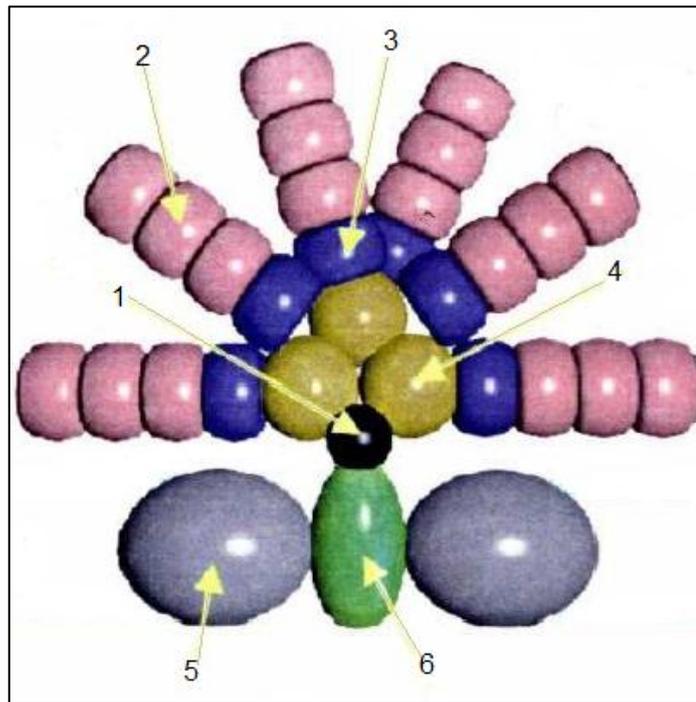


Figura 1.2. Modelo de la estructura de un ficobilisoma. 1) pigmento terminal, 2) Ficoeritrina, 3) Ficocianina, 4) Aloficocianina, 5) PSI y 6) PSII.

Existen cuatro tipos de cromatóforos, o también denominadas ficobilinas, en el grupo de las ficobiliproteínas. Los dos más comúnmente encontrados en las ficoeritrinas, en las ficocianinas y en las aloficocianinas son los isómeros: Ficoeritrobilina y ficocianobilina (Betancourt, 1997).

Las ficobiliproteínas constituyen los pigmentos fotosintéticos más importantes en las cianobacterias, ya que funcionan como una fuente de reserva de nitrógeno celular (Grossman et. al, 1986).

Cuando hay condiciones de limitación de nitrógeno en la células, las ficobiliproteínas pueden ser degradadas y utilizadas para la síntesis de otras proteínas esenciales y constituyentes celulares nitrogenados. Por esta razón, el contenido de ficobiliproteínas puede llegar a constituir hasta el 160% de las proteínas solubles de la célula en el medio de cultivo (Gantt, 1981; Grossman et. al, 1986).

Los gránulos de cianoficina son copolímeros de ácido aspártico y arginina de alto peso molecular, Estos, en las cianobacterias son degradados rápidamente cuando comienza la fase de crecimiento, ya que constituyen también el material de reserva nitrogenado y se acumulan durante la fase estacionaria de los cultivos deficientes de N (Betancourt, 1997).

Las cianobacterias poseen la habilidad de incorporar rápidamente los nutrientes esenciales, la de acumular inmediatamente en forma de material de reserva concentrado y de la movilización controlada de dichas reservas, estas habilidades les ayudan a enfrentar cambios del el medio donde se encuentran (Betancourt, 1997).

1.4.2. Cultivos masivos de *Spirulina platensis*

Según Darley (1982), para lograr un cultivo masivo de cianobacterias o microalgas en crecimiento activo es necesario tomar muy en cuenta los siguientes parámetros.

- Inóculo viable de tamaño mínimo.
- Suministro de nutrientes y microelementos.
- Condiciones fisicoquímicas adecuadas (temperatura, pH, salinidad, etc.).
- Luz como fuente de energía.

La luz es el factor fundamental en todo cultivo masivo de *Spirulina platensis*. La radiación fotosintéticamente activa cae dentro del espectro visible (400-700nm). Es la fuente de energía para la fotosíntesis y por lo tanto los factores que afecta al crecimiento y metabolismos son: la intensidad luminosa, la longitud de onda y el foto período (Darley, 1982).

Uno de los parámetros físicos más importante para el crecimiento de la *Spirulina platensis*, es la temperatura. El valor adecuado de temperatura para la

mayoría de micro algas se sitúa entre 18 y 25 °C, sin embargo la spirulina puede vivir en rangos de temperatura de 24 hasta 34°C (Ulianova, 2002).

1.4.3. Utilidades de la *Spirulina platensis*

La spirulina es especialmente rica en proteínas, con una cantidad del 64 – 74% de su peso seco total (Gershwin & Belay, 2008). Las proteínas que tienen más importancia comercial son las biliproteínas, que son la c-ficocianina y la aloficocianina (Vonshak, 1996).

La spirulina ha adquirido una significativa importancia debida, no sola a su alto porcentaje proteico, sino también a que posee un alto contenido de minerales como el potasio, calcio, zinc, magnesio, manganeso, selenio, hierro y fosforo. Además posee vitaminas B12, B1, B2, B6 y E, biotina, ácido pantoténico, ácido fólico, Inositol, Niacina (Carr & Whitton, 1982).

La *Spirulina platensis* ha sido sujeto de varias investigaciones para su uso como alimento, suplemento dietético y como comida funcional. En el uso comercial, el nombre común, spirulina, se refiere a una biomasa seca de cianobacterias con altas propiedades nutritivas (Gershwin & Belay, 2008).

1.4.3.1. Biofertilizantes a base de aminoácidos.

Según Mendel (2010), las plantas sintetizan los aminoácidos a través de reacciones enzimáticas por medio de procesos de aminación y transaminación. El primero ocurre a partir de sales de amonio absorbidas del suelo y ácidos orgánicos, producto de la fotosíntesis.

El proceso de transaminación permite introducir aminoácidos a partir de otros preexistentes. La síntesis de proteínas por parte de las plantas, se realiza a partir de los aminoácidos, siendo necesaria la presencia de todos y cada uno de los constituyentes de la proteína en cuestión (Sosa, 2002).

Los aminoácidos libres agregados vía foliar son incorporados inmediatamente al material proteínico, o al que convenga en aquel momento, por esta razón los biofertilizantes a base de aminoácidos presentan grandes ventajas.

En la actualidad, con el incremento del uso de biofertilizantes y fertilizantes de tipo orgánico, aparecen nuevos productos con muchos beneficios para el sector agrícola. La producción de un biofertilizante orgánico a base de aminoácidos y péptidos es una de las utilidades de la *Spirulina platensis*, ya que este tiene una influencia específica como biocatalizador de los procesos enzimáticos y nutricionales de las plantas (Sosa, 2002).

Un biofertilizante a base de aminoácidos también tiene efecto sobre la multiplicación celular y una acción positivas sobre la fertilidad de los pólenes y la flor, aumentando las probabilidades productivas en los cultivos (Sosa, 2002).

Según Sosa 2002, los biofertilizantes ayudan a la absorción rápida y el transporte sistémico a través de las partes aéreas de las plantas, además facilitan la metabolización y formación de sustancias como la clorofila y las hormonas.

El uso de los biofertilizantes se traduce en la maduración adelantada y homogeneidad de los frutos y semillas, mayores contenidos de azúcares, reducción de los daños causados por fríos, heladas y granizo. Además los biofertilizantes a base de aminoácidos actúan como un excelente anti estrés de suelos salinos u otros tipos de carencias o excesos de agua, también por fototoxicidad causada por la errónea aplicación de los plaguicidas (Mendel, 2010).

Las ventajas de los biofertilizantes a base de aminoácidos son:

- Un biofertilizante a base de aminoácidos puede aportar la Glicina, que es necesaria en el primer crecimiento y momentos iniciales de la

emergencia, para la formación de porfirinas que son las estructuras antecesoras de la clorofila y citocromos (Betancourt, 1997).

- La aplicación de biofertilizantes a base de aminoácidos aplicados en momentos oportunos de la vida de una planta, suministran aminoácidos, y hormonas vegetales en cantidades necesarias para la transaminación, lo que le permite a la planta sintetizar los aminoácidos que le son necesarios en ese cierto momento (Vonshak, 1996).
- Cuando las plantas sufren de déficit hídrico, se ha comprobado el aumento de los niveles de prolina en un 20 a 25 %, y descenso en los niveles de arginina y serina. Un biofertilizante a base de aminoácidos aplicado en estas condiciones, contribuiría a aliviar el efecto de la sequía a través de mecanismos osmóticos (Vonshak, 1996).
- Los aminoácidos de síntesis, de fermentación enzimática y de hidrólisis, son capaces de aumentar el torrente circulatorio de la planta evitando el gasto energético.

La incorporación de aminoácidos a las plantas puede producirse por vía foliar o radicular, siendo la más usual, la vía radicular para el ingreso de los aminoácidos externos.

Según Morte (2004), los aminoácidos aportados al suelo por los biofertilizantes, son absorbidos vía radicular por las plantas, y la porción que no haya sido aprovechada por las plantas, puede ser degradada mediante procesos de:

- Aminación (conversión a péptidos, aminoácidos y aminas).
- Amonización (conversión a amoniaco).
- Nitrosación (conversión a nitroso).
- Nitración (conversión a nitratos).

De estos procesos se benefician los microorganismos del suelo y las plantas superiores para construir sus estructuras proteicas.

Entonces los principales efectos de los aminoácidos libres en las plantas son:

- Síntesis de proteínas.
- Resistencia al estrés (altas temperaturas, enfermedades, heladas, etc.).
- Efectos sobre la fotosíntesis, los aminoácidos glicina y ácido glutámico incrementan la concentración de clorofila.
- Efectos quelantes, la glicina y el ácido glutámico también ayudan a retener cationes formando quelatos.
- Efectos sobre la polinización. Los aminoácidos prolina, glutámico y glicina aumentan la germinación del grano de polen alargando el tubo polínico.

Un ejemplo de biofertilizante a base de aminoácidos es el producto ALGAFERT, producido por la empresa Bioalgal marine.

ALGAFERT es un biofertilizante basado en microalgas, su composición es 100% natural. Para la producción del mismo se emplea spirulina, que contiene una elevada concentración de aminoácidos, polisacáridos, fitohormonas oligoelementos y antioxidantes, convirtiéndola en un complemento biológico (Bioalgal Marine, 2005).

