



Prácticas y herramientas de sostenibilidad



Prácticas y herramientas de sostenibilidad



Tecnológico
de Antioquia
Institución Universitaria
VIGILADA MINEDUCACIÓN



CITIMA
Grupo de Investigación en
Tecnologías de Información y Datos - Antioquia

Álvarez Arboleda, Carlos Augusto; Franco Orozco, Bárbara; Salcedo Hurtado, Kellys Nallith, Enrique Soto, Dario

Prácticas y herramientas de sostenibilidad / Carlos Augusto Álvarez Arboleda, Bárbara Franco Orozco, Kellys Nallith Salcedo Hurtado, Dario Enrique Soto compiladores.

Primera edición. Medellín: Sello Editorial Tecnológico de Antioquia Institución Universitaria, 2021
234 páginas

ISBN: versión impresa: 978-958-8628-69-1

ISBN: versión digital: 978-958-8628-70-7

Desarrollo sostenible. Mal sigatoca del platanero. Cascarilla de arroz. Tecnología del carbón. Carbonato cálcico. Cianobacterias. Hongos. Medio ambiente. Innovaciones tecnológicas. Conservación de la diversidad biológica.

CDD: 333.72

Catalogación en la publicación Biblioteca Humberto Saldarriaga Carmona - TDeA

Prácticas y herramientas de sostenibilidad

ISBN impreso: 978-958-8628-69-1

ISBN digital: 978-958-8628-70-7

Compiladores:

Carlos Augusto Álvarez Arboleda

Bárbara Franco Orozco

Kellys Nallith Salcedo Hurtado

Dario Enrique Soto

© Sello Editorial Tecnológico de Antioquia, 2021

Corrección de estilo, diseño, diagramación e impresión:

Divegráficas S. A. S.

© Sello Editorial Tecnológico de Antioquia

Calle 78b # 72A - 220

(+604) 444 37 00

Medellín – Colombia

Los capítulos publicados en este libro incorporan contenidos derivados de procesos de investigación y estos no representan, necesariamente, los criterios institucionales del Tecnológico de Antioquia. Los contenidos son responsabilidad exclusiva de sus autores. Obra protegida por el derecho de autor. Queda estrictamente prohibida su reproducción, comunicación, divulgación, copia, distribución, comercialización, transformación, puesta a disposición o transferencia en cualquier forma y por cualquier medio, sin la autorización previa, expresa y por escrito de su titular. El incumplimiento de la mencionada restricción podrá dar lugar a las acciones civiles y penales correspondientes.

© 2021 Todos los derechos de autor reservados.

• Contenido •

Prefacio.....	5
Propuesta metodológica preliminar para la detección de Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>) en cultivos de musáceas mediante vehículos aéreos no tripulados (UAV)....	7
Valorización de cascarilla de arroz en diferentes sectores industriales.....	45
Biocarbón derivado de pellets de <i>Pinus patula</i> para la enmienda de suelos degradados.....	113
Bioprecipitación de carbonato de calcio mediada por aislados nativos de <i>Bacillus spp.</i>	135
Recurrencia de toxinas cianobacterianas en cuerpos de agua eutrofizados.....	153
Comparativo del número de propágulos de hongos micorrízico arbusculares entre un inóculo crudo multiespórico y el suelo de un monocultivo de <i>Allium fistulosum</i>	183
Potencial biotecnológico de la miel de café como sustrato en bioprocesos usando gránulos de kéfir de agua.....	207

• Prefacio •

En la actualidad, la sostenibilidad ambiental se orienta en la capacidad de poder mantener a lo largo del tiempo los aspectos biológicos, tanto a nivel productivo como en lo que atañe a la diversidad; de esta manera, se ocupa de la preservación de los diferentes recursos naturales, fomentando una responsabilidad consciente sobre lo ecológico, pero sin olvidar que al mismo tiempo se debe crecer en el desarrollo humano, cuidando el ambiente donde se vive.

La Facultad de Ingeniería y los grupos de investigación GITIMA e INTEGRA del Tecnológico de Antioquia – Institución Universitaria, conscientes de las múltiples herramientas y prácticas implementadas por diferentes investigadores en torno a la sostenibilidad, y trabajadas desde las ciencias ambientales y agrícolas, compilan resultados de investigaciones de la comunidad académica del país, exponiendo diferentes enfoques y metodologías, a través de la edición del libro denominado: *Prácticas y herramientas para la sostenibilidad como aportes a las ciencias ambientales y agrícolas*.

Esta publicación presenta siete capítulos orientados hacia la comunidad académica en general, a investigadores, estudiantes, docentes, grupos



de investigación, semilleros, entre otros; con temáticas que aportan sin duda a los grandes retos con los que nos enfrentamos actualmente en la solución de los diferentes desafíos ambientales y agrícolas. El libro está conformado por capítulos inéditos, resultados de distintas investigaciones, cada uno de ellos estructurado de la siguiente manera: contextualización de la temática, materiales y metodología implementada, resultados y análisis de los mismos, para luego terminar con unas conclusiones y posibles recomendaciones.

El presente libro ofrece un espacio para la discusión, transferencia y apropiación del conocimiento en contextos de investigación asociados a programas académicos en niveles de posgrado, profesional, tecnológico y técnico de las diferentes áreas ambientales y agrícolas que ofertan las Instituciones de Educación Superior (IES).

Esperamos que los diferentes resultados ofrecidos en esta edición aporten significativamente y estimulen nuevos proyectos de investigación en las diversas IES del país.

Carlos Augusto Álvarez Arboleda
Bárbara Franco Orozco
Kellys Nallith Salcedo Hurtado
Dario Enrique Soto

Compiladores



Propuesta metodológica preliminar para la detección de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en cultivos de musáceas mediante vehículos aéreos no tripulados (UAV)

1. INTRODUCCIÓN

En la última década, se ha generado una revolución en la ciberagricultura, conocida como Agricultura 4.0, donde el *big data*, la geomática, el mundo ciberfísico, el internet de las cosas, la robotización y la inteligencia artificial son componentes esenciales. Uno de sus potenciales es el acceso a la información que permite optimizar el uso de los recursos disponibles, los servicios de asesoramiento, así como los procesos de toma de decisiones [1].

La implementación de esta tecnología cobra importancia en cultivos extensivos, donde se requiere monitorear de forma ágil las condiciones de salud del cultivo y

Marulanda Tobón Alejandro.

Escuela de Ciencias,
Departamento de Ciencias Físicas,
Universidad EAFIT
Carrera 49 N° 7 Sur-50,
Medellín, Colombia.
amarula2@eafit.edu.co

Lorduy Hernández Sara.

Escuela de Ciencias,
Departamento de Ciencias Físicas,
Universidad EAFIT
Carrera 49 N° 7 Sur-50,
Medellín, Colombia.

**Isabel Osorio Mosquera
Adriana**

Facultad de Ingeniería, Tecnológico
de Antioquia – Institución
Universitaria,
Calle 78b, No. 72A-220,
Medellín, Colombia.
aiosorio@tdea.edu.co



las posibles deficiencias en algún mineral o nutriente, con el fin de afinar las prácticas agrícolas para incrementar la eficiencia del proceso productivo y la calidad final del producto [2].

El cultivo de las musáceas, en especial el cultivo de banano, constituye uno de los principales cultivos en la producción y el comercio agrícola mundial, siendo América Latina y el Caribe, la mayor región exportadora del mundo [3]. En Colombia, el cultivo de musáceas es el cultivo frutal más sembrado en el país, hace parte de la canasta familiar y es uno de los más importantes para la seguridad alimentaria [4]. De acuerdo con la FAO, en 2018, Colombia ocupó el primer lugar en área cosechada de plátano en América y el Caribe, y el tercer lugar en área cosechada de banano después de Brasil y Ecuador [5].

Una de las enfermedades que representa la principal limitante en la producción de las musáceas, es la *Sigatoka negra*, una afectación generada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* que estropea el área foliar fotosintética de la planta y en consecuencia ocasiona una disminución de peso en los racimos y los frutos. En banano, la afectación puede llegar a disminuir el 18% del total de la producción, mientras que en plátano consigue ser el 13% [6] [7].

La *Sigatoka negra* se manifiesta esencialmente en la superficie foliar de las plantas por medio de manchas o lesiones, la cual inicia como pequeñas pizcas o estrías, que se convierten en manchas de mayor tamaño, en algunos casos de carácter necrótico [7]. El comportamiento de los síntomas de la enfermedad en las plantas de musáceas, permite considerar el uso de tecnología basada en el sensado remoto para su identificación y monitoreo. Esta tecnología se basa en la obtención de información sobre un objeto, área o fenómeno sin estar en contacto con él [8].

Dentro de este campo se destaca el uso de la robótica móvil, específicamente de vehículos aéreos no tripulados (UAV). Estos sistemas consisten en una cámara digital acoplada a una plataforma



aérea y un sistema de navegación, por medio del cual se programan y controlan vuelos que permiten la obtención de imágenes aéreas de un área específica [9].

En la agricultura, los UAV tiene un gran potencial en comparación con las plataformas satelitales, ya que: *i.* Trabajan con total autonomía y tienen poca sensibilidad a las perturbaciones de un fenómeno atmosféricos como es la nubosidad. *ii.* Pueden acoplar sensores con diferente rango espectral, lo que permite el análisis de diversos parámetros. *iii.* Generan imágenes con alta resolución espacial, con tamaño de pixel que abarca lecturas de centímetros a pocos milímetros [10].

Por lo anterior, el presente trabajo busca integrar el uso de los UAV y la visión por computador en productos cartográficos, con el objetivo de presentar una propuesta preliminar a pequeña escala, para la detección de la *Sigatoka negra*; para ello, se evaluará las consideraciones técnicas más relevantes del proceso y se obtendrá una ruta de acción para su aplicación.

2. METODOLOGÍA

La metodología de trabajo se basa en el esquema presentado en la Figura 1. El alcance del objetivo general se generó mediante el trabajo en primera instancia con el sensor óptico articulado a la plataforma aérea; posteriormente, se abordaron los planes de vuelo en el área de estudio y la caracterización del proceso de captura de muestras cuando la plataforma se encontraba en movimiento; finalmente, se realizó el procesamiento de imágenes acoplado a productos cartográficos, buscando con la última fase el mejor desempeño para la aplicación en cuestión.



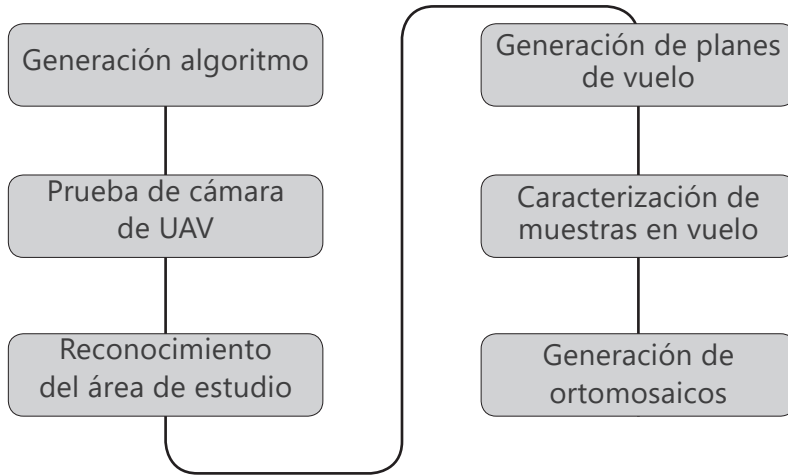


Fig. 1. Estructura metodológica del desarrollo del trabajo.

A. Generación de algoritmo

El desarrollo del sistema de procesamiento de imágenes para la detección de la *Sigatoka negra*, se implementó en MATLAB, haciendo uso del Vision System Toolbox y el Image Processing Toolbox. En la Figura 2 se plasma el diagrama de bloques que busca ilustrar el orden de las funciones y la secuencialidad del código. Las matrices de 3 dimensiones, que generan las imágenes por el estándar RGB, fueron procesadas con el fin de llevar el contenido a una escala de grises y posteriormente binarizar los datos, buscando con ello reconocer el contorno del área foliar. Posteriormente, se incrementó la intensidad de los productos resultantes de los pasos anteriores por medio de un aumento de la precisión, o lo que es homólogo a una conversión de los datos a escalares para la creación de una primera máscara. Luego, se convirtió la imagen al estándar de color HSV, con el cual se facilitó el procesamiento basado en intensidades y se definió el rango espectral a detectar. Dicho rango se concentró en los tonos cercanos al amarillo, mismos que permitieron identificar la afectación del hongo en las hojas. Se creó así una segunda máscara que funcionó como una capa



activa en tonos grisáceos y pasiva a las tonalidades seleccionadas como marcación de la enfermedad. Esta última máscara se apoyó en una de las técnicas de procesamiento digital de imágenes conocida como segmentación de imágenes, por medio del método del valor umbral multibanda, con el cual se definieron de forma manual los umbrales o cotas superiores e inferiores que se aplicaron a los componentes que conformaron el espacio de color HSV (siendo cada componente tratado como un canal independiente), con base en la respuesta obtenida en el histograma. Con el alcance de los pasos anteriores, se realizó el proceso de saturación entre la máscara y la imagen original; y con fines de mejorar la visualización, se realizó una nueva conversión al estándar original RGB.