Entre los beneficios que presenta el ALGAFERT, se encuentran:

- Favorecer el proceso de germinación de las semillas.
- Potencia el metabolismo de la planta, obteniendo mejores rendimientos en los cultivos.
- Incrementa la formación de flores.
- Mejora la calidad del polen.
- Disminuye los efectos del estrés ocasionado por el clima y deficiencia de agua.
- Ayuda a la regeneración de tejidos.

1.4.4. Los fertilizantes Químicos

Un Fertilizante es un producto que incorporado al suelo o aplicado a los vegetales o sus partes, suministra en forma directa o indirecta sustancias nutritivas para estimular el crecimiento, aumentar la productividad o mejorar la calidad de la producción (CASAFE, 2005).

Un fertilizante químico consta de los siguientes componentes

- Nutrientes primarios: Fósforo, Nitrógeno, Potasio.
- Nutrientes secundarios: Azufre, Calcio, Magnesio.
- Menores o micronutrientes: Boro, Cloro, Cobre, Hierro, Manganeso, Molibdeno, Zinc.

Son compuestos producidos para suplir las necesidades de los suelos y mejorar los cultivos, la materia prima necesaria para su elaboración debe ser importada y su procesamiento depende de un alto consumo de energía.

Para la producción de los fertilizantes químicos se emplea materia prima proveniente de yacimientos mineros, la extracción de la misma no afecta a las áreas de producción agrícola, y esto se convierte en un beneficio en la realización de estos productos. El problema con estos recursos es que no son renovables (Cubero, 1999).

Los fertilizantes químicos poseen una alta concentración de nutrientes y tienen una baja humedad, y esto constituye una ventaja en la reducción de costos para el transporte, aplicación y manejo de estos productos. Los contenidos de nutrientes de los fertilizantes químicos son conocidos, fijables y controlables, sin embargo cuando se aplican sin una especificidad, estos nutrientes pueden acumularse en el suelo y ocasionar contaminación de los mismos.

Los fertilizantes químicos son solubles, por esta razón los nutrientes están rápidamente disponibles para las plantas, sin embargo cuando hay una

gran cantidad de agua estos nutrientes pueden ser desaprovechados ya sea por erosión o lixiviación, contaminando las fuentes de agua naturales y subterráneas (Cubero, 1999).

1.4.5. La digestión anaerobia.

Campos (2001), describe a la digestión anaerobia como un proceso biológico complejo que implica el uso de microorganismos, en ausencia de oxígeno, para la estabilización de materiales orgánicos mediante su conversión a metano y otros productos inorgánicos como el dióxido de carbono.

Según Retamal (2004), la digestión anaerobia es uno de los procesos más antiguos en el tratamiento de aguas residuales, que consta principalmente de tres etapas:

- Hidrólisis.
- Acidogénesis.
- Metanogénesis.

La etapa metanogénica suele ser la más lenta, y por lo tanto la limitante de este proceso, sin embargo cuando existen sustratos complejos, la etapa limitante pasa a ser la hidrólisis. Existe un gran número de factores que afectan la digestión anaerobia, el que más se destaca es la temperatura ya que tiene una relación directa con la velocidad de hidrólisis, por lo tanto:

- “A temperaturas bajas, la velocidad de hidrólisis disminuye”.

Los tratamientos anaeróbicos ofrecen ventajas económicas, lo que fundamenta la posibilidad de tratamiento de residuos con altas cargas en instalaciones compactas, la producción limitada de lodos, requerimientos nutricionales reducidos y un balance energético positivos.

La digestión anaerobia consta principalmente de 3 etapas: a) Hidrólisis, en donde se solubilizan los compuestos de alto peso molecular, b) Acidogénesis, en donde se lleva a cabo la metabolización de monómero a productos intermedios, como ácidos grasos volátiles y c) Metanogénesis, proceso en el cual se da la conversión del acetato, dióxido de carbono e hidrógeno en metano (Retamal, et. al, 2004).

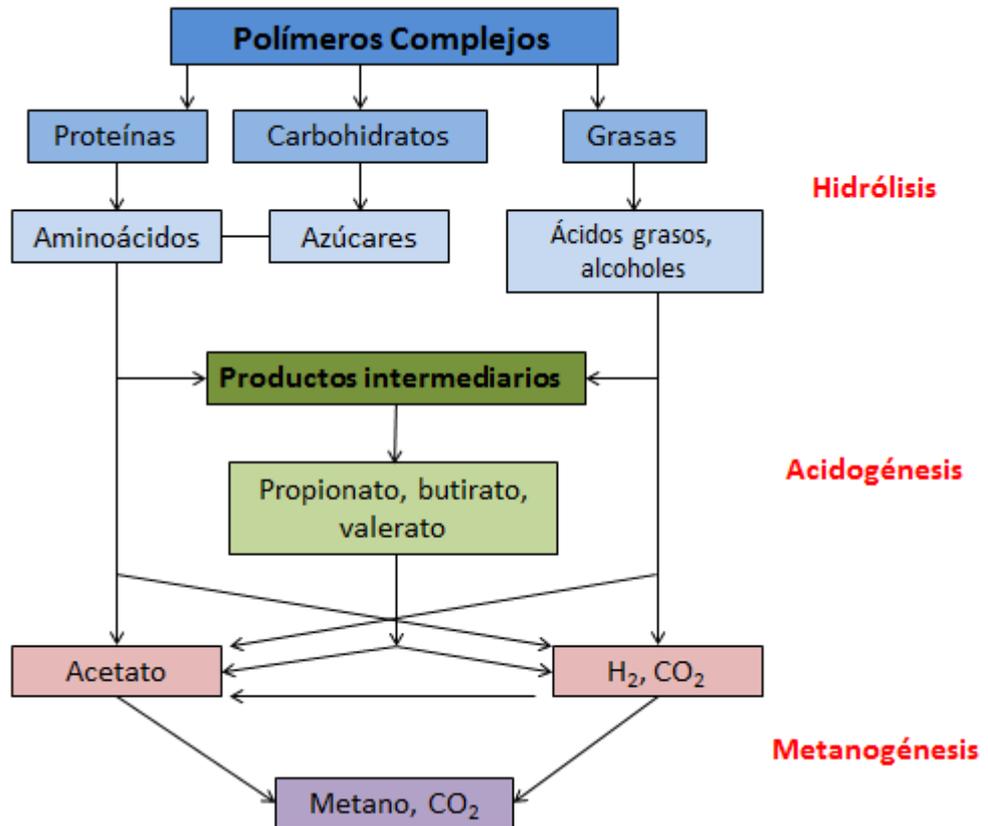


Figura 1.3 Fases de la digestión anaerobia, desde polímero complejos hasta los productos finales: Metano y CO₂.

La mayoría de los microorganismos oxidan determinados compuestos orgánicos a fin de obtener energía para su crecimiento y utilizan compuestos carbonados específicos para sintetizar sus componentes celulares. Los procesos anaerobios se caracterizan por tener consorcios bacterianos muy complejos, pero las principales interacciones se dan entre el reino Bacteria y Archae (Aquiahuatl & Pérez, 2004).

Las bacterias involucradas en la digestión anaerobia, son facultativas por lo que consumen el oxígeno que pueda haber dentro del digestor contribuyendo a la formación de condiciones anaerobias, por lo tanto crecen rápidamente y tardan en doblarse aproximadamente unos 30 minutos, estas se subdividen en:

- Celulolíticas hemicelulolíticas.
- Aminolíticas.
- Proteolíticas.
- Lipolíticas.

1.4.5.1. La etapa hidrolítica de macromoléculas en la digestión anaerobia.

La primera fase de la digestión anaerobia es la etapa hidrolítica, en esta los microorganismos usan material orgánico soluble que pueda atravesar la pared celular para su metabolismo. La fase hidrolítica suele verse afectada por factores como la composición de la materia orgánica, tamaño de partícula y el pH del medio (Poirrier, 2005; Martí, 2006).

Las enzimas involucradas en la degradación de proteínas, se denominan “proteasas”, estas enzimas convierten a las proteínas en aminoácidos y péptidos que son usados en la síntesis de nuevo material celular. Una fracción de este material se degrada en ácidos grasos volátiles, dióxido de carbono, hidrógeno, amonio y sulfuro en las etapas acidogénicas y metanogénicas del proceso de digestión anaerobia (Salerno, et. al, 2009).

Según Martí (2006), las enzimas que se encargan de la digestión de los lípidos se denominan “lipasas”, estas causan la ruptura de los enlaces produciendo ácidos grasos de cadena larga y glicerol.

La hidrólisis de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos, involucra la conversión de estos en sus componentes más simples. Este proceso es realizado mediante enzimas hidrolíticas sintetizadas por microorganismos. Estas enzimas pueden ser excretadas al medio o estar asociadas a la membrana celular (Poirrier, 2005).

Existen tres métodos descritos, mediante los cuales los microorganismos realizan la hidrolización de moléculas complejas.

1. Los microorganismos secretan las enzimas al medio líquido, y estas se adsorben en las partículas para liberar un sustrato libre (Jain, et. al, 1992).
2. Los microorganismos se adhieren a las moléculas, y secretan enzimas en los alrededores de la misma, para obtener sustratos liberados (Poirrier, 2005).
3. Los microorganismos poseen enzimas adjuntas que poseen la doble capacidad de actuar como transportadores-receptores hacia el interior de las células (Poirrier, 2005).

La velocidad de hidrólisis está determinada por el tamaño de partícula o por el número de sitios de adsorción existentes en la superficie de la molécula. Cuando la hidrólisis se realiza en un digestor, las partículas de sustratos son rápidamente colonizadas por los microorganismos y estos secretan enzimas extracelulares (Poirrier, 2005).

En la digestión anaerobia existen tres rangos de temperatura.

- Psicrófico (de 4 a 15 °C)
- Mesófilo (de 20 a 43 °C)
- Termófilo (superior a 45°C)

La velocidad de la hidrólisis de moléculas complejas, es más lenta en condiciones de temperaturas psicrófilas (Retamal, et. al, 2004).

La presencia de material complejo o particulado puede constituir un inconveniente en el proceso global de degradación anaerobia, provocando el deterioro de la biomasa por acumulación de sólidos (Mahmoud, et. al, 2003).

Cuando la concentración de las enzimas hidrolíticas no es limitante, la dependencia de temperatura para esta etapa, puede ser modelada comúnmente mediante la ecuación de Arrhenius, en donde la velocidad de crecimiento aumenta exponencialmente con la temperatura hasta que esta sea la óptima, seguido por un decaimiento exponencial si se excede la misma (Retamal, et. al, 2004).