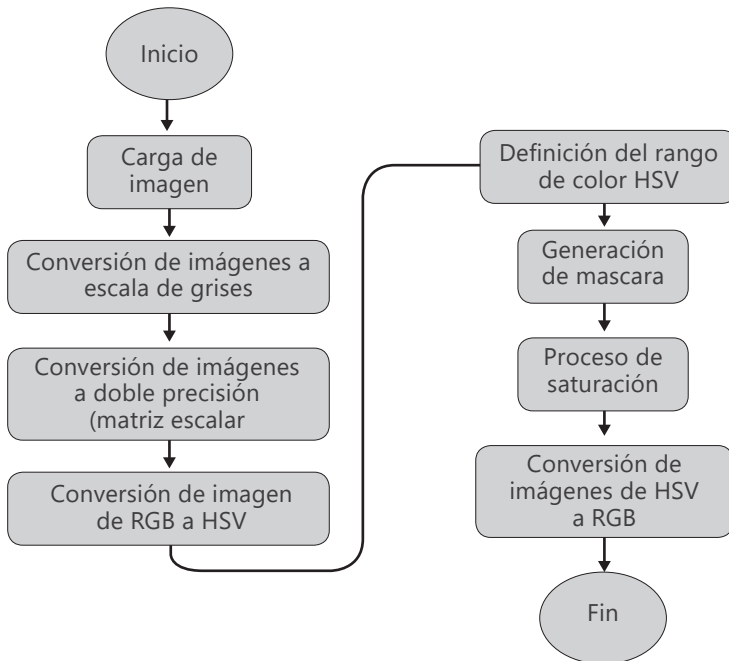


Fig. 2. Flujograma del algoritmo secuencial para el procesamiento de las imágenes.



B. Prueba de cámara del UAV

La plataforma aérea posee como sensor óptico una cámara digital RGB, la cual funciona en el rango espectral visible, acoplada al dispositivo por medio de un mecanismo de compensación de movimiento o suspensión cardán. Dado que el UAV disponible para el desarrollo del proyecto se trataba de un cuadricóptero de la compañía 3D Robotics con su modelo SOLO (Figura 3), fue necesario el uso de una cámara con las dimensiones y características técnicas como las fabricadas por la compañía GoPro. Se dispuso entonces del modelo GoPro Hero 4, el cual corresponde a una cámara deportiva con lente de gran angular, que se configura para su funcionamiento en el modo de captura invertida, la comunicación al UAV por medio del puerto HDMI micro y el campo de visión en su nivel medio. Se intentó disminuir con la última configuración, las aberraciones presentes en las lentes, especialmente en las que se producen con una curvatura considerable, tal y como se evidencia en los objetivos montados en las cámaras deportivas, causando por ejemplo una deformación en la imagen capturada conocida como "ojo de pez". Por las mismas aberraciones presentes en los elementos ópticos, fue indispensable realizar una calibración que permitió al momento del procesamiento de las imágenes, plantear estrategias de mitigación y ayudar al algoritmo seleccionado a hacer ajustes sobre las capturas. Para tal fin, se hizo uso de la herramienta Agisoft Lens del programa Agisoft PhotoScan.

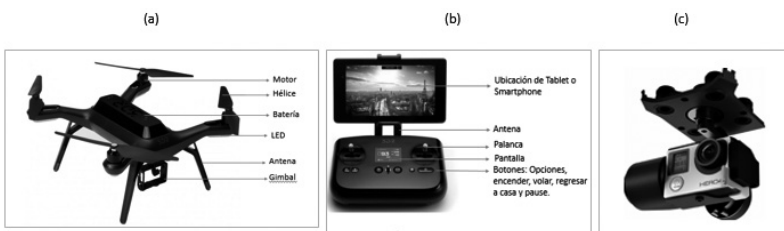


Fig.3. a) UAV Solo de 3D Robotics. b) Control del UAV. c) Sistema de compensación para la cámara GoPro.



Agisoft Lens permite seleccionar para la calibración, la proyección de un patrón tipo tablero de ajedrez en una pantalla, y contempla modelos paramétricos completos, incluyendo coeficientes de distorsión no lineales. Estima entonces los siguientes parámetros, utilizando el modelo de distorsión de Brown:

- Distancia focal: f_x y f_y .
- Principales coordenadas del punto: C_x y C_y .
- Coeficientes de distorsión radial: K_1, K_2, K_3, P_1 y P_2 .

C. Reconocimiento del área de estudio

Los vuelos con UAV se desarrollaron en la sede de EAFIT Llanogrande, el cual se ubica en el municipio de Rionegro (Figura 5); el área total de monitoreo fue de 80.886 m². De acuerdo con los valores obtenidos en el estudio, la altitud de la zona varía entre 2150 msnm y 2200 msnm (Figura 4). Por otro lado, de acuerdo con los reportes del IDEAM [11], en el área de estudio la temperatura promedio varía entre 16°C y 20°C, su precipitación promedio anual se encuentra entre 2.000 mm y 2.500 mm, la humedad relativa anual promedio oscila entre el 75% y 80% y la velocidad del viento promedio anual a una altura de 80 m es de 5 m/s a 6 m/s.

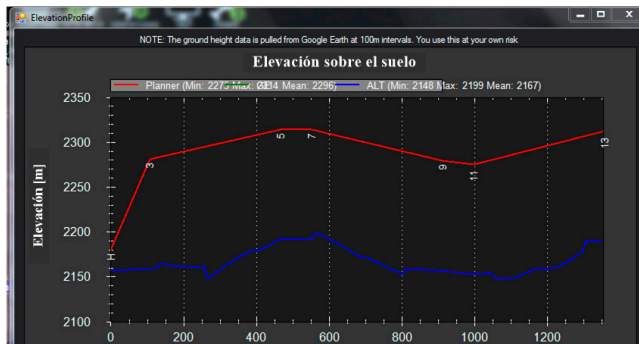


Fig. 4. Curvas de altura del área de estudio; en azul, altura absoluta; en rojo, altura relativa del UAV.



D. Generación de planes de vuelo

Para la aplicación en cuestión, normalmente se emplean vuelos asistidos con trayectorias generadas de forma semiautomática o totalmente automática. Dichas trayectorias consisten en una serie de ubicaciones geográficas o waypoints sobre la zona de estudio (que es demarcada con un polígono), permitiendo a través de algoritmos de optimización de trayectorias, la generación de la ruta idónea para la captura de las imágenes. Los waypoints indican el estado de elevación y velocidad de desplazamiento [12]; además, demarcan la ubicación de la aeronave gracias al sistema de posicionamiento global (GPS) integrado en la plataforma y lo llevan a cabo mediante la modificación del roll, el pitch y el yaw.

Las características del vuelo fueron controladas y ejecutadas por el piloto automático Pixhawk, el cual es un componente electrónico estándar de código abierto. Este control se encuentra habilitado para el modelo 3DR SOLO con el firmware de uso abierto APM:Copter, ahora denominada Ardupilot, lo que permitió generar un enlace con la aplicación de uso igualmente abierto Mission Planner.

Esta última aplicación es una estación de control de tierra que es útil para la configuración y el control de la dinámica del UAV. Permite además realizar la telemetría de la aeronave y registrar los valores con período de muestreo por defecto.



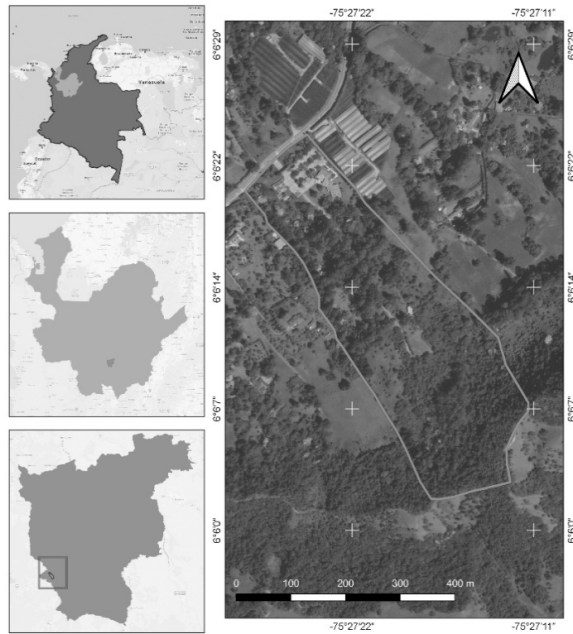


Fig. 5. Mapa de ubicación del campus universitario de EAFIT, sede Llanogrande.

Tanto la configuración como la medición del estado del vuelo, se alcanzan gracias a la conexión inalámbrica Wi-Fi de corto alcance que genera el radiocontrol del vehículo [13], y el protocolo de comunicación MavLink que enlaza a su vez el radiocontrol con la aeronave [14]. Se hizo uso de todo el sistema de comunicación con el que cuenta un UAV, el cual consiste en el enlace de control, el de telemetría y el de video.

E. Caracterización de muestras de vuelo

Las trayectorias de vuelo, que se calcularon de forma automática en el programa Mission Planner, dependieron del tipo de cámara usada y de varios aspectos fotogramétricos. Como ilustra la Figura 6 [9], las trayectorias obedecieron, sobre todo, al nivel de solapamiento entre las capturas de las imágenes.



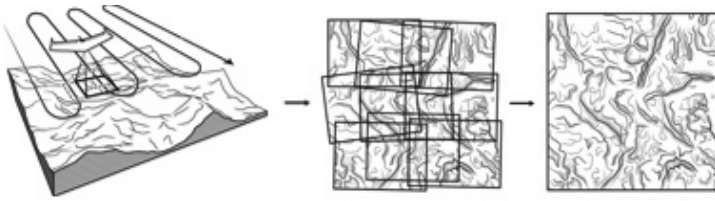


Fig. 6. Consideración del nivel de solapamiento de las imágenes para obtener el producto fotogramético [9].

Para la aplicación, se abordó la generación de fotografías aéreas con un ángulo de inclinación de tipo vertical, en las cuales el eje óptico está lo más cerca a la vertical, es decir, paralelo al plano horizontal y con ángulos menores a 5°. Conlleva tal decisión y las consideraciones anteriores a tener presente los parámetros más relevantes:

Distancia de muestreo (Ground Sampling Distance (GSD)): hace referencia a la distancia entre el centro de pixeles adyacentes medido en tierra. Debido a que un pixel es cuadrado, el área que cubrirá cada pixel se puede representar mediante la expresión 1. Si el valor GSD es muy alto, menor es la resolución espacial de la imagen, es decir, los detalles de la imagen serán menos visibles. La distancia de muestreo está relacionada con la altura de vuelo; a una altura constante, las imágenes no pueden tener el mismo valor GSD por la diferencia de elevación del terreno y los cambios en el ángulo de la cámara. Para la generación de productos fotogramétricos, generalmente se utiliza un valor promedio de GSD [15].

$$\text{Área} = \text{GSD} \times \text{GSD} \text{ [m/pixel}^2\text{]} \quad (1)$$

Altura de vuelo: la altura de vuelo depende de la distancia focal de la cámara, la distancia del sensor y del muestreo [16]. En la Figura 7 se observa un esquema, con las siguientes variables:

- Sw: Ancho del sensor [mm].
- f: Distancia focal [mm].



- h: Altura de vuelo [m].
- d: Distancia cobertura de una imagen, dada por la expresión 2.

$$d = \text{GSD [cm/pixel]} * \text{Ancho imagen [pixel]} \quad (2)$$

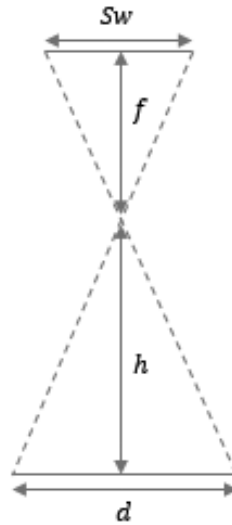


Fig. 7. Esquema geométrico para el cálculo de la altura de vuelo.

Tras aplicar una semejanza de triángulos entre y , se obtuvo la expresión 3, la cual calcula la altura del vuelo para generar una captura de las fotografías cumpliendo los requisitos de resolución por píxel.

$$h = (f * d) / S_w \quad (3)$$

Escala de fotografía: una fotografía aérea es la imagen reducida de un terreno, donde los objetos fotográficos aparecen reducidos en una proporción dada denominada escala [17].

La escala es una función representativa en que se asigna un producto fotogramétrico o mapa. Tal parámetro está dado por la relación entre



la distancia focal y la altura de vuelo como se recoge en la expresión 4. En el caso de trabajar con una altura absoluta, es necesario restar de valor arrojado la altura sobre el nivel del mar.

$$1/E=f/h \quad (4)$$

Solapamiento entre imágenes: las trayectorias de vuelo deben diseñarse para garantizar una cantidad suficiente de superposición fotográfica que permita un mejor procesamiento, es decir, los vuelos deben ser realizados de manera tal que todo punto del terreno figure por lo menos en dos fotografías adyacentes. Esto consiste en el área común que se tiene entre dos o más fotografías colindantes; y no existe una superposición estándar universal, ya que las cifras varían según la situación o aplicación [16].

El solapamiento se expresa en porcentaje y se divide en dos clases:

- Solapamiento lateral, el cual reside en el porcentaje de traslape entre dos fotografías de líneas de vuelo adyacentes.
- Solapamiento longitudinal, que consiste en el porcentaje de traslape entre dos fotografías sucesivas en dirección de la línea de vuelo.