La temperatura óptima para un consorcio anaerobio mesófilo es de alrededor de 37°C, es de gran interés conocer los efectos de la temperatura sobre la etapa hidrolítica con el fin de encontrar las mejores condiciones de operación para la hidrólisis de material complejo o particulado (Retama, et. al, 2004).

Las proteínas son hidrolizadas en el proceso de digestión anaerobia mediante dos grupos enzimáticos, denominados proteasas y peptidasas, también denominadas como proteinasas. Los microorganismos comienzan a producir proteinasas cuando la concentración de aminoácidos y compuestos inorgánicos en el medio acuoso es baja o cuando la concentración de proteínas y péptidos es alta (Poirrer, 2005).

Las bacterias que llevan a cabo las reacciones de hidrólisis y acidogénesis son las anaerobias facultativas, entre los géneros más destacados tenemos a los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, además los géneros *Bacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium* (Martinez, 2010).

Las bacterias con actividad proteolítica son en su mayoría especies de los géneros *Clostridium*, *Peptococcus*, *Bifidobacterium* y *Staphylococcus*. Bacterias como *Anaerovibrio lipolytica* con actividad lipolítica han sido aisladas del rumen, igualmente la *Buryrovibrio fibrisolvens* hidroliza fosfolípidos cuando crece con azúcares fermentables como fuente de carbono (Martinez, 2010).

Luego de la hidrólisis de proteínas, y ya con la obtención de aminoácidos, se produce la fermentación de los mismos. Este es un proceso microbiano en el cual el hidrógeno producido proviene de la deshidrogenación del piruvato. Los productos principales de esta fermentación son la biomasa, propionato, butirato, acetato e hidrógeno (Bermudez, et, al. 1988).

1.4.6. Sistemas Mezclados

El mezclado se define como una operación física que hace a un fluido más uniforme, eliminando gradientes de concentración, temperatura, entre otros. Esta operación se realiza por el intercambio de material entre diferentes localizaciones para producir una mezcla final de todos los componentes (Dorán, 1995).

Las ventajas del mezclado son:

1. La combinación de los componentes solubles.
2. La dispersión de gases, como por ejemplo del aire.
3. El mantenimiento de la suspensión de partículas sólidas como las células.
4. La dispersión de los líquidos inmiscibles para formar una emulsión o suspensión de gotas finas.
5. La mejora de la transmisión del calor en todo el sistema mezclado.

Según Campos (2001), para crear las condiciones ambientales óptimas en los sistemas de fermentación, los biorreactores deben proporcionar un

íntimo contacto a las células con el sustrato, por esta razón el mezclado es una de las operaciones más importantes en el bioprocesado.

Para la eficiencia del mezclado, los tanques agitados deben construirse de forma cilíndrica y si es posible, se redondea la base del tanque con el fin de eliminar las esquinas donde se puedan formar regiones estancadas (Dorán, 1995).

Para sistemas mezclados, se emplea un rodete, la relación entre el diámetro del tanque y la del rodete es normalmente 3:1. El rodete debe ser instalado en la parte inferior de un agitador mecánico situado en el centro del tanque. El agitador va a moverse por medio de un motor. El efecto rotario del rodete ocasionará un bombeo en el líquido y la creación de un flujo regular (Jain et. al,1992).

Según Dorán (1995), las placas deflectoras, son láminas verticales de metal unidas a la pared de un tanque, estas ayudan a reducir los vórtices en el líquido. Lo más recomendable es usar cuatro placas regularmente espaciadas.

La anchura óptima de los deflectores va a depender del diseño del rodete y de la viscosidad del fluido y se considera: 1/10 o 1/12 del diámetro del tanque. Para los líquidos de baja viscosidad, los deflectores se colocan perpendicularmente a la pared (Dorán, 1995).

En cuanto al diseño del rodete, en la actualidad se usan rodetes con palas planas, hélices, tornillos helicoidales, anclas, turbinas, etc. La elección del rodete depende de varios factores, entre los que tenemos:

- Viscosidad del líquido que se va a mezclar.
- La sensibilidad del sistema a la cizalla mecánica.

En cuanto a la distancia del fondo del tanque y el rodete, esta debe ser de orden 1/3 a 1/4 de la altura total del tanque.

1.4.6.1. Mecanismos de Mezcla

Para que una mezcla sea efectiva, el fluido impulsado por el rodete debe recorrer todo el recipiente en un tiempo razonable, además la velocidad del fluido debe ser suficiente para arrastrar el material hacia las partes más alejadas del tanque y formar turbulencias. Todos estos factores son importantes en el mezclado de los fluidos, los cuales pueden describirse como una combinación de tres procesos físico:

- Distribución o macromezcla.
- Dispersión o micro o macromezcla.
- Difusión o micromezcla.

En la digestión anaerobia el mezclado es muy importante. Un buen equipo mezclador acelera el proceso de digestión, por las siguientes razones:

- Inoculación inmediata del influente con los microorganismos involucrados en el proceso
- Prevención de la formación de costras
- Mantenimiento de la homogeneidad del contenido del tanque, distribución de alimentos, organismos, alcalinidad, calor y productos bacterianos de desecho.
- Utilización máxima del contenido total el digestor y disminución de sólidos inertes en el fondo.

La mezcla puede conseguirse ya sea por recirculación del gas producidos durante la digestión anaerobia o mediante sistemas mecánicos que funcionan a diferentes velocidades (Valentinuzzi, 2002).

1.4.7. Sistemas de Calentamiento.

En los bioprocesos es importante administrar la temperatura necesaria para que se den las reacciones involucradas. Por ejemplo las enzimas de

ciertos organismos funcionan solo en ciertos rangos de temperaturas, por lo que es importante diseñar un sistema que ayude a la transmisión de calor y por lo tanto al mantenimiento del proceso en sí.

Según Valentinuzzi (2002), un digestor anaerobio, puede funcionar a cualquier temperatura, pero el tiempo que tarda la digestión es variable y está relacionado directamente con la temperatura. Cuando hay un incremento en la temperatura, se disminuye el tiempo necesario para que se produzca la estabilización de la materia orgánica tratada en el proceso. El rango óptimo de temperatura para la digestión anaerobia está entre 35 y 37 °C.

Los digestores se pueden calentar de diferentes formas. Una de ellas es la recirculación de fangos del digestor a través de un intercambiador exterior de agua caliente. Además se pueden usar camisas externas de calentamiento para proveer una temperatura más homogénea. El gas del digestor suele usarse como combustible en la caldera que calienta el agua para ser usada en el intercambiador de calor.

1.4.8. La estabilización química con cal

Para la estabilización de lodos provenientes de digestiones anaerobias, líquidos de fosas sépticas, etc. Se pueden utilizar estabilizantes químicos para darles usos a estos residuos, principalmente como fertilizantes.

La adición del agente químico cal, tiene la finalidad de elevar el pH sobre el valor de 12, límite sobre el cual los organismos no pueden sostener sus funciones metabólicas. Si se mantiene este valor evitaremos malos olores, la presencia de vectores y se eliminarán los procesos de degradación (Rivera, 2006).

Se puede realizar la estabilización utilizando cal hidratada, Ca(OH)_2 , como cal viva CaO , teniendo esta última una ventaja en cuanto a la reacción

exotérmica que produce al ser mezclada con agua, contribuyendo a la eliminación de los patógenos por elevación de temperatura.

Para la estabilización con cal es importante tomar en cuenta factores como: concentración de sólidos, tiempo de contacto entre la cal y el lodo y la dosis de cal. La estabilización con cal no destruye la materia orgánica por lo que la cantidad de cal, será la necesaria para mantener el valor del pH arriba de 12. Es recomendable un contacto mínimo de 2 horas con la cal (Oropeza, 2006).

La estabilización con cal representa bajos costos de inversión, pero puede traer altos costos operativos dependiendo del costo de cal, cabe recalcar que el peso del material puede incrementarse entre un 20 y 40%.

CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS

2.1. Participantes

El proyecto de graduación se desarrolló en la Empresa Andesspirulina, en la planta de producción de polvo de *Spirulina platensis*.

Los participantes del Proyecto de Graduación fueron: Andrea López Karolys en la planificación y ejecución del proyecto, Ing. Rosa Albuja como Directora e Ing. Pablo Araujo como Codirector.

Para la ejecución del proyecto también hubo la participación del Tec. Héctor Chiluisa y del personal de la planta.

2.2. Zona de Estudio

El proyecto se ejecutó en las instalación de la Planta de Producción Andesspirulina, ubicada en la parroquia Pintag, cantón Quito, Provincia de Pichincha.

Las coordenadas: 0°22'14.32" S y 78°21'35.78" O

Elevación: 2866 m.

Ubicación: la forma de llegar a la empresa se muestra en la figura 2.1.

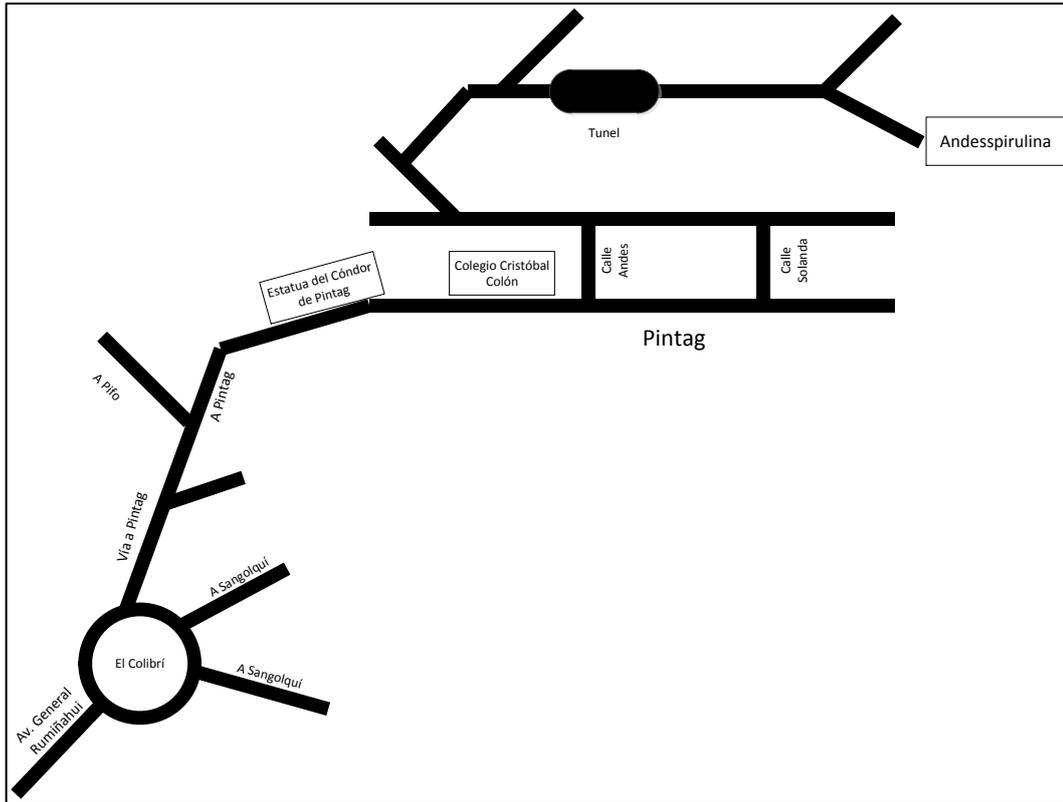


Figura 2.1. Ubicación de la planta Andesspirulina.