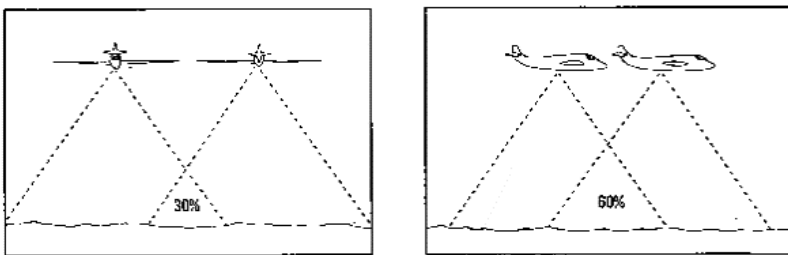


Fig. 8. Solapamiento lateral (izq.) y solapamiento longitudinal (der.) [18].



Distancia entre fotografías: también llamada base o avance útil sobre el terreno; consiste en la distancia que existe entre dos puntos de toma de dos fotografías consecutivas y se calcula como la relación de superposición longitudinal de las vistas. Su valor se obtiene por medio de la expresión 5 [17], donde:

- u: Porcentaje de solapamiento longitudinal.
- l: Longitud del largo de la fotografía.

$$B=l*(1-u/100) \quad (5)$$

Distancia entre líneas de vuelo: se trata de la distancia de separación entre líneas de vuelo en función de la superposición lateral. Se puede calcular por medio de la expresión 7 [17], en la cual:

- v: Porcentaje de solapamiento lateral.
- l: Longitud del ancho de la fotografía.

$$A=l*(1-v/100) \quad (7)$$

Intervalo de tiempo entre fotografías: es el tiempo que debe transcurrir entre la toma de una fotografía y la siguiente, para que se produzca el solapamiento longitudinal requerido. Teniendo en cuenta que la velocidad es la razón de cambio en la posición de un objeto en un determinado tiempo, el intervalo de tiempo entre toma de fotografías se podría calcular por medio de la expresión 8 [17], donde:

- V: Corresponde a la velocidad de vuelo [m/s].
- B: Cálculo de la distancia entre las fotografías.

$$I=B/V \quad (8)$$



Número de fotografías por línea de vuelo (NFLV): el número de fotografías por línea de vuelo se obtiene al dividir la longitud de esta entre la base (B), como se observa en la expresión 9. Generalmente, al resultado se le suma 4 fotografías que se toman al inicio y al final del recorrido para cerciorarse de que la cámara tenga un correcto funcionamiento [17]:

$$\text{NFLV} = (\text{Longitud de la línea}) / B + 4 \quad (9)$$

Número de líneas de vuelo (NLV): esta es la cantidad necesarias para cubrir el área de interés, teniendo presente el correspondiente solapamiento lateral. Regularmente, se agrega una línea adicional con el fin de compensar un posible error, como se muestra en la expresión 10 [17]:

$$\text{NNLV} = (\text{Ancho del terreno}) / A + 1 \quad (10)$$

Número total de fotografías (NTF): es el producto del número de fotografías por líneas de vuelo y el número de líneas de vuelo, donde finalmente se obtiene el número de imágenes de todo el recorrido del UAV necesarias para cubrir el área de interés, tal y como se observa en la expresión 11 [17]:

$$\text{NNTF} = \text{NFLV} * \text{NLV} \quad (11)$$

Tiempo de vuelo (NTF): se calcula teniendo en cuenta el intervalo de tiempo entre fotografías (I) y el número total de fotografías (NTF). Este es el tiempo que se tarda el UAV en realizar el plan de vuelo sobre la zona de interés y se obtiene por medio de la expresión 12 [17]:

$$t = I * \text{NTF} \quad (12)$$

Para la obtención de los parámetros de una aplicación, es importante generar un diseño de experimentos, el cual busque definir los porcentajes de solapamiento más adecuados para las aplicaciones



agrícolas, incorporando la altura y la velocidad de la aeronave como las variables. Es preciso contemplar las características técnicas del UAV (Tabla 1), las condiciones climáticas, del tiempo y demás aspectos relativos al espacio de estudio. Sin embargo, algunas de ellas son de carácter estático y se estiman al inicio del estudio. Las condiciones altamente dinámicas y externas (por ejemplo, la meteorología del momento) son precisamente evaluadas en cada vuelo como parte del protocolo de seguridad para realizar el despegue. Por lo anterior, son descartas del diseño de experimentos las condiciones estáticas y altamente variables.

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DEL UAV 3DR SOLO [19]

Tiempo de vuelo estimado	Hasta 25 minutos
Altura máxima	100 m sobre el nivel del suelo
Alcance	8 Km
Capacidad de carga útil	450 g
Velocidad crucero	8 m/s
Velocidad máxima	15 m/s
Limitación de la velocidad del viento	11 m/s
Temperatura de funcionamiento	0° C – 45° C

El diseño se apoyó en la plataforma Mission Planner para su realización, pues proporciona el valor de los principales parámetros expuestos. Todos los experimentos se plantearon bajo 2 variables: altura de vuelo y Solapamiento entre imágenes. Para la primera se definieron 5 alturas (60 m, 70 m, 80 m, 90 m y 100 m); en cuanto a la segunda, se consideraron 3 porcentajes diferentes, por recomendaciones encontradas en la literatura [9] (80% longitudinal - 70% lateral, 75% longitudinal - 60% lateral y 60% longitudinal - 30% lateral).

F. Generación de ortoimágenes

El modelo 3DR SOLO hace uso del sistema GPS para la navegación, pero carece de la característica técnica de comunicación con la cámara



para incorporar en el archivo de metadatos, de cada imagen capturada, el dato con la ubicación geoespacial. Es necesario, por lo tanto, en el momento del procesamiento de las imágenes con las cuales se creará el ortomosaico, llevar a cabo algunas acciones manuales para facilitar a los algoritmos el reconocimiento de las imágenes adyacentes. Dichas acciones se basan en la ubicación en las diferentes imágenes capturadas, de los puntos de interés o puntos de control en suelo (GCP) seleccionados o establecidos en el área de interés.

Se eligieron como GCP algunas características del espacio de estudio, y se extendieron además ocho marcas con forma cuadrada de 1 m de lado y de color amarillo en lugares despejados. El color de las marcas correspondió esencialmente a que el área de estudio tiene en la mayor parte de su extensión, una cobertura boscosa densa con algunos claros en ella. Por su parte, la dimensión permite evaluar la resolución de las imágenes con objetos conocidos, y verificar las variaciones de altura de vuelo que ejecuta la aeronave, a propósito de mantener una altura de captura con los desniveles presentes en el terreno. Se destaca que las características seleccionadas como GCP y las mismas marcas, sean geolocalizadas por medio de un GPS de mano Garmin 64s.

Con las imágenes adquiridas, fue posible componer un ortomosaico, este se genera gracias a las áreas de traslape entre las tomas, lo que permitió la unión o combinación en una sola imagen para ampliar el rango de visión de la escena. Aunque el propósito es crear y trabajar sobre un producto fotogramétrico, el cual se genera al rectificar en un solo plano y agregar la geolocalización de todos los píxeles que componen la imagen resultante, se procura la obtención de la ortoimagen para descartar posibles sub-zonas mal muestreadas del área de interés. Microsoft ICE fue ejecutado para desarrollar los ortomosaicos, pues funciona por medio de la generación de panoramas de alta resolución a partir de la combinación de un conjunto de fotografías superpuestas; las mismas que fueron capturadas de una escena muestreada con una sola cámara desde diferentes posiciones y ángulos. Microsoft ICE implementa técnicas como el stitching y el



matching, las cuales permiten crear tales panorámicas sin necesidad de información sobre la ubicación o geolocalización de las propias imágenes, sino identificando determinados objetos o características en una imagen; y a partir de ello calculan un valor que represente el grado de similitud entre dos imágenes [20].

En la ortoimagen, por su parte, las fotografías individuales fueron rectificadas a partir de modelos de elevación, eliminando la distorsión asociada al relieve. Este proceso consistió en proyectar cada pixel de la imagen sobre el modelo de elevación para determinar el valor de altura, el cual es re proyectado sobre la imagen. La proyección y la reproyección de los pixeles de la imagen se realizaron con las ecuaciones de colinealidad que finalmente son rectificadas y unidas formando un mosaico [21]. Se obtuvo de esta forma una composición georreferenciada, con una escala específica y un sistema de proyección uniforme. Por medio de ejercicios de proyección ortogonal, es plausible crear una imagen totalmente referenciada del terreno, lo que permite tomar distancias y longitudes reales del espacio de interés [22].

Se utilizó para el proceso de composición de las ortoimágenes, el programa Agisoft PhotoScan: aplicación que proporciona resultados de hasta 3 cm con fotografías aéreas, y 1 mm con fotografías de objetivos cercanos. El trabajo con Agisoft inició con la alineación de fotografías, buscando con ello la posición y orientación de cada imagen con algoritmos de correspondencia y generando una nube de puntos. Luego se procedió con la señalización de los GCP en las diferentes imágenes, y seguidamente se habilitó la opción de realizar una nube de más densidad de puntos. Tras un resultado satisfactorio, se continuó con el proceso de generación de mallado y textura, lo que arrojó un modelo de superficies de relieve y terreno con una mejor calidad visual. Finalmente, se generó el modelo de elevación digital que es de gran utilidad en diversas aplicaciones.



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la sección de resultados, se acogió el orden propuesto en el apartado de metodología, asumiendo además títulos semejantes como opción de organización de la información.

A. Pruebas del algoritmo para la detección de la Sigatoka negra

Para la prueba y generación de resultados sobre el funcionamiento del algoritmo de detección de manchas causadas por la Sigatoka negra, se hizo uso de algunos ejemplares de banano inoculados en laboratorio con el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, los cuales se desarrollaron bajo invernadero. Se ubicaron algunas plantas en un campo al aire libre, y se realizó un sobrevuelo con el UAV a 5 m de altura (Figura 9), el cual debía cumplir con unas trayectorias que permitan un solapamiento longitudinal del 80%, y uno lateral del 70%. Algunas de las etapas de procesamiento del algoritmo se observan en la Figura 10, en donde se destaca en la etapa de máscara, como aparecen las formas en color blanco que se relacionan con los espectros visibles, en donde se manifiesta la afectación.

Se identificó la enfermedad sobre las hojas de las plantas de banano como se muestra en la Figura 11. Se observan las manchas de color con tonalidades amarillas, lo que corresponde a la manifestación de la patología en el área foliar. Con ayuda del procesamiento de imágenes se logró resaltar los colores de las hojas infectadas y homogenizar el resto de la imagen a una escala de grises.





Fig. 9. Disposición de los ejemplares de banana inoculados para la prueba del algoritmo de detección.

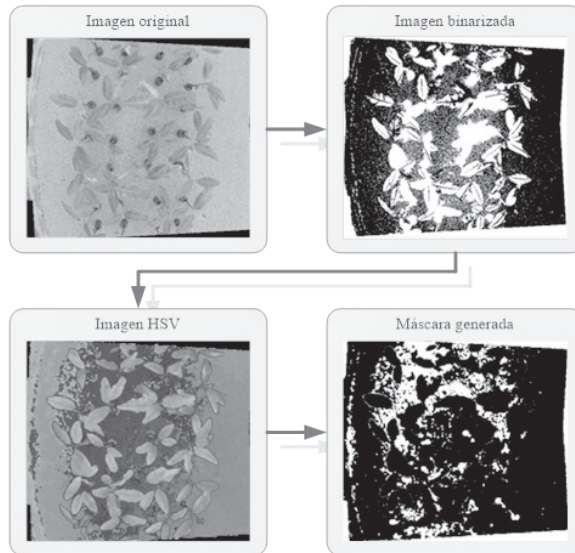


Fig. 10. Procesamiento de la composición con el algoritmo implementado.



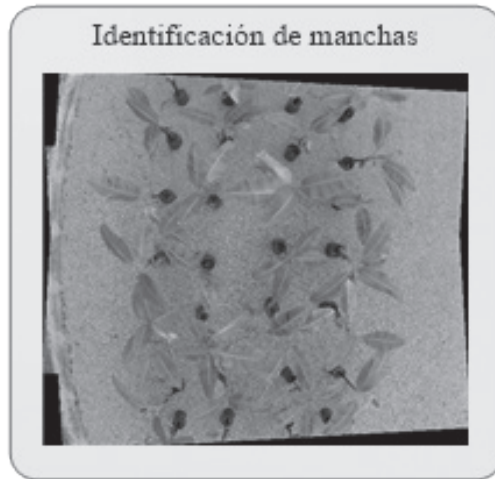


Fig. 11. Contraste de zona de afectación con su color original, respecto a un fondo en escala de grises.

B. Disposiciones de los planes de vuelo

En primera instancia se realizó un análisis de la velocidad con la cual se movilizaría la aeronave. Se observó que establecer dicha variable entre 0 y 5 m/s conlleva a un mayor consumo de tiempo para que el UAV finalizara la misión, proporcional al consumo de la carga de la batería. Por otro parte, considerar velocidades entre 15 y 20 m/s, genera que el UAV tarde menos en realizar el recorrido, pero las imágenes son muestreadas con distorsión, pues el cardán compensa la posición del eje óptico frente a la del vehículo, pero no se tiene el tiempo suficiente para una correcta obturación del sensor. Por lo tanto, se establece que la velocidad óptima corresponde a 10 m/s.

Con el diseño de experimentos se varió tanto la altura de vuelo como el porcentaje de solapamiento de las imágenes, por lo cual se crearon diferentes planes de vuelo, uno por cada experimento. El resultado de una de las misiones programadas en Mission Planner sobre la zona de estudio se observa en la Figura 12. Se estableció para dicha experiencia una altura de vuelo relativa de 90 m, un solapamiento longitudinal del



80% y uno lateral del 70%. Se incorporaron además a la aplicación, los parámetros obtenidos de la calibración de la cámara digital con el fin de precisar aún más el cálculo de la trayectoria.

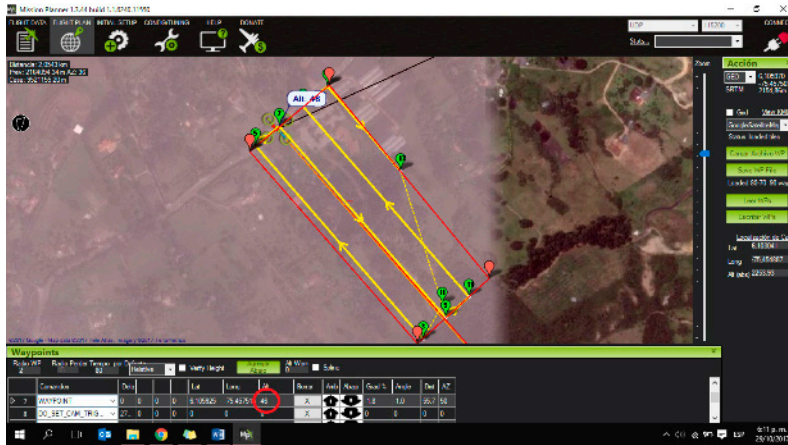


Fig. 12. Plan de vuelo sobre el polígono establecido en color rojo a una altura de 90 m.

Se obtuvieron las gráficas de elevación de la aeronave respecto al suelo, similares a las presentadas en la Figura 4. Además, se hizo un análisis sobre *waypoints* aleatorios, pues al momento de las pruebas no se generaron los archivos con la telemetría de cada misión. El resultado arrojó que existe una desviación del 4% del valor deseado, siendo este valor satisfactorio, pues se destaca que a la altura en la que se realizó la experiencia, la densidad del aire es considerable, ofreciendo una mayor resistencia a las hélices del vehículo. Así mismo, las condiciones del tiempo intervinieron en las pruebas, presentando algunos vientos de costado que dificultaron en algún grado la estabilidad y el alcance de las referencias establecidas para la navegación.

En cuanto al análisis de la estabilidad de la velocidad de vuelo, se obtuvo al igual que la altura, algunos puntos de muestra y se realizó una comparación. En la Figura 13, se observa del buen seguimiento de



la aeronave en la trayectoria programada (línea amarilla), respecto a la instantánea (línea morada), que la velocidad (valor encerrado con la línea de color rojo) presenta una desviación a la deseada.

Entre los diferentes puntos de muestra, se encuentra que el error es de aproximadamente el 7%. Dicha variación puede tener su explicación en las ráfagas momentáneas de viento que se presentan en el espacio de estudio, lo cual se corrobora con el instrumento de horizonte artificial que sirve tanto para la navegación, como para la telemetría de la aeronave (lado izquierdo de la misma Figura 13). En este instrumento, se percibe que el movimiento *pitch* es pronunciado, lo que indica un intento del vehículo y del mismo control de vuelo por generar una mayor fuerza de arrastre ante una resistencia al movimiento.



Fig. 13. Desfase del valor de la velocidad entre la programada y el valor instantáneo

En las experiencias, se generó un tema relevante con la cobertura de la señal que permite el enlace entre el radiocontrol y el UAV. La topografía, la humedad del momento, la dirección de las antenas, entre otras variables, influyeron en la conectividad. La señal electromagnética



centrada en 2.4 GHz sufre una atenuación para este escenario y este modelo, a una distancia horizontal de 450 m desde el punto donde se encontraba el mando de control. Si a la distancia horizontal se suma una vertical, la distancia de línea a vista entre el emisor y el receptor se incrementa considerablemente, perdiendo por lo tanto conexión y activando con esto la seguridad del UAV, la cual dicta que, en el momento de ausencia del enlace, se aborte la misión y se retorne de forma automática, con una altura de vuelo segura, al punto de lanzamiento. Así estos limitantes generan consideraciones adicionales a tener presente en el momento del diseño de los planes de vuelo.

Finalmente, para la experiencia de caracterización de vuelo, se alcanzaron los valores que se observan en la Tabla 2, y que corresponden a los parámetros expuestos en la sección E. Se observa que entre los valores teóricos y los experimentales se presentan porcentajes de errores bajos, pues se considera que las variaciones no consiguen alterar ostensiblemente la experiencia, pues el error más alto corresponde al número total de imágenes, siendo esta variable mejor analizada en el momento de obtener los mapas de cobertura del espacio muestreado, y que se realizará en la siguiente sección.

C. Desempeño del diseño de experimentos

Para el diseño de experimentos que se planteó en la sección E, se llevó a cabo el procesamiento de imágenes de cada combinación (Tabla 3). Dado que el espacio de estudio presenta en su mayoría una cobertura arbórea densa, dificultando con ello la detección de las distorsiones causadas por el bajo solapamiento y muestreo, se seleccionó uno de los pocos edificios presentes en el área de estudio para que de forma comparativa se pudiese observar la mejor pareja de valores.



TABLA 2. VALORES DE LOS PARÁMETROS CALCULADOS PARA LA FOTOGRAMETRÍA CON LAS CONDICIONES DE PRUEBA SELECCIONADAS

Parámetro	Valor teórico	Valor experimental	Porcentaje de error
Distancia entre imágenes	27,36 m	27 m	1,3 %
Distancia entre líneas de vuelo	55,53 m	55,53 m	0 %
Intervalo de tiempo entre imágenes	2,73 s	2,74 s	0,36 %
Número de líneas de vuelo	4	4	0 %
Número total de imágenes	58	56	3,4 %
Tiempo de vuelo	158,34 s	153,44 s	3 %
Distancia entre imágenes	27,36 m	27 m	1,3 %

Cabe aclarar que se trata de una elección cualitativa, y que corresponde al intento de visualizar en el promedio de los 3 planes de vuelos ejecutados, por cada experimento, cuál composición de imágenes arroja una menor alteración de la geometría del edificio. Los resultados que se perciben como mejores, corresponden a la combinación de solapamiento longitudinal del 80% y lateral del 70%, a una altura de 70 y 90 m. De estos resultados, se elige la altura de vuelo de 90 m, porque presenta una composición con mejor definición en sus bordes y arroja un menor número de imágenes, lo que agiliza el procesamiento de forma considerable.

Con las diferentes experiencias, es posible generar las gráficas comparativas de los parámetros para la fotogrametría aérea con la plataforma y las condiciones establecidas. En la Figura 14 se plasma el comportamiento del parámetro GSD. La relación es lineal y se destaca la independencia de su cálculo con el solapamiento que se escoja



en el plan de vuelo. Se observa que un GSD entre 5 y 6 cm puede ser suficiente para la aplicación de detección de la *Sigatoka negra* en musáceas, ya que permite una buena resolución y no sobrecarga la tarea de procesamiento de imágenes.

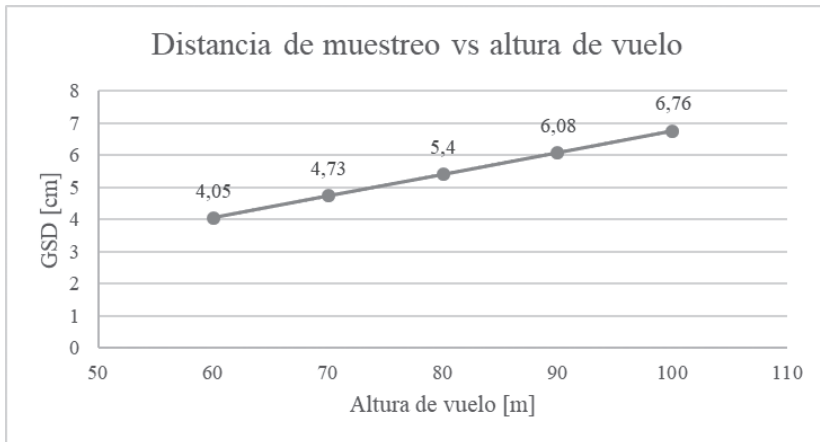


Fig. 14. Valores del GSD a diferentes alturas de vuelo.

Dado que se observa que el solapamiento longitudinal del 80% y lateral del 70% es la combinación con un mejor desempeño bajo las condiciones planteadas, se realizan las curvas de la Figura 15. Se verifica que seleccionar una velocidad de 10 m/s es suficientemente rápida para tener un tiempo de vuelo, que permita al UAV completar la misión con una descarga de batería segura, evitando además altas vibraciones, y una captura de imagen idónea con las velocidades de obturación que posee la cámara.



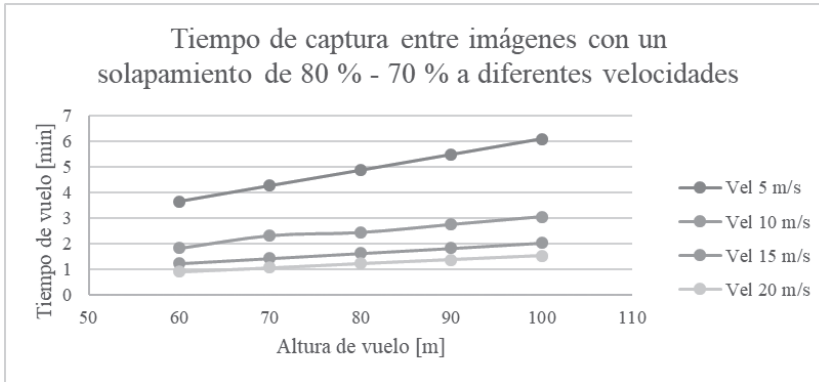
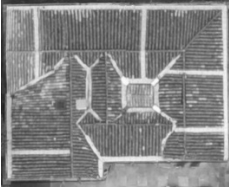
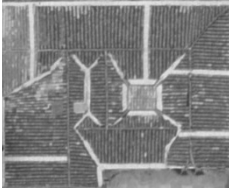


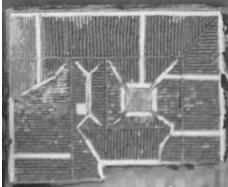

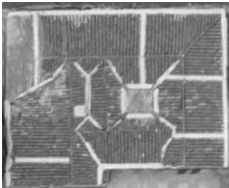
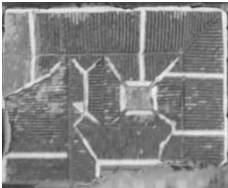
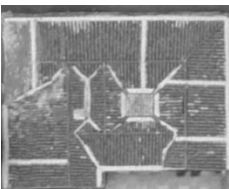
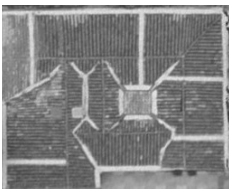


Fig. 15. Tiempo de captura con un solapamiento longitudinal del 80% y lateral del 70%.

Como es de esperar, un mayor porcentaje de solapamiento entre las imágenes conlleva a una distancia menor entre las mismas muestras (Figura 16). No obstante, disminuye a su vez la distancia entre las líneas de vuelo (Figura 17), lo que extiende el tiempo que tomaría ejecutar el plan de vuelo y, por ende, se debe tener especial cuidado con la autonomía de la aeronave. Se requeriría en caso tal de elegir un solapamiento con porcentajes altos, de la logística de partir la misión tantas veces como sea necesario para el recambio de batería. Por otra parte, se puede mitigar el incremento de las trayectorias a realizar, aumentando la altura de vuelo (Figura 18), lo cual es positivo de cara al número de imágenes que se adquirirían (Figura 19), dado que una disminución del número de imágenes a procesar es una reducción del tiempo de cómputo y de las especificaciones técnicas que demandaría el equipo de procesamiento.



TABLA 3. ASPECTOS RELEVANTES DE LA EJECUCIÓN DE LOS DIFERENTES EXPERIMENTOS

Altura de vuelo [m]	Solapamiento longitudinal – lateral [%]		
	80 - 70	75 - 60	60 - 30
60	Realiza un sobremuestreo, complejiza el procesamiento y no genera un valor agregado en el resultado	El UAV pierde comunicación con el radiocontrol, se considera inviable su ejecución.	El UAV pierde comunicación con el radiocontrol, se considera inviable su ejecución.
70			Genera una sola línea de vuelo, lo que impide el solapamiento entre las imágenes
80			
90			
100			Genera una sola línea de vuelo, lo que impide el solapamiento entre las imágenes



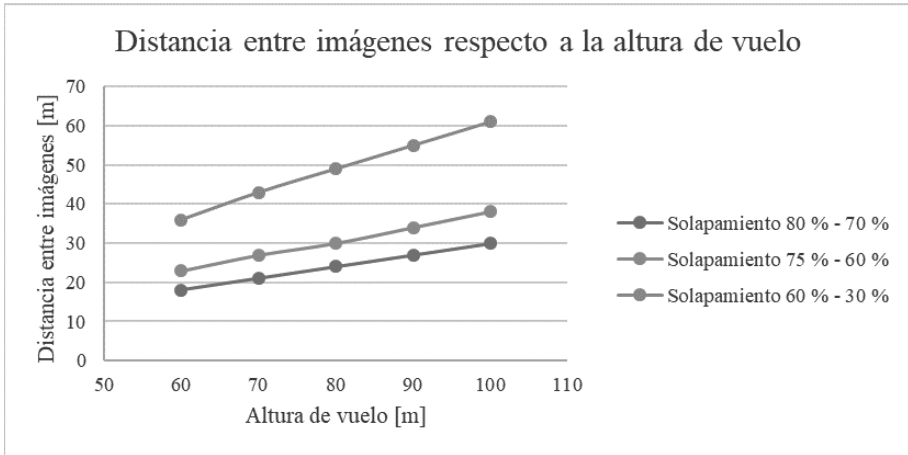


Fig.16. Distancia entre imágenes a diferentes alturas de vuelo.