Ubicación Satelital: La ubicación satelital de la empresa se muestra en la figura 2.2

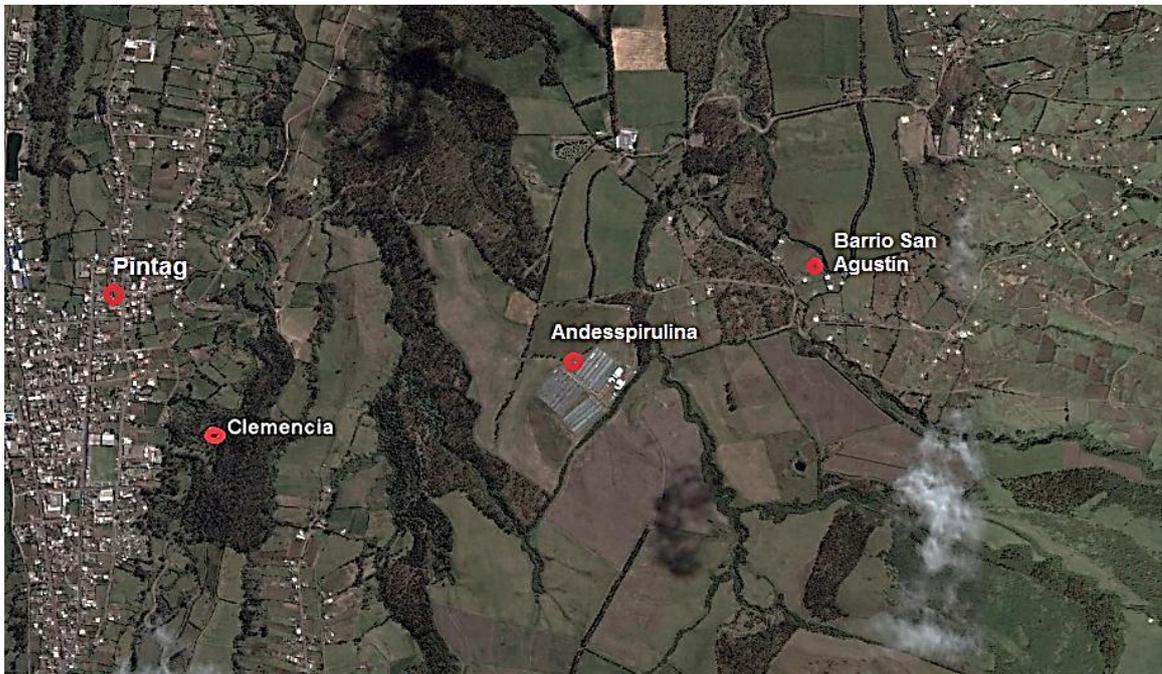


Figura 2.2. Ubicación Satelital de la empresa Andesspirulina.

Condiciones meteorológicas: Temperatura mínima de 10 °C y Temperatura máxima de 26°C, con presencia de lluvias y fuertes vientos dependiendo de la estación.

2.3. Período de tiempo de investigación.

El Proyecto de graduación comenzó en Febrero del 2011 y terminó en Octubre del mismo año.

2.4. Procedimiento.

Se realizó una revisión bibliográfica sobre la *Spirulina platensis*, los fertilizantes y biofertilizantes, la etapa hidrolítica de la digestión anaerobia, tecnologías existentes para la elaboración de biofertilizantes a partir de microalgas, y proyectos relacionados que tratan principalmente sobre la etapa hidrolítica y los parámetros que deben ser controlados.

Luego en el proyecto se ejecutaron las siguientes etapas:

1. Ensayos preliminares.
2. Diseño del biorreactor piloto.
3. Construcción del biorreactor piloto.
4. Implementación y control de parámetros de funcionamiento del biorreactor.
5. Dimensionamiento del biorreactor a escala industrial.

2.4.1. Ensayos Preliminares.

Durante esta etapa, se realizaron ensayos, probando distintas concentraciones de sustratos y de inóculos bacterianos hasta definir la relación óptima de sustrato/inóculo, (Retamal, 2004). Que se requiere para obtener aminoácidos libres a partir de la hidrólisis de proteína de la *Spirulina platensis*.

2.4.1.1. Preparación de inóculos

Se probaron diferentes inóculos bacterianos, entre ellos, bacterias provenientes de estiércol de vaca, aguas residuales industriales, y bacterias fermentativas lácticas. Esto con el fin de determinar cuál de ellos produce una mejor hidrólisis y otorga mejores características al biofertilizante (Poirrier, 2005).

2.4.1.1.1. Inóculo de estiércol de vaca.

Se tomaron 500 gramos de estiércol de vaca seco y fueron diluidos en 1 litro de agua, se mezcló durante 30 minutos para facilitar la disolución de las bacterias en el agua, se cernió y se almacenó para su uso en los ensayos.

2.4.1.1.2. Inóculo de bacterias ácido lácticas.

Se tomó una cantidad entre 0.50 y 0.30 gramos de cultivo liofilizado de bacterias ácido lácticas y se disolvió en un volumen de 150 ml. Para dar concentraciones de entre 0.33 y 2 g/l de este inóculo.

Se emplearon bacterias ácido lácticas, mesófilas y termófilas, de un cultivo marca Mediterranea Biotechnologie.

2.4.1.1.3. Inóculo de agua residual

Se tomó agua residual industrial proveniente de la planta de producción de Andesspirulina. El punto de toma fue una acequia próxima a las oficinas, como se observa en la figura 2.3, este sitio fue elegido ya que aquí se unían aguas residuales provenientes de todos los procesos de la planta. Para todos los ensayos se mantuvo el mismo lugar de toma de agua para mantener de cierta forma la misma concentración y tipo de inóculo.

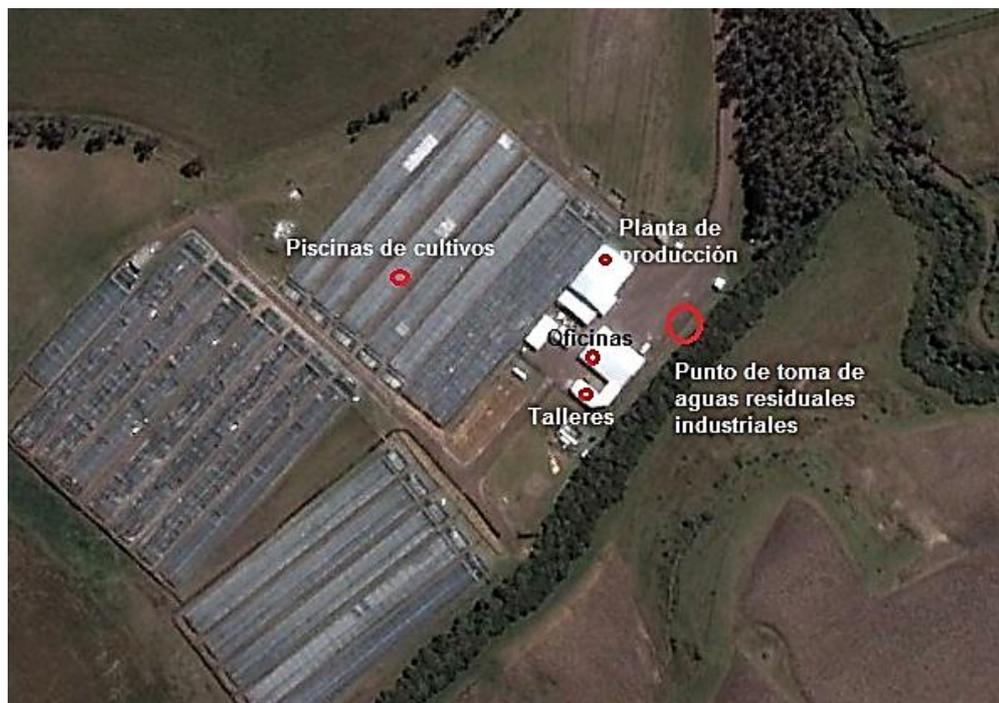


Figura 2.3. Ubicación del punto de toma de aguas residuales, en la planta Andesspirulina.

2.4.1.2. Concentración de spirulina

Se probaron diferentes concentraciones de spirulina con el fin de establecer una mezcla adecuada que facilite la agitación de la misma y no sea sobresaturada. Se probaron concentraciones bajas como 1.25 g/l y concentraciones de entre 20 hasta 60 g/l. La concentración máxima fue de 60 g/l ya que valores superiores pueden producir una mezcla espesa y difícil de

agitar. La spirulina usada fue el residuo ultra fino proveniente del proceso de producción.

2.4.1.3. Adaptaciones para agitación y calentamiento continuo.

Ya que no se contaba con una incubadora con agitación, se realizaron adaptaciones para otorgar un rango de temperatura entre 25 y 41°C a los ensayos preliminares, como se observa en la figura 2.4, mediante un equipo de calefacción de 120V, 60Hz con una potencia de 1500 Voltios. El equipo de calefacción estuvo conectado a una termocupla tipo J de 0 -399°C, marca CAMSCO modelo Tc-72N, y un control de temperatura, para automatizar el proceso de encendido y apagado del calefactor.

Para la agitación de en los ensayos preliminares, se utilizaron matraces Erlen meyer de 500 ml de volumen. Adaptados a estos, se usaron motores Johnson de 3-12V DC, corriente directa, ajustados a un potenciómetro de 20K, con adaptadores de 120V en input, 110V AC y de Output 9V de corriente directa. Al eje se adaptó una hélice plástica. El uso de estos motores proporcionó una agitación de aproximadamente 120 RPM.



Figura 2.4. Adaptaciones realizadas para los ensayos preliminares, para suplantar el uso de una incubadora con agitación (López, 2011).

2.4.1.4. Medición de pH.

El pH fue tomado al inicio y al final de cada ensayo preliminar con el dispositivo LabQuest de Vernier como se puede ver en la figura 2.5.



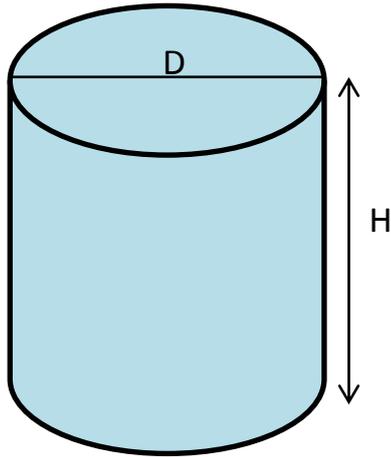
Figura 2.5. Dispositivo LabQuest de Vernier, para la medición de pH y Temperatura (López, 2011).

2.4.1.5. Análisis de laboratorio.

Se realizaron pruebas de laboratorio para el análisis y determinación de aminoácidos libres, resultado de la hidrólisis de proteínas (Reatamal, 2004). Las muestras fueron enviadas al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) a la estación Santa Catalina, ubicada en el Km. 1 de la vía Quito-Aloag

2.4.2. Diseño del biorreactor piloto

Se tomó en cuenta la disponibilidad de un tanque cuyo volumen calculado fue de 123 litros. Los cálculos matemáticos se realizaron de la siguiente manera usando la ecuación 2.1.



$$D = 48.5 \text{ cm}$$

$$H = 67 \text{ cm}$$

$$r = 24.25 \text{ cm}$$

$$V = \pi * r^2 * H$$

Ec. 2.1

$$V = 3.14 * (24.25)^2 * 67$$

$$V_{\text{total}} = 123.716 \text{ Litros.}$$

Para calcular el volumen funcional, del volumen total se toma el 75% como se indica en la ecuación 2.2.

$$Vf = Vt * 0.75$$

Ec. 2.2

Donde:

Vf = Volumen funcional

Vt = Volumen total

Obteniéndose así:

$$Vf = 123.71 * 0.75$$

$$Vf = 92.78 \text{ L.}$$

2.4.2.1. Diseño del Rodete

Para la eficiencia del mezclado, el tanque tiene forma cilíndrica pero no cuenta con una base redondeada (Dorán, 1995).

Se tomó en cuenta la relación 3:1 para el diámetro del rodete como se puede ver en la ecuación 2.3 (Dorán, 1995).

$$d_r = D * \frac{1}{3} \quad \text{Ec. 2.3}$$

Donde:

d_r = diámetro del rodete

D = diámetro total del tanque

$$d_r = 48.5 \text{ cm} * \frac{1}{3}$$
$$d_r = 16.16 \text{ cm}$$

Para la distancia entre el rodete y el fondo del tanque se consideró la relación 1/3 de la altura total del tanque (Jain et. al, 1992). Como se puede ver en la ecuación. 2.4.

$$h_r = H * \frac{1}{3} \quad \text{Ec. 2.4.}$$

Donde:

h_r = distancia entre el rodete y el fondo del tanque

H = altura total del tanque.

$$h_r = 67 \text{ cm} * \frac{1}{3}$$
$$h_r = 22.33 \text{ cm}$$

Para determinar el tipo de rodete necesario para la mezcla se usaron los datos obtenidos de los resultados de ensayos preliminares, que establecen factores como: concentración de spirulina, temperatura, tiempo de retención, y densidad de la mezcla.

La viscosidad aproximada, basada en valores bibliográficos de viscosidad para medios con células en suspensión (Basurto, 2001). También se

usó el programa Visimix Turbulent SV 2K7. Y en la tabla 2.1 se muestra el resumen de los parámetros que se tomaron en cuenta para correr el programa.

Tabla 2.1. Parámetros de diseño para definir el tipo de rodete en el biorreactor

Parámetro	Valor
Volumen total	123.71 L
Volumen funcional	93 L
Volumen de inóculo	3 L
Concentración de Spirulina	60g/L
Temperatura	40 °C
Tiempo de Retención	8 días
Densidad de la mezcla	1006 kg/m ³
Viscosidad aproximada	10 cP
Diámetro del rodete	16.16 cm
Distancia entre rodete y fondo	22.33 cm

En la tabla 2.1, el valor de la densidad fue calculado en laboratorio y el de la viscosidad aproximada, es un valor dado por bibliografía, referente a viscosidades de mezclas con células en suspensión.

En el anexo A se muestran los datos utilizados y los resultados del Programa Visimix turbulent SV 2K7, para el diseño del biorreactor piloto.

La hélice adecuada para este tipo de mezcla, es una hélice marina, y la simulación del flujo se muestra en la figura 2.6. Se agregaron placas deflectoras al diseño para evitar la formación de flujo circular y vórtices (Dorán, 1995).

Para el diseño de las placas deflectoras, se tomó en cuenta el diseño del rodete y la viscosidad del fluido, además se considera 1/10 o 1/12 del diámetro del tanque. Como se puede ver en la ecuación 2.5.

$$p_a = D * \frac{1}{12}$$

Ec. 2.5

Donde

p_a = Ancho de placas deflectoras

D = Diametro del tanque

$$p_a = 48,5 * \frac{1}{12}$$
$$p_a = 4.04 \text{ cm.}$$

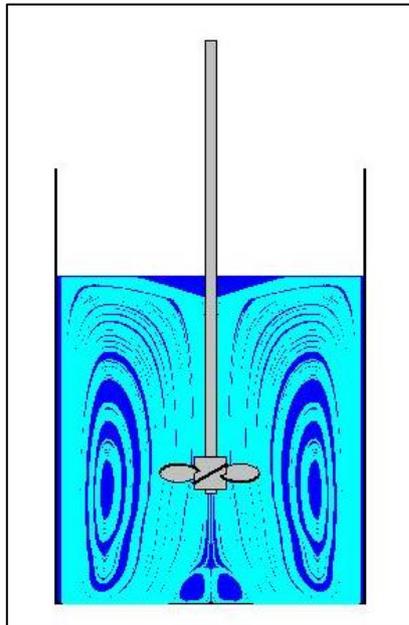


Figura 2.6. Simulación del flujo dado por la hélice marina y placas deflectoras colocadas perpendicularmente a la pared del tanque.

2.4.2.2. Sistema de Agitación.

Para el sistema de agitación se tiene a disposición un motor trifásico cuyas características se muestran en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Características del motor disponible para en uso en el biorreactor piloto

Característica	Valor
Voltaje	220V
Potencia	1/2 HP
Velocidad	1350 RPM

Según el diseño del biorreactor para una agitación eficiente, realizado con el programa Visimix Turbulent SV 2K7, la velocidad requerida para esta mezcla es de 95 RPM, por lo que se diseñó un sistema de poleas para bajar la velocidad del motor de 1350 RPM a las requeridas. Se emplea un motor de ½ Hp, debido a que era el de menor fuerza, disponible en la planta, y para facilitar la reducción de la velocidad.

2.4.2.3. Mecanismo reductor de velocidad.

Para la reducción de la velocidad del motor se empleará un sistema de poleas, que se trata de dos ruedas situadas a cierta distancia, que giran a la vez por efecto de una correa, estas correas suelen ser cintas de cuero o caucho flexibles y resistentes (Gonzales, 2003).

En el mecanismo reductor de velocidad, la velocidad de entrada se convierte en una velocidad de salida menor. En todo mecanismo de transmisión existen como mínimo dos ejes, el motriz y el eje conducido o arrastrado. El eje motriz va a ser el encargado de generar el movimiento y está acoplado a un motor. El eje conducido es el que recibe el movimiento generado por el eje motriz (Gonzales, 2003).

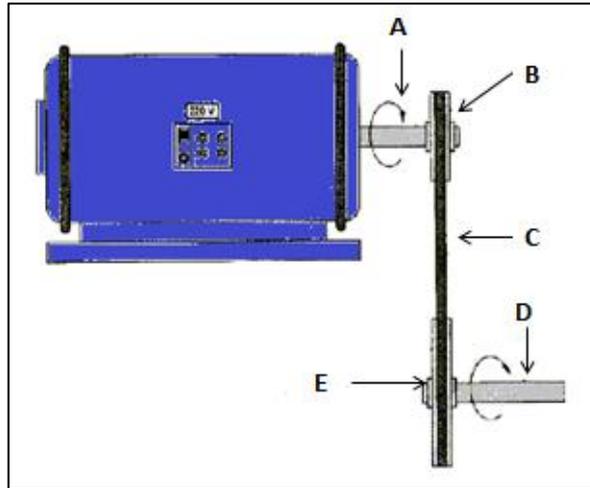


Figura 2.7. Sistema de poleas, mecanismo reductor de velocidad, en la figura a) eje motriz, b) Polea motriz, c) Correa, d) Eje conducido, e) Polea conducida

Un solo sistema de poleas solo nos proporcionaba una reducción de la velocidad en un 83%, se diseñó un segundo sistema de poleas, o sistema de transmisión compuesto, en donde el movimiento se transmite entre dos o más árboles o ejes de transmisión.

El diseño se basó en la figura 2.8.

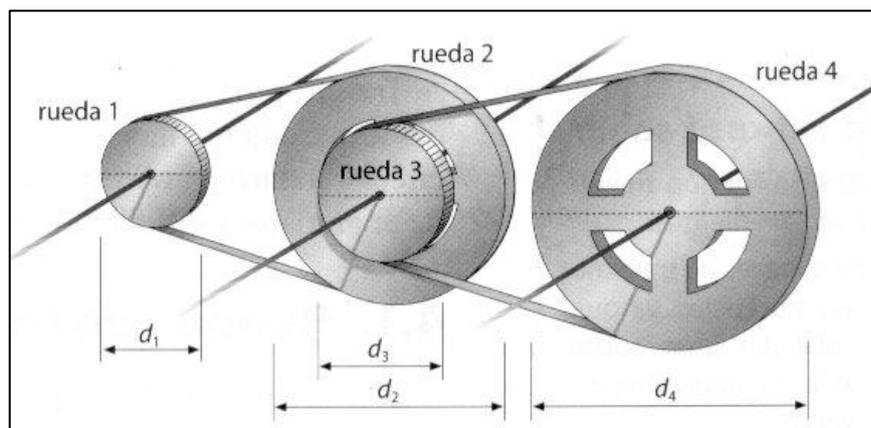


Figura 2.8. Sistema de transmisión compuesto que consta de 4 poleas o ruedas para la reducción de la velocidad de un motor.