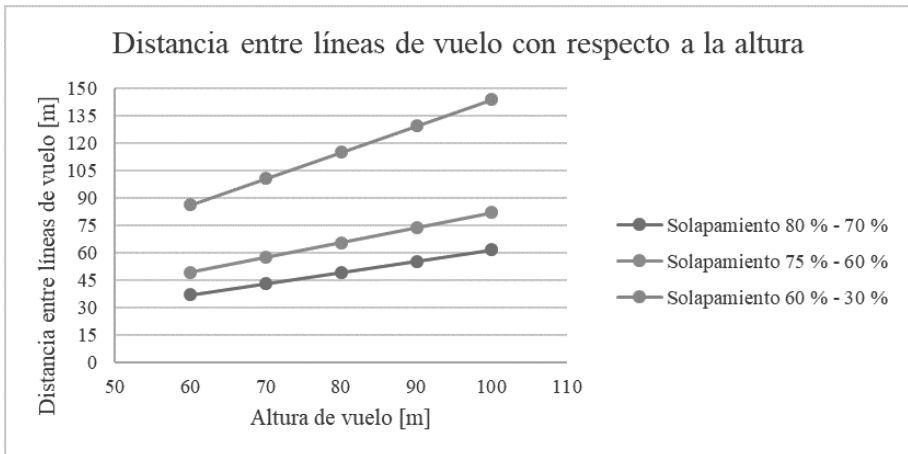


Fig. 17. Distancia entre líneas de vuelo a diferentes alturas de este.



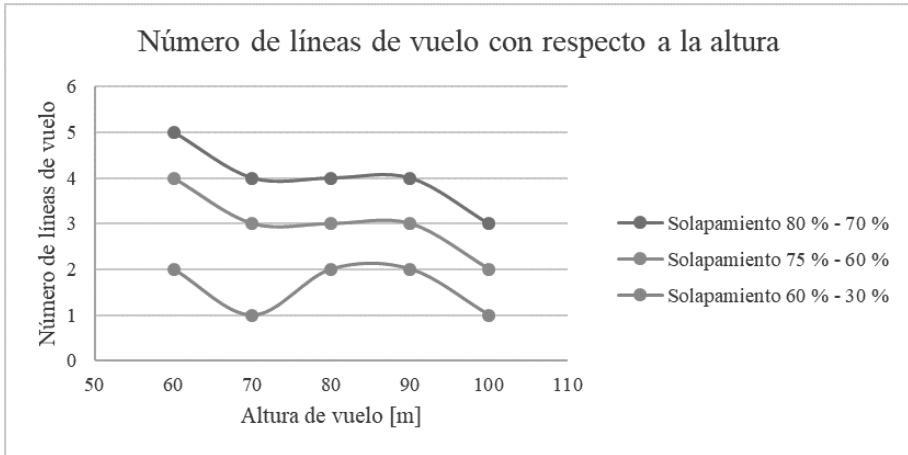


Fig. 18. Número de líneas de vuelo respecto a la altura y el solapamiento.

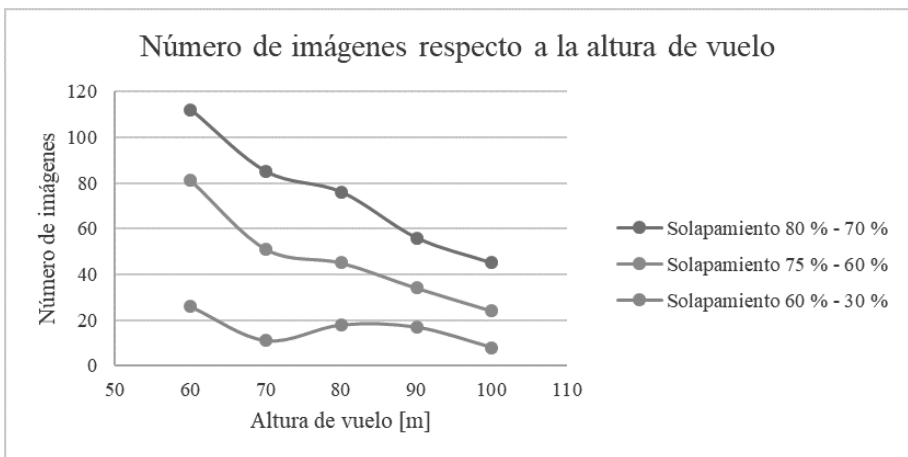


Fig. 19. Número de imágenes respecto a la altura de vuelo y el solapamiento.



D. Generación de ortomágenes

Tras la adquisición de las imágenes, se realizó el procesamiento digital de imágenes con el programa Microsoft ICE para la obtención del ortomosaico. La composición resultante se observa en la Figura 20. Una primera mirada del producto resultante arroja que no se presentan zonas del área de interés sin estar muestreadas. Así mismo, es perceptible la distorsión que se genera en los bordes por el bajo muestreo en las franjas próximas al límite del polígono. Un análisis más detallado permite evidenciar que si bien no se tienen zonas sin información, sí existen distorsiones y malas interpretaciones por parte del algoritmo (Tabla 4). Esto es algo que hay que tener presente y esperar la georreferenciación de las imágenes, buscando una mejoría en los resultados.

La georreferenciación de la composición se logra al ingresar los GCP al programa *Agisoft* como puntos geolocalizados. De esta forma, se comentó en la metodología, se debe identificar de manera manual el GCP en todas las imágenes; es entonces el proceso que se observa en la Figura 21, donde se ubica la marca en el suelo de color amarillo, se geolocaliza y luego se identifica en la imagen.

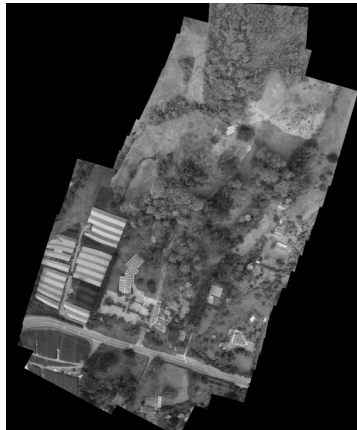


Fig. 20. Ortomosaico, generado con el plan de vuelo a 90 m de altura y con un solapamiento longitudinal del 80% y lateral del 70%.



TABLA 4. ERRORES PRESENTES EN EL ORTOMOSAICO RESULTANTE

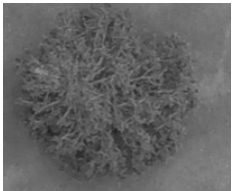
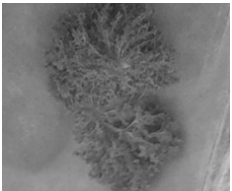

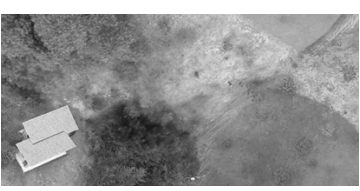




Imagen original	Imagen procesada
	
	
	
	

Fig. 21. Establecimiento de marcas como GCP (izq.) y ubicación de la marca en una imagen (der.)

Los informes suministrados por el programa Agisoft son los que se observan en las Figura 22, Figura 23 y Figura 24. En ellos se pueden ver la ubicación de los GCP en el mapa, la ubicación y el nivel de solapamiento



entre las imágenes y el mapa de elevación digital generado por la herramienta, a partir de los componentes que se capturan en las imágenes. Se destaca en la Figura 23 que la zona de interés corresponde a la que se encuentra en color azul, representando este color según la leyenda, los lugares en los que se encuentra información de un punto particular en 9 o más imágenes. Los colores cálidos representarían por su parte las zonas en donde la coincidencia de imágenes es baja, dándose esta situación en los extremos de la composición. Finalmente, se verifica con la Figura 24 el desnivel del terreno, con una variación de aproximadamente 100 m entre los puntos más bajos, que se muestra con tonalidades frías; y los más altos, con tonalidades cálidas.

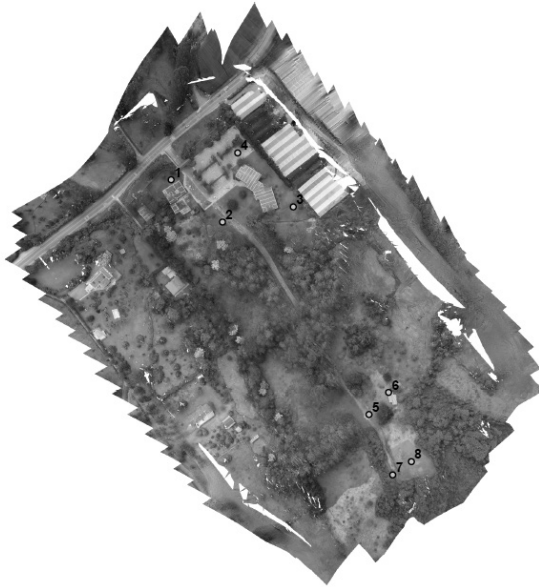


Fig. 22. Ortoimagen de la zona de interés y la ubicación de las marcas usadas como GCP.



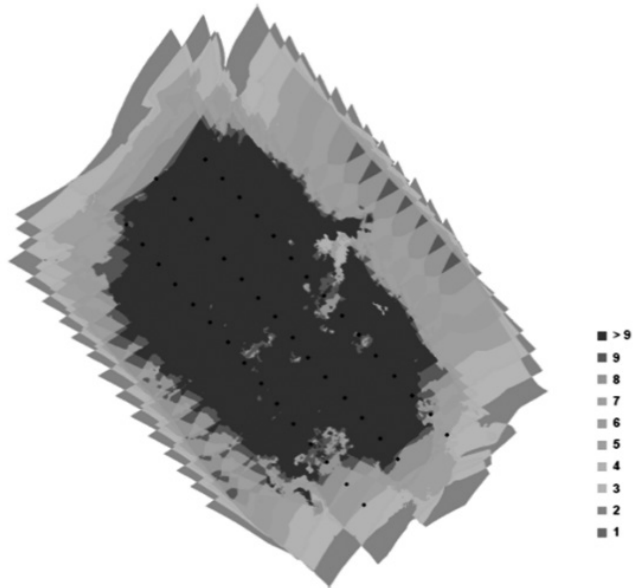


Fig. 23. Mapa con la geolocalización de las imágenes y el nivel de solapamiento entre las mismas

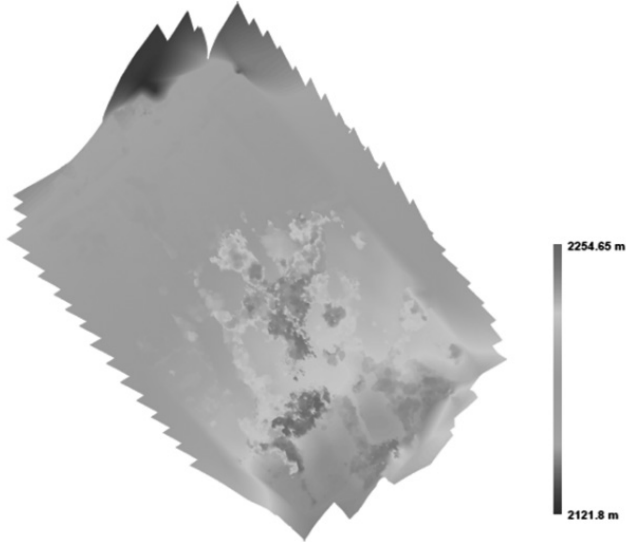


Fig. 24. Mapa con la elevación digital calculada por el programa *Agisoft*.



4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Es posible concluir con el desarrollo del actual trabajo que plantear el uso de un UAV con una cámara digital acoplada para la obtención de imágenes aéreas, con las cuales se pueda generar productos fotogramétricos que permitan a su vez detectar afectaciones de la Sigatoka negra en un cultivo de musáceas, es plausible. Así como muestra viabilidad la metodología preliminar expuesta para el alcance de los objetivos planteados.

Se observa de forma particular que el desempeño de las conversiones y el uso de los filtros de tipo morfológicos seleccionados para la realización del algoritmo de detección, tienen un buen comportamiento y, por lo tanto, un buen resultado. Sin embargo, se debe evaluar la posibilidad de desarrollo del mismo en un código de programación más liviano, como puede ser C o Python. Esto último buscaría además la ejecución en tiempo real, y posiblemente con un menor requerimiento de características técnicas del equipo de cómputo.

Con el diseño de experimentos propuesto, se logró establecer los porcentajes de solapamiento idóneos para la detección de Sigatoka negra, las condiciones, la aeronave y el espacio de interés, siendo estos del 80% para un solapamiento longitudinal; 70% para uno latera, una altura de vuelo de 90 m y una velocidad de vuelo de 10 m/s. Se concluye que dichos resultados son sensibles a dichos factores y que un cambio por ejemplo de la plataforma aérea, modifica ostensiblemente los resultados de las experiencias, porque vehículos más actuales tienen mejores rangos de alcance o cobertura, permitiendo el estudio de otras combinatorias y no descartándolas como pérdidas en el enlace. Se concluye además que los resultados de la ortoimagen son más efectivos cuando se tienen los puntos de control bien distribuidos sobre la zona de interés, pues se evidenció que en las partes menos georreferenciadas se produce más aberraciones. Empero, según la literatura en áreas densamente boscosas es difícil para el procesamiento de un software encontrar puntos comunes o puntos claves entre la



superposición de imágenes por su complejidad geométrica (miles de ramas y hojas). Por esta razón, y de acuerdo con algunos autores, se recomienda aumentar el porcentaje de solapamiento frontal o longitudinal a un 85% y al menos un 70% del lateral. También se recomienda volar más alto para mejorar los resultados y geolocalizar con precisión las imágenes, ya que, a mayor altitud de vuelo, menos distorsión de perspectiva y, por ende, menos problemas de apariencia. La altitud de vuelo en relación con la resolución del pixel de la imagen y la distancia focal, determina la distancia de muestreo (GSD) en el suelo de las imágenes (resolución espacial) y los mejores resultados se obtienen en un GSD superior a 10 cm/pixel.