Se realizaron los siguientes cálculos:

Diámetro del eje motriz = 14 mm.

Diámetro de la polea del eje motriz = 28 mm.

Velocidad del motor = 1350 RPM.

Velocidad requerida = 95 RPM.

La ecuación 2.3 muestra la expresión del cálculo de velocidad de las poleas:

$$\omega_1 * d_1 = \omega_2 * d_2 \quad \text{Ec.2.3}$$

Donde:

ω = Velocidad

d = diámetro

Para lograr una velocidad de 95 RPM es necesario emplear dos sistemas de poleas y en el primero reducir la velocidad a 220 RPM, para que en un segundo sistema la velocidad pueda alcanzar el valor necesario. Para el primer sistema de poleas:

$$\begin{aligned} \omega_1 * d_1 &= \omega_2 * d_2 \\ 1350 \text{ RPM} * 28 \text{ mm} &= 220 \text{ RPM} * d_2 \\ d_2 &= 171.2 \text{ mm} \end{aligned}$$

El diámetro de la polea necesaria para obtener las 220 RPM es de 171,2 mm.

Para el segundo sistema de poleas:

$$\begin{aligned} \omega_3 * d_3 &= \omega_4 * d_4 \\ 220 \text{ RPM} * 49 \text{ mm} &= 95 \text{ RPM} * d_4 \\ d_4 &= 113.47 \text{ mm} \end{aligned}$$

El diseño de los sistemas de poleas también contempla el uso de 4 chumaceras y de bandas AP34.

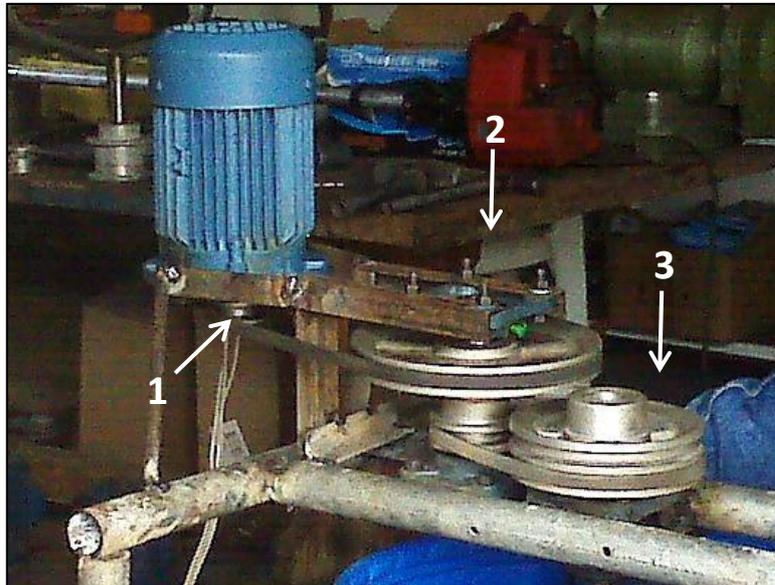


Figura 2.9. En la figura el 1) corresponde al eje motriz y su polea de 28mm, 2) el primer sistema de poleas con un diámetro de 171.2mm y 49mm, 3) segundo sistema de poleas con 113.47mm de diámetro (López, 2011).

2.4.2.4. Sistema de calentamiento considerado

Se determinó el uso de una resistencia tipo alambre, cubierta por espagueti de fibra de vidrio.

Para el diseño sistema de calentamiento se tomó en cuenta la altura que alcanza el líquido dentro del tanque, y la disponibilidad de 60 m de resistencia tipo alambre. Se tejió la resistencia de forma que proporcione una cobertura de más del 50 % y así ofrecer un calentamiento más eficiente.

Altura total del tanque = 67 cm.

Altura total del líquido = 51 cm.

Largo de la resistencia = 60 m.

Una vuelta de resistencia = 1.53 m.

Distancia entre vuelta y vuelta = 0.5 cm aproximado.

$$\# \text{ vueltas} = 60 \text{ m} \div 1.53 \text{ m}$$

$$\# \text{ vueltas} = 39.21$$

$$\% \text{ cobertura} = \frac{32 \text{ cm} \times 100\%}{51 \text{ cm}}$$

$$\% \text{ cobertura} = 62.74 \%$$

Con las 39.21 vueltas de resistencia se alcanza una cobertura del 62.74% de la altura total del líquido en el tanque como se puede observar en la figura 2.10. El diseño se complementa con la adición de una termocupla como control de temperatura para el funcionamiento del biorreactor.

2.4.2.4 Conexiones.

Debido al uso de un motor trifásico de 0.5 Hp, es necesario usar un contactor, este funciona como control y en su interior posee una bobina de 220V

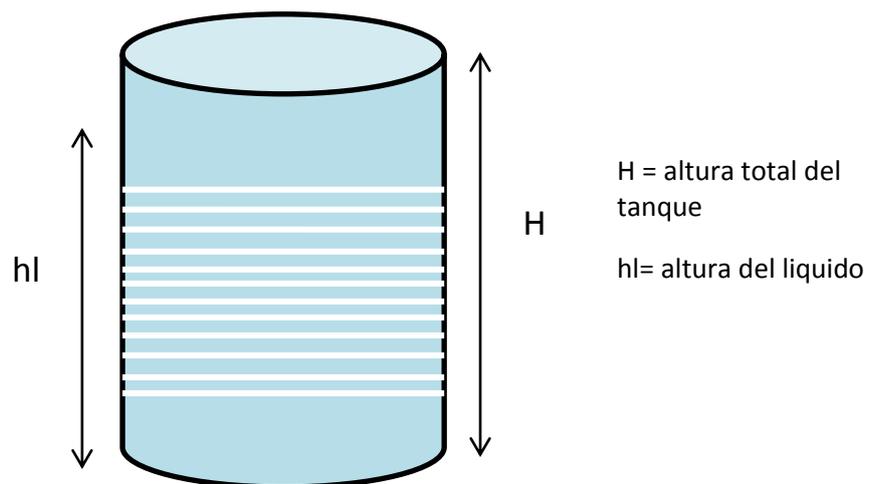


Figura 2.10. Diseño del sistema de calentamiento, con la resistencia tipo alambre enrollada alrededor del tanque para la distribución del calor.

El contactor es un mecanismo cuyo objetivo es el de cerrar unos contactos, para permitir el paso de corriente a través de ellos. Esto sucede cuando la bobina del contactor recibe corriente eléctrica, comportándose como un electroimán y atrayendo dichos contactos (Vilches, 2005).

El contactor estará conectado a un relé térmico que deja pasar el voltaje y al mismo tiempo cumple con la función de proteger y apagar el motor en caso de que falle una de las fases, evitando que este se queme o se sobrecaliente.

El relé de sobrecarga térmico, es un mecanismo que sirve como elemento de protección del motor, este desconecta el circuito cuando la intensidad consumida por el motor, supera durante un tiempo corto, a la permitida por este, evitando que el bobinado se queme. El relé, posee tres láminas bimetálicas con sus correspondientes bobinas calefactoras que cuando son recorridas por una determinada intensidad, ocasionan el calentamiento de las láminas y la apertura del relé (Vilches, 2005).

En el anexo B se muestra el circuito de control diseñado para conectar el sistema de agitación y el de calentamiento del biorreactor, con un contactor y un relé térmico.

2.4.3. Construcción del biorreactor piloto

La construcción del biorreactor se llevó a cabo en las instalaciones de la planta de producción Andesspirulina, los materiales y la descripción del proceso de construcción se encuentran en el Capítulo 3 del documento.

2.4.3.1. Tanque del biorreactor.

Se adaptó un tanque de polietileno marca PLASTIGAMA, con tapa hermética del mismo material y anillo ajustador de metal. El tanque tiene un volumen total de 123 Litros.

2.4.3.2. Sistema de Calentamiento

Se emplearon 60 metros de alambre tipo resistencia de 200 Vatios, cubierta de 60 metros de espagueti de fibra de vidrio aislante.

La resistencia fue tejida alrededor del tanque, con cintas ajustables, dejando una distancia de 0,5 cm entre vuelta y vuelta. A la resistencia se conectó una termocupla tipo J de 0 -399°C, marca CAMSCO modelo Tc-72N. A la termocupla será conectada a un sensor metálico de temperatura para darnos la lectura.

2.4.3.3. Sistema de Agitación

En la construcción del sistema de agitación se empleó un motor de marca TRANSTECNO modelo CM 0.50, de 220V y ½ Hp. Se usaron poleas de aluminio maquinadas a un eje de 2.4 cm de diámetro. Se utilizaron 4 cumaceras marca CMB p 205 de pared, y bandas AP34 para armar el sistema mecanismo reductor de velocidad.

2.4.3.4. Rodete

Para la construcción del eje y del rodete se usó acero galvanizado, para evitar la corrosión del mismo. Le hélice marina fue ajustada al eje mediante pernos galvanizados.

2.4.3.5. Placas deflectoras.

Para la construcción de las placas deflectoras se usaron láminas de acero galvanizado, cortadas bajo las especificaciones de diseño, y para colocarlas perpendicularmente a la pared del tanque se realizaron perforaciones y que fueron ajustadas con pernos galvanizados y caucho para evitar las fugas. En total serán colocadas 4 placas deflectoras.

2.4.3.6. Conexiones eléctricas

Para la instalación del motor se conectará el mismo a un contactor marca LG modelo SMC-10P de 1 Hp y 220V, además se usará un Relé Térmico marca CHNT modelo NC1-12 con el fin de proteger el motor de la variación o falta de una de las fases, evitando que este se sobrecaliente o quemé. Se construyó una caja de conexiones para cubrir al contactor, relé térmico y termoclupa del ambiente.

2.4.4. Implementación y control de parámetros de funcionamiento del biorreactor

2.4.4.1. Pruebas de funcionamiento

Para probar que el empaque de los pernos que se usaron en el ensamblaje de las placas deflectoras no produzca fugas, se realizaron pruebas con agua previo al arranque del biorreactor, figura 2.11. Este ensayo permitió observar el flujo de la mezcla y verificar la no formación de vórtices.



Figura 2.11. Prueba de funcionamiento de la hélice y verificación de flujo y de fugas (López, 2011).