AGRADECIMIENTOS

En el presente trabajo se da un agradecimiento especial al Grupo de Investigación de Electromagnetismo Aplicado (GEMA) de la Universidad EAFIT, puntualmente al profesor José Ignacio Marulanda Bernal adscrito al Departamento de Ciencias Físicas de la misma Universidad, quien facilitó varios recursos con los cuales se desarrollaron el presente trabajo. También se agradece a la profesora Valeska Villegas Escobar adscrita al Departamento de Ciencias Biológicas de la misma Universidad EAFIT, quien ayudó y proporcionó los ejemplares de banano que permitieron hacer las pruebas de los algoritmos de detección.



REFERENCIAS

- [1] FAO, "Conferencia Regional de la FAO para Europa," de *La ciberagricultura: uso de tecnologías de la información y la comunicación (TIC) para el fomento de sistemas alimentarios sostenibles e inclusivos y la integración del comercio*, Vorónezh (Federación de Rusia), 2018.
- [2] B. & M. M. Bryant, "Determining crop water stress from crop temperature variability," *Proceedings of the Fourth International Airborne Remote Sensing Conference and Exhibition/21st Canadian Symposium on Remote Sensing*, vol. 1, n° 21, pp. 289-296, 1999.
- [3] FAO, "Análisis del mercado del banano. Panorama general de febrero de 2020," Roma, 2020.
- [4] Ministerio de Agricultura, "Indicadores e Instrumentos cadena Plátano," Bogota, 2018.
- [5] FAO, "FAOSTAT," [Online]. Available: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>. [Último acceso: 22 Julio 2020].
- [6] CIAT/FAO, "La Sigatoka negra en plátano y banano. Guía para el reconocimiento y manejo de la enfermedad, aplicado a la agricultura familiar," CIAT, Cali, 2013.
- [7] M. H. Mayorga Pinzón, "Manchas de Sigatoka de las musáceas," de *Últimos avances en la tecnología del cultivo del plátano en Colombia*, Villavicencio, CORPOICA, pp. 32-38, 2010.
- [8] E. Chuvieco, "Fundamentos de teledetección espacial," Madrid, Ediciones Rialp, 1990.
- [9] F. Greenwood, "How To Make Maps With Drones," de *Drones and Aerial Observation: New Technologies for Property Rights, Human Rights, and Global Development*, New America, p. 13, 2015.
- [10] F. Lopez Granados, "Uso de Vehículos Aéreos no tripulados (UAV) para la evaluación de la producción agraria," *Ambienta*, vol. 1, n° 105, pp. 40-52, 2013.
- [11] IDEAM, "Geoservicios Institucionales," IDEAM, 2014. [Online]. Available: <http://www.ideam.gov.co/geoservicios-institucionales>. [Último acceso: 22 Julio 2020].



- [12] P. M. I. Colomina, "Unmanned aerial systems for photogrammetry and remote sensing: A review," *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, nº 92, pp. 79-97, 2014.
- [13] ArduPilot, "Mission Planner," 2016. [Online]. Available: <http://ardupilot.org/planner/docs/mission-planner-overview.html>. [Último acceso: 21 Septiembre 2017].
- [14] E. Santana, "XDRONES," 23 Febrero 2017. [Online]. Available: <http://www.xdrones.es/mavlink/>. [Último acceso: 7 Noviembre 2017].
- [15] Pix4D, "Getting GCPs on the field or through other sources (optional but recommended)," 2016. [Online]. Available: <https://support.pix4d.com/hc/en-us/articles/202557489#gsc.tab=0..>
- [16] R. Ruiz Marín, y L. Ruiz Fernández, "Generación de una ortoimagen digital a partir de un sensor espacial de alta resolución," Valencia, 2005.
- [17] B. Froment, "Fotografías aéreas," 2007.
- [18] J. J. Ruiz, "Generación de mapas 3D a partir de imágenes aéreas," Sevilla, 2013.
- [19] 3D Robotics (3DR), "Solo User Manual V7," California , 2015.
- [20] D. G. Marcovecchio, J. Ferrari, L. F. Costa, G. Díaz, y C. A. Delrieux, "Ortomosaicos utilizando Imágenes Aéreas tomadas por Drones y su aplicación en la Agricultura de Precisión," Bahía Blanca, 2014.
- [21] J. O. Escalante Torrado, "Ortomosaicos y modelos digitales de elevación generados a partir de imágenes tomadas con sistemas UAV," *Tecnura*, vol. 20, nº 50, p. 23, 2016.
- [22] J. A. Beltrán Arciniegas, y S. L. Ortiz Parada, "Ortofotografía del predio El Tibar perteneciente a la Universidad Distrital Francisco José De Caldas," Bogotá, 2017.





Valorización de cascarilla de arroz en diferentes sectores industriales

Resumen— La cascarilla de arroz (CA) es un residuo de alta generación que junto con sus cenizas (CCA) en Colombia y el mundo y por sus características físicas y químicas, ha sido de gran interés académico e industrial. En este capítulo se identifican y analizan los principales usos de la CA y la CCA para crear nuevos materiales o mejorar productos en varios sectores industriales. Se resaltan sectores como el de la construcción, donde se han usado estos residuos para la fabricación de cemento, como materia prima alternativa del concreto y los ladrillos de arcilla cocida, también como material para la estabilización de suelos. En procesos de obtención de nuevos materiales, se ha usado principalmente CCA para obtener cerámica avanzada y como materia prima en la producción de sílice, así como la CA en la obtención de carbón activado. En el sector energético, a partir de la CA ha sido posible la producción de combustible sólido y su aprovechamiento como combustible alternativo, también con resultados menos prometedores en la generación de biogás y bioetanol. Por último, se analizaron usos importantes de la CA para el acondicionamiento de suelos y las CCA adsorbente de diversos contaminantes para la descontaminación de aguas residuales y purificación de agua. Es indispensable continuar en búsqueda de soluciones que permitan valorizar estos residuos en procesos industriales actuales y en la obtención de nuevos productos, buscando hacer parte del modelo de economía circular.

Puerta Cortés Carlos.
Tecnológico de Antioquia –
Institución Universitaria,
cpuerta2@correo.tdea.edu

Jaramillo Zapata Leyla.
Tecnológico de Antioquia –
Institución Universitaria
coleyla.jaramillo@tdea.edu

Upegui Sosa Sergio.
Tecnológico de Antioquia –
Institución Universitaria
cosaupegui@tdea.edu.co



Palabras clave— residuos sólidos, economía circular, cascarilla de arroz, sector industrial, agroindustria.

Abstract— Rice husk (RH) and rice husk ash (RHA) are waste of high generation in Colombia and the world, which, due to their physical and chemical characteristics, have been of great academic and industrial interest. This chapter identifies and analyzes the main uses of RH and RHA to create new materials or improve products in several industrial sectors. In sectors such as construction, these wastes have been used for the manufacture of cement, as an alternative raw material for concrete and fired clay bricks, and also as a material for soil stabilization. In processes for obtaining new materials, RHA has been used mainly to obtain advanced ceramics and as a raw material in the production of silica, as well as RH in the production of activated carbon. In the energy sector, it has been possible to produce solid fuel from RH and use it as an alternative fuel, also with less promising results in the generation of biogas and bioethanol. Finally, important uses of RH for soil conditioning and RHA as an adsorbent of various pollutants for wastewater decontamination and water purification were analyzed. It is essential to continue searching for solutions that allow the valorization of these wastes in current industrial processes and in obtaining new products, seeking to be part of the circular economy model.

Keyword— Solid waste, circular economy, rice husk, industrial sector, agroindustry.

1. INTRODUCCIÓN

El arroz es un cereal de gran importancia para muchos países alrededor del mundo. Hace parte de la familia de hierbas de las gramíneas o poáceas, aunque es el arroz común (*Oryza sativa*) la única especie apta para el consumo. Algunos historiadores afirman que este cereal podría ser nativo del Sureste asiático y se cultiva desde hace más de 7000 años [1], [2].

Actualmente, más de 70 países, principalmente China, India, Indonesia y Bangladesh, producen arroz en todo el mundo. Así mismo, se generan grandes volúmenes de cascarilla de arroz (CA), que es un residuo de baja densidad; cuando se desecha, este ocupa grandes áreas, en donde puede autoquemarse (debido a su alta capacidad volátil) y gran cantidad se somete a combustión indiscriminada como método de



disposición final, esparciendo las cenizas y causando grandes daños al medio ambiente y a la salud humana [3].

En Brasil, que es uno de los países de mayor producción de arroz en Latinoamérica, se han utilizado algunas alternativas desde 1980 [3]. Debido a la alta potencia calorífica de las cáscaras (alrededor de 4000 kcal/kg), una alternativa a su eliminación es su uso en sustitución de la leña, que se utiliza en la generación de gases calientes para el proceso de secado, en pequeños generadores de vapor, y más recientemente en los hornos de la industria del cemento [4]. Sin embargo, se genera un nuevo residuo al quemarse la CA: sus cenizas [3].

Actualmente, los países productores de arroz se ven desafiados por el problema de la eliminación de la CA, y han tratado de utilizarla [5]. Debido a su gran producción, la ciencia en su búsqueda de aprovechar al máximo los desechos orgánicos, se interesa en el estudio de este material vegetal que se produce en abundancia, para implementarlo en procesos industriales y que su uso contribuya a potencializar la prestación de servicios y los mecanismos de fabricación de productos amigables con el medio ambiente [6].

En los últimos treinta años, nace el interés en la utilización de la CA y la ceniza de cascarilla de arroz (CCA), para crear nuevos materiales o mejorar productos de ciertas industrias, gracias a sus propiedades físicas y químicas. Con la finalidad de mitigar los impactos de la generación y disposición de residuos sólidos, que es una de las más críticas en la actualidad, se presentan diversos estudios e investigaciones tendientes a valorizar estos residuos en áreas específicas de la industria, usándolos como materia prima alternativa o como un producto sustituto con valor agregado.

En el presente capítulo se identifican y analizan los principales usos de la CA y la CCA en diferentes sectores industriales de importancia, reportados en las investigaciones de los últimos veinte años.



Inicialmente se identifica para estos residuos su generación y principales características, sus procesos de producción y subproductos. Posteriormente, se analizan sus principales usos de acuerdo con el sector industrial, innovación e impacto ambiental. Finalmente, se plantean conclusiones del tema analizado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En los últimos años, se ha investigado ampliamente los usos de la CA y sus cenizas en diversos procesos industriales. En este sentido, el análisis del estado del arte presentado en este capítulo se centra en los sectores de mayor desarrollo y con más amplio número de investigaciones en los últimos 20 años. Los sectores industriales que han usado la CA y sus cenizas ampliamente como materia prima.

A. Búsqueda y clasificación

Se buscó y clasificó información académica en bases de datos como Scopus, Web of Science, SciELO y Google Scholar. Las palabras clave definidas para la búsqueda fueron: cascarilla de arroz (rice husk, en inglés), ceniza de cascarilla de arroz (rice husk ash). Con un primer resultado de más de 2.500 fuentes, para los últimos 20 años, se identificaron las relacionadas con alguna aplicación en el ámbito industrial. Con un conjunto de referencias consultadas y seleccionadas de aproximadamente 500, se analizaron y filtraron en dos tipos de publicaciones, artículos de investigación y resúmenes. De estos, se seleccionaron 100 que contenían algún tipo de información con aplicaciones recientes en los sectores industriales de interés o información general de aplicaciones de la CA y CCA. Para complementar el análisis, se incluyeron en la revisión referencias que pertenecían a páginas web oficiales gubernamentales y otros organismos, relacionados con la temática que brindan información en el contexto local y regional.



B. Análisis de información

Los documentos seleccionados fueron catalogados en una matriz de información por orden cronológico y temático que incluía las diferentes categorías relacionadas con los cuatro sectores industriales escogidos: 1) Sector de la energía y combustibles. 2) Sector de la construcción. 3) Sector de la agricultura y medio ambiente. 4) Sector de la fabricación de materiales.

3. GENERALIDADES

En esta sección, se describen y analizan las principales características de la CA y la CCA, la producción de arroz en Colombia, sus procesos y subproductos.

A. Características de la cascarilla de arroz

La cascarilla de arroz es un tejido vegetal constituido principalmente por celulosa y sílice, contiene también un alto porcentaje de ceniza, lignina y posee un buen poder calorífico.

Su tamaño puede variar desde 50 cm (en cultivos modernos) hasta 500 cm (en cultivos en aguas profundas) [7]. En la Figura 1 se muestra una representación de una planta de arroz y sus partes fundamentales que son la hoja, la raíz, el tallo, la panícula y la cariósipide.



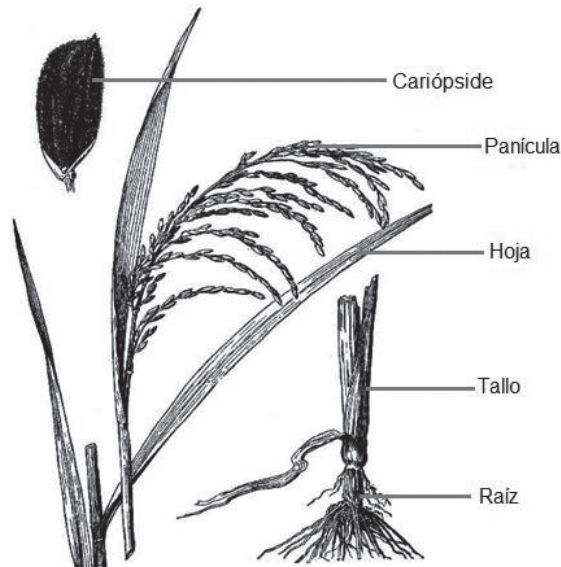


Fig. 1. Partes principales de la planta de arroz [2].

La panícula o panoja es la rama principal que se ramifica y sostiene la flor en la fase reproductiva; luego a la cariósido en la fase de madurez [8]. La cariósido es el fruto seco de una sola semilla con el pericarpio adherido a la misma; está formado por el embrión, el endospermo, capas de aleurona, tegmen y el pericarpio. Estas partes se ilustran con mayor detalle en la Figura 2. La composición general de los frutos secos de arroz corresponde al grano entero en un 55%; 15%, al grano quebrado; 10% como afrecho de arroz y el 20% del peso restante corresponde a la cascarilla [9].



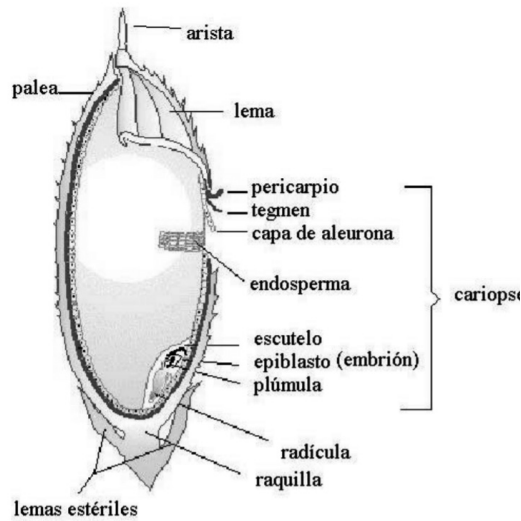


Fig. 2. Principales partes del grano de arroz [8].

B. Producción de arroz en Colombia

El arroz es el alimento básico para la mitad de la población mundial. En el mundo se produce alrededor de 500 millones de toneladas al año de arroz paddy. China es el mayor productor de arroz con cáscara del mundo con más de 200 millones de toneladas, seguido de India e Indonesia. En América Latina, el mayor productor de la región es Brasil con 12 millones de toneladas, seguido de Perú y Colombia [10].

En Colombia, el cultivo de arroz ocupa el tercer puesto en la producción nacional, después del café y el maíz [11]. Con producciones de más de dos millones de toneladas, la producción de arroz representa aproximadamente el 0,35% del PIB nacional [12], [13] [14], [15].

Los principales productores de arroz en Colombia se encuentran en cuatro departamentos, en donde se concentra el 74% de la producción nacional de arroz verde del país [11]. En 2019, la producción de arroz fue de cerca de tres mil toneladas, de las cuales el 28% se registró en el



departamento del Casanare, seguido por Tolima con 24%, el Meta con 13%, Huila con 8% y el resto de departamentos representados en 26% [16]. La descripción detallada se presenta en la Tabla 1.

TABLA 1. PRODUCCIÓN DE ARROZ EN COLOMBIA EN 2019 [16]

Departamentos	Producción (ton)
Casanare	835.096
Tolima	726.786
Meta	399.516
Huila	249.024
Otros departamentos	774.179
Total nacional	2.984.601

C. Procesos de producción de arroz y generación de subproductos

La producción de arroz genera varios subproductos agroindustriales de los cuales se destaca la cáscara o cascarilla de arroz, el cual equivaldría a un 20% del peso del arroz y cuando esta es térmicamente transformada, se obtienen sus cenizas que han sido objeto de investigación, debido a sus características físico químicas [17].

En la Figura 3 se ilustra los dos subproductos de importancia en el proceso de producción de arroz.

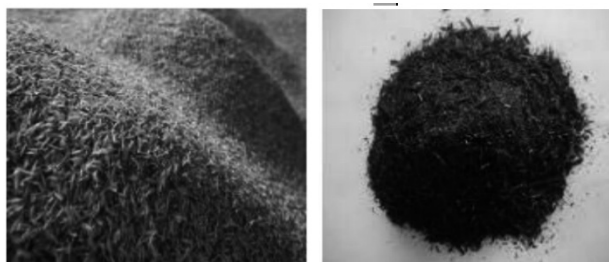


Fig. 3. Cascarilla de arroz (izquierda) y sus cenizas (derecha) [18].



La producción de arroz inicia con una primera etapa agrícola, donde el cultivador realiza la preparación del suelo, la siembra y va hasta la cosecha de arroz verde. Este producto se constituye en la materia prima de la etapa industrial, allí los molinos realizan procesos de limpieza, reducción de humedad del 25% al 13% y almacenamiento en silos. Posteriormente, el arroz seco es trillado, pulido y empacado como arroz blanco o integral para su comercialización. En este proceso, se obtienen como subproductos la harina de arroz y la cascarilla [19]. El proceso completo puede observarse en la Figura 5.

La distribución de los productos, subproductos y residuos de la industria molinera sería: arroz entero 59%, arroz partido 7%, harina y salvado 9%, impurezas un 3% y entre un 20% y 22% de cascarilla [11], [20].

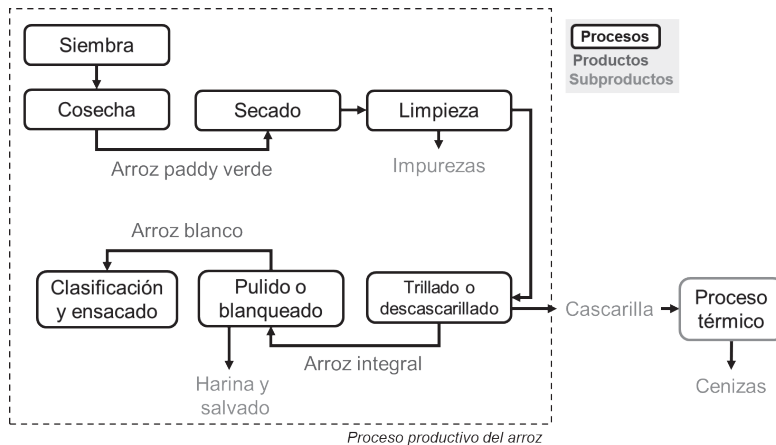


Fig. 4. Producción de arroz y principales subproductos.

Fuente: Elaboración propia.

El arroz posee el mayor contenido de sílice de la familia de las gramíneas, y se concentra principalmente en la cascarilla que es el subproducto de mayor volumen de generación. Las industrias manejan de diferentes formas el residuo, la más común es acumularlo en terrenos de los propios molinos, para después ser usados como combustible en el proceso de secado del grano; sin embargo, este proceso es poco eficiente. [21], [22].



El mayor problema con esta cascarilla es el volumen y la baja densidad. Habitualmente estos residuos son depositados cerca de fuentes de agua o en terrenos destinados para ello, pero debido a los altos volúmenes y los extensos tiempos requeridos para su descomposición, se crean problemas de saturación de suelos y se termina optando por quemas a campo abierto [23].

En 2019, la producción de arroz en Colombia se acercó a los tres millones de toneladas de arroz, por lo que se hizo necesario disponer aproximadamente de 600 mil toneladas de cascarilla de arroz [24]. Incluso después de la incineración de la cáscara de arroz, el 20% de su peso se mantiene como material de desecho en forma de CCA [25], en donde se concentra aún más el contenido de sílice.

A pesar de que la disposición de estos subproductos representa uno de los principales problemas en la industria arrocera, su alta disponibilidad y sus propiedades físico-químicas los hace una alternativa efectiva para las diferentes industrias: construcción, combustible, agropecuaria, entre otras [16], [18], [19], [20], [21].

D. Composición de la cascarilla de arroz y sus cenizas

La cascarilla de arroz presenta una gran variedad de características fisicoquímicas [26]. El tejido vegetal de la cascarilla de arroz está compuesto por diferentes cantidades de los elementos (Tabla 2): el oxígeno y el carbono son los de mayor presencia, y las cenizas en el tejido vegetal están alrededor del 20% [26].



TABLA 2. COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE LA CASCARILLA DE ARROZ [26]

Elemento	Composición (%)
Carbono	37,6 – 42,6
Hidrógeno	4,7 – 5,78
Oxígeno	31,37 – 37,62
Nitrógeno	0,38% – 1,88
Azufre	0,01 - 0,18
Cenizas	16,93 – 24,6

La cascarilla está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina; en la tabla 3 se describe la composición porcentual de estos tres elementos.

TABLA 3. PRINCIPALES COMPONENTES DE LA CASCARILLA DE ARROZ [26]

Compuesto	Cantidad (%)
Celulosa	25,89- 35,5
Hemicelulosa	18,1 – 21,35
Lignina	18,20 – 24,6

Valverde et al. [26] determinaron la composición de la cascarilla producida en Colombia: celulosa, 39% y lignina, 23%. Desde la perspectiva inorgánica, la cascarilla de arroz está constituida principalmente por óxido de silicio (Tabla 4).



TABLA 4. COMPOSICIÓN QUÍMICA (FRACCIÓN INORGÁNICA) DE LA CASCARILLA DE ARROZ [26]

Compuesto	Cantidad (%)
SiO ₂	42,08
K ₂ O	0,47
MgO	0,05
CaO	0,13
Pérdidas por ignición (1000°C)	57,27

Cuando la cascarilla de arroz se somete a una transformación termoquímica, es posible obtener una mayor concentración de sílice y otra característica físico-químicas importantes en las cenizas. La CCA se compone principalmente de sílice y otros óxidos metálicos que se detallan en la Tabla 5.

TABLA 5. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS CENIZAS DE CASCARILLA DE AROOZ [27]

Compuesto	Cantidad (%)
SiO ₂	93,30
Al ₂ O ₃	0,15
Fe ₂ O ₃	0,14
CaO	0,38
MgO	0,31
K ₂ O	2,2
Na ₂ O	0,01
MnO	0,18
SO ₃	0,24
P ₂ O ₅	0,64
Cl	0,23
Pérdidas por ignición (1000°C)	2,6



Otra característica de importancia reportada para la CCA es su área específica superficial, la cual se encuentra alrededor de 108 m²/g, pH entre 5,5 y 6 y el tamaño de partícula promedio es de 50 μm [28], [29]. La actividad puzolánica para la CCA se ha determinado para diferentes usos cerámicos; esta propiedad depende esencialmente de las condiciones de procesamiento de la CCA. La presencia de sílice amorfa contribuye principalmente a la reactividad de la puzolana y puede modificarse cuando la CCA se somete a trituración o según la temperatura de combustión a la que se procese. Independientemente del origen de la CCA y procesamiento, se ha demostrado que los valores para el índice de actividad puzolánica observados para la CCA, están muy por encima del mínimo recomendado (75%), según la norma ASTM C311 [30].

Las características obtenidas de la CCA, su alto contenido de sílice, alto punto de fusión, baja conductividad térmica, baja densidad aparente y alta porosidad, unidos a la gran disponibilidad del recurso, son indicativos de un material potencial para su uso en sectores industriales, como el cerámico, polimérico y el desarrollo de nuevos productos [31], [32].

4. SECTORES INDUSTRIALES QUE PUEDEN USAR LA CÁSCARA DE ARROZ Y SUS CENIZAS

El sistema lineal de la economía, basado en la extracción, fabricación utilización y eliminación, ha alcanzado límites debido al agotamiento de recursos naturales y de combustibles fósiles. Por consiguiente, es cada vez más urgente la implementación de un modelo circular, donde se optimice el flujo de materiales, energía y residuos con el uso eficiente de los recursos. La economía circular emplea los residuos como materia prima, reduciendo así los desechos generados y minimizando el impacto ambiental. En este sentido, el uso de tecnologías innovadoras y exitosas en el manejo de la basura representa un paso importante en la mitigación al cambio climático, en especial si está enmarcada dentro una estrategia de economía circular que permita considerar y valorizar el residuo como un recurso [33].



Esta nueva concepción de la economía circular ha hecho que residuos agroindustriales como la CA y sus cenizas, provenientes de la cadena productiva del arroz, se conviertan en una fuente susceptible de materia prima, elementos para mejorar procesos y productos o fabricar de nuevos productos para otros sectores industriales.

Se han desarrollado diversos estudios e investigaciones que han mostrado la susceptibilidad del uso de la CA y la CCA en diferentes segmentos productivos. Desde que se identificaron sus principales características desde hace más de una década, gran cantidad de aplicaciones han surgido o desarrollado, y algunas se han llevado al mercado; otras continúan en estado inicial o etapas experimentales.

En las siguientes secciones, se describirá los sectores con más amplio número de investigaciones en los últimos 20 años; así como las principales aplicaciones donde la CA y sus cenizas se han usado como materia prima alternativa o mejorando procesos y productos (Figura 5).