2.4.4.2. Carga Inicial

Para arrancar con el funcionamiento del biorreactor. Se usó la concentración de spirulina y volumen de inóculo, establecidos por los resultados de los ensayos preliminares. Tomando en cuenta el escalamiento de volumen de los ensayos al biorreactor piloto.

2.4.4.3. Operación y Monitoreo.

El sistema fue operado y monitoreado durante el tiempo establecido por los ensayos preliminares, desde la carga inicial. El personal de la planta de Andesspirulina realizó chequeos continuos para asegurarse que el biorreactor siempre esté prendido, durante los ocho días de funcionamiento. La temperatura fue revisada y se mantuvo gracias al control de la termocupla.

El biorreactor piloto se encontró funcionando en un espacio previamente establecido, donde pudo ser monitoreado con facilidad.

El pH, fue revisado al comienzo y al final del funcionamiento del biorreactor para determinar si hubo variación del mismo

2.4.5. Estabilización con Cal

Se realizó la estabilización con cal, por cuanto la resistencia usada en el biorreactor piloto, no pudo elevar la temperatura por encima de los 70 °C, temperatura necesaria para una estabilización térmica.

La cal eleva el pH a 12, favoreciendo la eliminación de los microorganismos presentes, y ayuda a controlar los malos olores ocasionados por la descomposición de la proteína de la spirulina.

La dosis de cal necesaria esta función del tipo de lodo y varía de acuerdo a la concentración de sólidos. La estabilización con cal no destruye la materia orgánica, la relación que se utiliza de cal es la de 500 a 600 libras de cal, por tonelada de lodos (Oropeza, 2006).

El biofertilizante se encuentra en estado líquido pero se puede hacer el cálculo aproximado de sólidos presentes de acuerdo a la concentración de spirulina utilizada.

Volumen de biofertilizante = 93 Litros

Concentración de spirulina = 60 g/l.

Masa de spirulina = 5.6 Kg.

Masa de materia orgánica aproximada = 2 Kg correspondientes a crecimiento celular o biomasa (Oropeza, 2006)

$$Kg = \frac{600 \text{ libras} \times 1Kg}{2,2 \text{ libras}}$$

$$Kg = 272,7 \text{ Kg de cal por cada tonelada}$$

$$Kg \text{ de cal} = \frac{7,6 \text{ Kg de materia organica} \times 272,72 \text{ Kg de cal}}{1000 \text{ toneladas de materia orgánica}}$$

$$Kg \text{ de cal} = 2,07 \text{ Kg de Cal (aproximados)}$$

2.4.6. Análisis de datos

Se analizarán los datos obtenidos de los ensayos preliminares, en cuanto a concentración de spirulina, volumen de inóculo, días de cambio de coloración, pH inicial y final.

Además se analizarán los datos obtenidos de los análisis de laboratorio, provistos por el INIAP, tanto de los ensayos preliminares como del producto del biorreactor.

2.4.7. Dimensionamiento del biorreactor a escala industrial

Para el dimensionamiento del biorreactor a nivel industrial, se toman en cuenta diversos aspectos:

- Reducción de costos.
- Disponibilidad de materia prima.
- Elaboración de un nuevo producto.
- Disponibilidad de materiales para la construcción del biorreactor.
- Diseño del biorreactor piloto.

2.4.7.1. Dimensionamiento del tanque

Para el dimensionamiento del tanque se tomó en cuenta factores como:

- Disponibilidad del residuo ultra fino: diariamente se producen de 90 a 110 Kg de polvo de spirulina. La producción diaria de residuo ultra fino es de 5 a 12 Kg. Considerando un valor medio, se producen 8,5 Kg diarios de este residuo, por lo tanto a la semana hay una producción de 42,5 Kg. El 30 % de este residuo, está destinado a ventas, para alimentación de peces, alimentación de ganado vacuno, etc. Sin embargo los valores pueden ser variables, ya que la producción depende del clima y del factor de crecimiento y multiplicación celular de la Spirulina plantensis. (Andesspirulina, 2011).
- Espacio disponible en la planta Andesspirulina, para la instalación del tanque.
- Material del tanque, para el tipo de producto que se elabora.
- Diseño de una tapa abisagrada para la entrada de materia prima y para facilitar la limpieza del tanque.

Según Dorán (1995), el tanque deberá tener forma cilíndrica para la eficiencia del mezclado y contar con una base redondeada para evitar la formación de zonas muertas de mezcla.

2.4.7.2. Sistema de agitación.

Para el sistema de agitación se tomó en cuenta los motores disponibles en la planta. El motor considerado para el biorreactor escala industrial, deberá estar acompañado de un variador de velocidad, para proporcionar la velocidad necesaria establecida por el diseño.

Los variadores de velocidad, son convertidores de energía encargados de modular la energía que recibe el motor, estos permiten variar la velocidad y

la acopla de los motores asíncronos trifásicos, convirtiendo las magnitudes fijas de frecuencia y tensión en red de magnitudes variables (Pérez, 2004).

Un variador de velocidad puede tener un costo de entre 200 y 400 dólares.

2.4.7.3. Sistema de calentamiento

Para la construcción del sistema de calentamiento en el biorreactor a nivel industrial, se realizó un cambio en el uso de la resistencia en alambre por resistencias planas, colocadas alrededor de todo el tanque.

Se tomarán en cuenta también factores como:

- Sistemas de calentamiento más económicos.
- La dificultad del uso de otros sistemas de calentamiento como serpentines. externos o internos, o camisas, etc.
- Tipo de material de construcción del sistema de calentamiento.
- Temperatura necesaria para la elaboración del producto.

2.4.7.4. Tuberías consideradas

El biorreactor necesitará de tres tuberías:

- Tubería 1: para el ingreso del agua necesaria para la mezcla.
- Tubería 2: para la extracción el producto líquido y su posterior envasado.
- Tubería 3: para la extracción de los lodos o biomasa, producto de la digestión anaerobia.

El material de las tuberías será de PVC, para evitar daños y corrosión de las mismas.

2.4.7.5. Conexiones y automatización

Para el funcionamiento del biorreactor, se utilizarán los mismos mecanismos que en el biorreactor piloto:

- Termocupla y control.
- Contactor.
- Relé térmico.

Estos mecanismos se describen con mayor detalle en la sección 2.4.2.4 del presente capítulo.

2.4.7.6. Estructura metálica de soporte.

El biorreactor no debe ser instalado en el suelo, por este motivo se deberá usar una mesa metálica de 80 cm de alto y de 85 x 85 cm. Esta estructura ayudará a la fácil evacuación de los lodos por la tubería 3, y la recolección del producto por la tubería 2.

La vista isométrica del diseño del biorreactor a nivel industrial se muestra en el capítulo 3 del proyecto, como resultado.

CAPITULO 4: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones.

Por su alto contenido proteínico, la *Spirulina platensis*, es un sustrato apto para la elaboración de un biofertilizante a base de aminoácidos libres. La búsqueda de nuevas alternativas y métodos económicos en la elaboración de productos, son las causas para el uso de la digestión anaerobia en fase hidrolítica, reemplazando los métodos convencionales, como lo son el uso de enzimas especializadas o ácido clorhídrico concentrado, que implican mayores inversiones, no solo en la obtención de la materia prima, también en la inversión de estructura adecuada para la aplicación de estos métodos.

La digestión anaerobia en fase hidrolítica, representa un método más económico para la elaboración de biofertilizante a partir de *Spirulina platensis*, ya que se basa en el principio del uso de microorganismos para reducir el tamaño de macromoléculas, hidrolizando proteínas en aminoácidos libres, mediante la producción de enzimas involucradas en el metabolismo bacteriano.

La empresa Andesspirulina se dedica a la producción de *Spirulina plantensis*, que posee un alto porcentaje de proteína de entre 60 y 70%, la fase hidrolítica permitió la transformación de la proteína, en aminoácidos libres que se convierten en elementos más fácilmente asimilables por los tejidos vegetales. En base a este fundamento fue posible el diseño, construcción y operación de un biorreactor piloto para la producción de un biofertilizante.

En los ensayos preliminares, se estableció, que el aumento de temperatura, reduce los días en los que se produce la hidrólisis de proteína de

Spirulina plantensis. La temperatura de 40 y 41°C, produjo un cambio de coloración a los ocho días de iniciado el proceso. Rangos termófilos por sobre los 42°C, ocasionan la inactivación de las enzimas provenientes del metabolismo microbiano, dificultando la fase hidrolítica en la digestión anaerobia.

El consorcio bacteriano que se encuentra en el agua residual proveniente de la planta de producción de Andesspirulina, es un consorcio adaptado a usar como sustrato a la *Spirulina platensis*, por esta razón fue la mejor alternativa sobre otros consorcios como, el proveniente del estiércol de vaca y bacterias ácido lácticas. Por esta razón fue usado como inóculo en la digestión anaerobia, para la producción del biofertilizante. Con los resultados de los análisis del laboratorio realizados en el INIAP, se comprobó la existencia de los aminoácidos libres en el producto final.

La hidrólisis de proteína de la *Spirulina platensis*, también se dio en los ensayos marcados como testigo, que no tenían ningún tipo de inóculo, esto debido a que la spirulina usada no se encontraba totalmente estéril, y los microorganismos presentes en el ambiente también contribuyeron a la hidrólisis de las ficobiliproteínas. En estos ensayos el cambio de coloración se dio en un mayor tiempo que los ensayos que emplearon inóculos bacterianos como estiércol de vaca, agua residual y bacterias ácido lácticas.

El biorreactor a escala piloto, está construido con un sistema de calentamiento, con resistencia tipo alambre, envuelta en espagueti de fibra de vidrio. Un sistema de agitación mecánica continua, con un mecanismo moto reductor de velocidad empleando un sistema de poleas, que además incluye un rodete en forma de hélice marina.

Durante la digestión anaerobia, parámetros como la temperatura y el pH, deben ser controlados, ya que descensos bruscos en la temperatura, pueden producir cambios importantes en el comportamiento del pH. Durante al inicio del funcionamiento del biorreactor piloto, el medio tenía un pH de 7.45, luego de los 9 días de etapa hidrolítica el pH tuvo un descenso a 6.94. La temperatura se mantuvo entre los 40 y 41 °C.

El producto final obtenido al final del funcionamiento del biorreactor piloto, tiene una concentración de nitrógeno asimilable de 3.23 g/L, sin estabilización con cal. El producto final estabilizado tiene una concentración de nitrógeno asimilable de 3.00 g/L. Esto sucede debido a que, hay grupos libres amino que reaccionan con la cal y se evaporan al ambiente por su alta volatilidad.

Como resultado del dimensionamiento del Biorreactor a escala industrial, se tiene un tanque de acero inoxidable con capacidad de 500 litros y volumen funcional de 375 litros. La concentración de *Spirulina platensis* utilizada para la elaboración del biofertilizante será de 60 g/L, equivalente a 30 Kg de residuo ultrafino disponible. Contará con una hélice marina para agitación mecánica continua, proporcionada por un motor de ½ Hp conectado a un variador de velocidad electrónico. En cuanto al sistema de calentamiento, se emplearán 8 resistencias planas, y lana de vidrio como material aislante, con un espesor de 50,00 mm. Las conexiones eléctricas del biorreactor a escala industrial, deben incluir un contactor y un relé de sobrecarga térmico.

Con un espesor de 50,00 mm de lana de vidrio, se obtiene una pérdida de calor de 45,73 W, esto implica que al reducir el calor perdido, gracias al uso de un material aislante, mejoraremos la eficiencia del sistema, y lo más importante se producirá un ahorro en el consumo de energía eléctrica, ya que el material aislante ayudará a mantener más estable la temperatura.

El diseño del biorreactor a escala industrial, también incluye tuberías para la evacuación tanto del producto final como de los lodos residuales, para estos últimos se recomienda usar bomba neumática, para facilitar la extracción de mismos. Los materiales incluidos en este diseño dependieron de la existencia y disponibilidad de los mismos en la empresa Andesspirulina, como un método para la disminución de costos en la construcción de este sistema.

El dimensionamiento del tanque para un bioproceso, depende de la cantidad de materia prima disponible para la elaboración del producto. En la empresa Andesspirulina se producen diariamente 8,5 Kg residuo ultra fino, a la semana son 42,5 Kg. El 30% se destina a la venta para el uso en la elaboración de productos alimenticios o para la acuicultura. Dejando aproximadamente 30 Kg disponibles para la elaboración del biofertilizante a base de aminoácidos.

En los bioprocesos es importante el uso de material no corrosivo, la alternativa más recomendable, es el acero inoxidable con un grosor de 3 mm, ya que facilita la construcción, mejora la transferencia de calor y evita el uso de recubrimientos anticorrosivos que necesitan mantenimiento a corto plazo.

Al emplear la digestión anaerobia, para la producción del biofertilizante, es importante la estabilización del mismo, ya que debemos asegurar la eliminación de microorganismos patógenos que puedan causar daños a los cultivos en donde se use el producto. La estabilización con cal constituye una alternativa no adecuada, debido a la elevación del pH por sobre el valor de 12, por esta razón la mejor opción es una estabilización con incremento de temperatura a 72°C, temperatura a la cual se producen daños en el metabolismo microbiano, asegurando la destrucción de los mismos y un producto final inocuo.

4.2. Recomendaciones

- Realizar pruebas con el biofertilizante sobre cultivos, para constatar los beneficios que puede ocasionar en los tejidos vegetales
- Para la construcción de biorreactores a nivel industrial, se recomienda formar un grupo multidisciplinario, donde se combinen las áreas biotecnológicas, química, mecánica y eléctrica.
- Se recomienda subir un 25% más el precio del producto final, ya que se debe tomar en cuenta que no existe un producto similar con los mismos beneficios y características en el país.

CAPITULO 5: BIBLIOGRAFIA

- Aquiahuatl, M., Pérez, M. (2004). Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General. México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Bastone, D., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S., Pavlostathis, S., Rozzi, A., Sanders, W., Siegristh, H y Vavilin, V. (2002). Modelo de Digestor Anaerobio. IWA.
- Belay, A. (1997). Mass culture of Spirulina outdoors. The Earthrise farms experience. London: Taylor & Francis.
- Bermudez, J., Canovas, M., Howell, J., Iborra, J., Manson, A. (1988). La Digestión Anaerobia. Universidad de Murcia. Secretariado de Publicaciones. España.
- Betancourt, L. (1997). Producción, purificación y caracterización de la ficocianina de Synechococcus sp. IO9201 aisladas en aguas de Cuba. Tesis de doctorado. Universidad de Coruña. Departamento de Biología Celular y Molecular. Cuba.
- Campos, E. (2001). Optimización de la Digestión Anaerobia de Purines de Cerdo Mediante Codigestión con Residuos Orgánicos de la Industria Agroalimentaria. Tesis de doctorado. Departamento de Medio Ambiente. Universidad de Lleida. España.
- Carr, N. y Whitton, B. (1982). The biology of Cyanobacteria. Reino Unido: Blackwell Science Ltd.

- CASAFE. (2005). Fertilizantes. Argentina: <http://www.casafe.org>
- Chronakis, I. (2001). Gelation of edible blue-green algae protein isolates (Spirulina platensis): Thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. Bioresour Technol.
- Ciferri, O. (1983). Spirulina, the Edible Microorganism. Microbiological Reviews. Departament of Genetics and Microbiology, University of Pavia. Italia.
- Cubero, D., Vieira, M., (Julio, 1999). Abonos orgánicos y fertilizantes químicos ¿Son compatibles con la agricultura?. XI Congreso Nacional Agronómico /III Congreso Nacional de Suelos.
- Darley, W. (1982). Algal Biology: A Physiological Approach. Blackwell Scientifican Publication.
- Diario Hoy. (2006, Mayo 23). La actividad agrícola, con otra pata de apoyo. Noticias: Hoy.com.
- Dorán, P. (1995). Principios de ingeniería de los bioprocesos. España: Editorial ACRIBIA, S.A.
- Gantt, E. (1981). Phycobilisomes. Ann Rev. PlantPhysiol.
- Gershwin, M. & Belay, A. (2008). Spirulina in Human Nutrition and Health. Estados Unidos: Taylor&francis.
- Glazer, A. (1981). Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. The Biochemistry of Plants, Vol 8. Estados Unidos: Academic Press Inc.
- Gómez, R. (2009, septiembre 14). Microalgas para una nueva agricultura más respetuosa con el medio ambiente. Noticias. Ciencia Directa.com

- Grossman, A., Lemaux, P. & Conley, P. (1986). Regulated synthesis of phycobilisome components. Photochem Photobiol
- Guañua, C. (2010). Fertilizantes para todo tipo de cultivos. Agroquímicos del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Jain, S., Lala, A., Bathia, S. y Kudchadker, A. (1992). Modelo de hidrólisis controlada en la digestión anaerobia. Revista de Tecnología Química y Biotecnología.
- IDAE, Instituto para la diversificación y ahorro de energía (2007). Guía Técnica: Diseño y cálculo del aislamiento térmico de conducciones, aparatos y equipos. Madrid. España.
- Iglesias, M. (2010, Noviembre 14). Biofertilizantes, tesoro escondido. Revista fusión: España. <http://www.revistafusion.com>
- Linsely, R., Franzini, J., Freyberg, D., Tchobonolous, G. (1992). Water-Resource Engineering, 4th edition. Estados Unidos: Macgraw-Hill.
- Mahmoud, N., Zeeman, G., Gijzen, H. y Lettinga, G. (2003). Solid removal in upflow anaerobic reactors, a review. Bioresource Technology. V. 90. Agosto.
- Marti, N. (2006). Phosphorus Precipitation in anaerobic digestion process. Dissertation. Boca Raton, Estados Unidos.
- Martinez, L. (2010). Aislamiento e Identificación de Microorganismos con Actividad Enzimática Hidrolítica Extracelular y su uso Potencial en el Proceso de Compostaje. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Programa de Maestría en Biomedicina y Biotecnología Molecular. México.

- Morte, A., Gutierrez, A., Dreyer, B., Torrente, P. y Honrubia, M. (2004, Junio 1-2) Biofertilizantes de última generación. Feria de calidad ambiental y Ecoeficiencia. Murcia, España.
- Oropeza, N. (2006). Lodos Residuales: estabilización y manejo. Departamento de Ingeniería. Universidad de Quintana Roo. México.
- Paoletti, C. Vincenzini, M. Bocci, F. y Materassi, R. (1980). Perspectiva del cultivo de Spirulina en Italia. Roma: Consejo Nacional de Ricerche.
- Peticari, A. (2006). Uso de biofertilizantes, Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. Buenos Aires, Argentina.
- Porrier, P. (2005). Hidrólisis y acidificación psicrófila de moléculas complejas en sistemas anaerobios. Tesis de Doctorado. Universidad Santiago de Compostela. España
- Puyfoulhoux, G., Rouanet, J., Besancon, P., Baroux, B., Baccou, J. (2001). Iron availability form iron-fortified Spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. J Agric Food Chem.
- Retamal, C., Heim, A., Carballa, M., Vidal, G., Ruiz, G., Chamy, R. (2004). Desarrollo de un modelo explícito en temperatura para la etapa hidrolítica de la digestión anaerobia. Universidad Católica de Valparaiso, Chile.
- Richmond, A. (2004). Handbook of Micoalgal Culture, Biotechnology and Applied Phycology. Reino Unido: Blacwell Science Ltd.
- Rivera, A. (2006). Análisis de alternativas para el manejo de los residuos sólidos de una cervecería. Tesis de grado. Escuela Politécnica Nacional. Quito. Ecuador.

- Rojas, G. (2007). Estructuras de acero. Escuela de Ingeniería en Construcción. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Sánchez, M., Bernal, J., Rozo, C., Rodríguez, I., (2008). Spirulina (Arthrospira): an edible microorganism. A review. Universitas Scientiarum. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. http://www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum/vol8n1/J_bernal.htm
- Salerno, M., Nurdogan, Y., Lundquist, T. (2009). Biogas Production From Algae Biomass Harvested at Wastewater Treatment Ponds. Bioenergy Engineering Conference, Sponsored by ASABE. Seattle, United States.
- Valentinuzzi, R. (2002). Diseño de procesos en digestión anaerobia. Ingeniería de tratamiento de aguas residuales. Argentina. Estructplan.com
- Vonshak, A. (1996). Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology. Israel: Taylor&Francis.
- Vincenzini, M., Paoletti, C., Bocci, F. & Materassi, R. (1980). Composición bioquímica general de la biomasa de Spirulina platensis y S. máxima. Perspectiva del cultivo de Spirulina en Italia. Consejo Nacional de Recherche, Roma.

Programas:

- SolidWorks (2009). Walthman, MA: Dassault Systemes
- Visimix Turbulent SV 2KX. (2010). Jerusalem: Visimix Ltd.