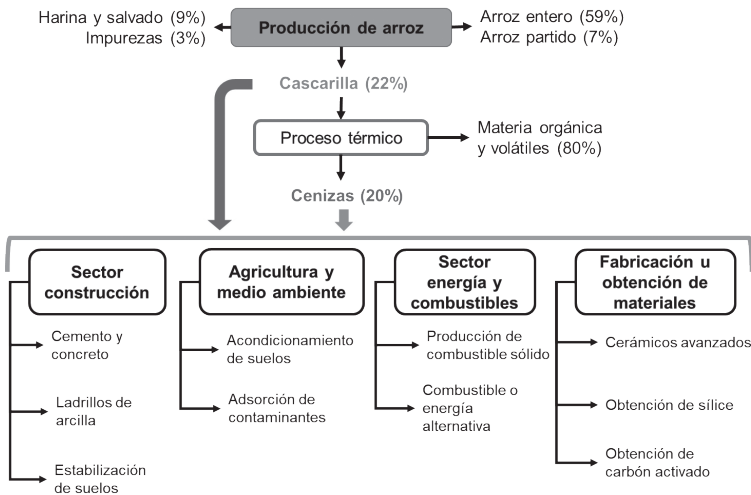


Fig. 5. Principales usos industriales de la cascarilla de arroz y sus cenizas.

Fuente: Elaboración propia.



5. USOS EN EL SECTOR DE LA CONSTRUCCIÓN

El sector de la construcción es una cadena compuesta por cuatro eslabones: (1) explotación y transformación de productos minerales, (2) producción de materiales y elementos constructivos, (3) diseño y construcción de edificaciones y obras, y (4) finalmente la comercialización. Este sector demanda grandes cantidades de materias primas, presenta altos consumos energéticos y genera emisiones considerables. Estos impactos ambientales se han disminuido a lo largo de los años, intentando adoptar el concepto de sostenibilidad en los diferentes eslabones [34].

El uso de diferentes residuos sólidos para la elaboración de productos en este sector es una alternativa sostenible que se ha considerado en diversas investigaciones. Las cenizas volantes, escoria de alto horno, hormigón reciclado, residuos de plantas de energía, ceniza de cáscara de arroz, vidrio de desecho, barro rojo, arcilla quemada, entre otros son algunos de los materiales de desecho que se han utilizado en el sector de la construcción [35], [36], [37]. En este eslabón de producción de materiales y elementos constructivos, se destaca la utilización de esta alternativa.

La producción de productos para la construcción es diversa y contempla materiales y elementos tales como: pinturas, plástico, vidrio, arcilla, concreto (hormigón), cemento y yeso, hierro y acero, y productos metálicos para uso estructural. El concreto es usado para la producción de elementos prefabricados como bloques, estándares, ladrillos, adoquines, postes, losetas, muros de contención segmentados, entre otros.

La incorporación de cascarilla de arroz y sus cenizas, para sustituir materias primas o mejorar propiedades de algunos productos para la construcción, se analiza a continuación.



A. Fabricación de cemento y concreto

Para los procesos y productos del sector cemento y concreto (hormigón), se ha utilizado la CCA principalmente por su alto contenido de sílice y actividad puzolánica. Estas propiedades han hecho a este residuo susceptible de ser usado principalmente como: (1) sustituto parcial del cemento, (2) sustituto parcial o reemplazo del agregado fino, (3) activador alcalino, (4) adición en la fabricación del cemento. En la Figura 6 se ilustra la posibilidad de uso de CCA como materia prima alternativa en procesos de fabricación de cemento y concreto, tanto en mezclas directamente o en la elaboración de productos a partir de estas mezclas (postes, bloques, tuberías, etc.)

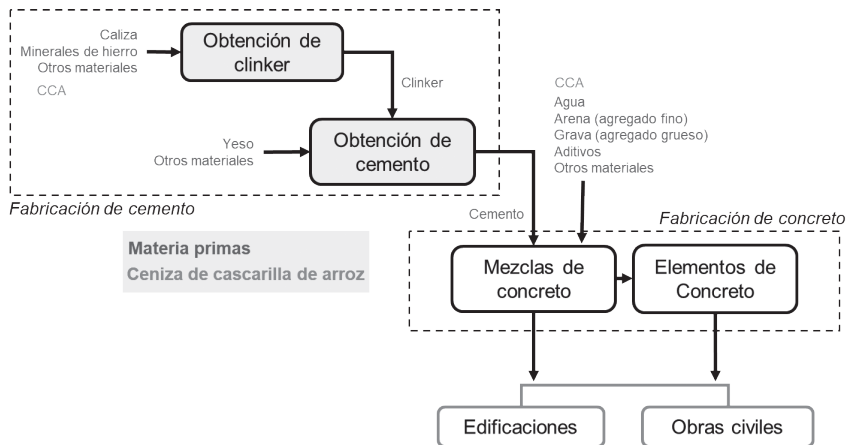


Fig. 6. CCA como materia prima alternativa en la fabricación de cemento y concreto. Fuente: Elaboración propia.

Se ha establecido que las mezclas minerales funcionan con éxito al ser utilizadas como materiales cementantes suplementarios en hormigón, morteros y pastas de cemento [38]. Los compuestos propios del cemento son susceptibles al agrietamiento y cuasi-quebradizos, debido a su limitada propiedad funcional a la tensión, lo que hace necesario agregar materiales complementarios para mejorar esta propiedad [39].



El uso de CCA como material cementante suplementario en el concreto convencional mejora la resistencia a la compresión y la tracción. El incremento en las propiedades del concreto es ocasionada principalmente por el aumento de la reacción puzolánica. Las investigaciones muestran los mayores aumentos en la resistencia a la compresión, con niveles de sustitución de CCA en el hormigón, entre 10% y 15%, para los diferentes tiempos de curado.

La CCA también se ha adicionado para obtener otros tipos de concreto más especializados, como el de ultra alto desempeño (UHPC) y el autocompactante (SCC). En el UHPC, la adición de ceniza reduce la trabajabilidad por lo que es necesario adicionar superplastificantes, pero al igual que en el concreto convencional se mejora la resistencia a la tensión [40], [41].

Cordeiro et al. reportan la aplicación de ceniza de bagazo de caña y de CCA en la producción de hormigón de alto rendimiento preparado con cemento Portland. Al remplazar hasta el 20% en masa del cemento en el hormigón, se lograron rendimientos superiores en las pruebas mecánicas y de durabilidad en comparación a una mezcla de referencia. La sustitución parcial de cemento Portland por estas cenizas aumentó el rendimiento a tensión del hormigón y redujo su viscosidad plástica, debido a un mayor contenido de partículas finas [38].

En el SCC, la sustitución del cemento por aditivos minerales ayuda a reducir una gran cantidad de cemento y el calor de la hidratación. La adición de CCA a este tipo de concreto, aunque mejora las propiedades mecánicas del concreto endurecido, en el concreto fresco disminuye la fluidez y la resistencia a la segregación que son fundamentales para las aplicaciones de este tipo de mezcla. Esto se debe a la mayor absorción de agua de la CCA por su alta área superficial [30]

La CCA también se ha adicionado en hormigón reforzado con fibras (FRC) que constituye una matriz de cemento, para mejorar las propiedades de flexión y tracción del hormigón. El uso de CCA con fibras en FRC mejora



las propiedades de resistencia y durabilidad del hormigón mezclado. Se ha estudiado la adición de fibras naturales y sintéticas, combinadas con CCA en concretos y morteros. Fibras naturales usadas, como fibras de bambú [42], fibras de sisal [43], entre otras, pueden degradarse por la alta alcalinidad de la mezcla y afectar la durabilidad del FRC, pero al adicionarse CCA, se encontró que se redujo esta degradación y la consiguiente reducción de la cantidad de Ca(OH)_2 . Otros autores estudiaron el efecto de incorporar CCA en mezclas reforzadas fibras sintéticas como fibra de vidrio [44], fibra de acero [45] y fibras de polipropileno [46]. En morteros reforzados con fibras de polipropileno y CCA aumentó la resistencia a la compresión del mortero, cuando se agregó hasta un 10% de CCA como reemplazo del cemento. También se observó un incremento de la resistencia a la flexión, debido a las interacciones positivas entre las fibras de polipropileno y CCA, que dieron lugar a la menor contracción de secado del mortero [46].

La CCA también se usa como reemplazo del agregado fino, tanto en mezclas de concreto como en elementos constructivos. La utilización de CCA no molida como agregado fino, tiende a reducir la extracción de recursos naturales como la arena de río. Sin embargo, la alta absorción de agua de la CCA genera problemas en la trabajabilidad del concreto fresco, limitando el porcentaje de reemplazo. Elementos constructivos, como bloques no estructurales y bloques macizos, se han fabricado con CCA, reemplazando el agregado fino hasta en un 20%. Se lograron obtener bloques de concreto no estructural con resistencias mecánicas entre 0,358 y 1,439 MPa, similares a las comerciales, resultando interesante para ser empleados en componentes de construcción liviana y de uso no portante [47].

Otras aplicaciones dadas a la CCA es su adición como activador alcalino para aglomerantes activados por álcalis. Estos aglomerantes consisten en un mineral de aluminosilicatos (precursor) y una solución activadora alcalina (activador). Se ha estudiado la influencia de la adición de CCA, tanto de precursor como de activador [30].



En la fabricación de cemento Portland se requiere una gran cantidad de energía y produce grandes cantidades de CO₂ [48]. Esta es una de las principales razones por la cual la industria cementera ha usado ampliamente varios residuos industriales para elaborar cemento, como escoria metalúrgica, lodos de la industria manufacturera de alúmina, lodos del proceso de hidróxido de sodio que contiene CaCO₃, pirita y otros materiales. Algunos estudios han propuesto también el uso de CCA en el proceso de obtención de cemento Portland. En Ajiwe et al. se formuló cemento Portland con un contenido de 24%w/w de CCA que reemplazaría la sílice; se preparó inicialmente el Clinker a 1400°C en un horno rotatorio y posteriormente moliendo el Clinker conjuntamente con otros aditivos se obtuvo el cemento [49]. En este estudio se determinó que la producción de cemento a partir de la CCA era relativamente barata y el costo era comparable a la realizada con las materias primas habituales [49].

Para esta aplicación, la CCA se ha usado también como fuente de sílice más pura y reactiva para la fabricación de cemento. En el trabajo de Sinyoung et al., se extrajo nano sílice a partir de CCA para utilizarse en la formación cemento belítico [50]. Esta nano sílice extraída de CCA es altamente reactiva, debido a su alto volumen de poros y baja energía de activación de la deshidratación. En el estudio, se usaron dos fuentes de calcio diferentes, carbonato de calcio y nitrato de calcio; ambas formulaciones lograron formar la fase principal del cemento belítico, especialmente al usar nitrato de calcio y a bajas temperaturas de producción (800°C) [50].

B. Fabricación de ladrillos de arcilla

El ladrillo cerámico es un elemento básico del sector de la construcción. Los ladrillos de arcilla cocida son materiales antiguos y muy utilizados, implementados en tabiques y muros de carga en edificios [51]. El amplio uso de depósitos de arcilla natural para la fabricación de ladrillos cocidos ha causado un alarmante déficit de este material natural [52], [53], [54]. La materia prima principal de este tipo de ladrillo



son las arcillas, seguido de los materiales fundentes y arenas, que al mezclarse deben adecuarse y procesarse mediante un moldeo de la pieza, secado y cocción a altas temperaturas. En la Figura 7 se ilustran los principales procesos involucrados en la obtención de ladrillos de arcilla y su secuencia.

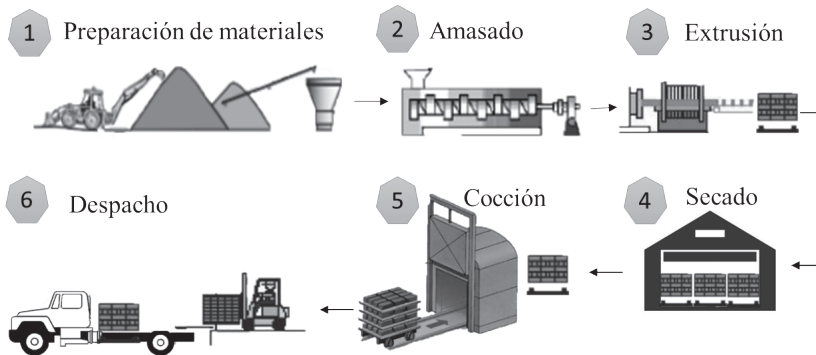


Fig. 7. Procesos de fabricación de ladrillos de arcilla.

Fuente: elaboración propia.

Las propiedades de los ladrillos de arcilla dependen de varios factores: la naturaleza de la materia prima, método de fabricación y proceso de cocción [55]. La influencia de la adición de residuos como la CA y sus cenizas, mazorca de maíz, bagazo de caña de azúcar, cáscara de coco, residuos de té, entre otros, se ha investigado, constituyéndose en materias primas alternativas principalmente como formadoras de poros en el ladrillo, modificando sus propiedades físicas como la porosidad, absorción de agua y conductividad térmica, [56], [57].

Características de la CA como su alto porcentaje de materia volátil, celulosa y porcentajes de absorción de agua entre el 5% y el 16%, la han perfilado como un residuo interesante para adicionar a las mezclas de ladrillos.

La CA se ha agregado en la materia prima para ladrillos, sustituyendo en volumen entre un 5% y 15%, tanto de la CA molida como en su



estado original. Los estudios revelan que los ladrillos de arcilla con CA muestran una densidad menor debido a la alta formación de poros, en comparación con el ladrillo de arcilla de control sin CA. Estos poros también influyen en otra propiedad del ladrillo que es su capacidad de aislamiento térmico. En la Figura 8 se observa los resultados para ladrillos, a partir de la adición de CA molida y sin moler, donde la porosidad aparente incrementa con el aumento del residuo en la mezcla, con valores superiores al 30% y disminuye al aumentar la temperatura de cocción.

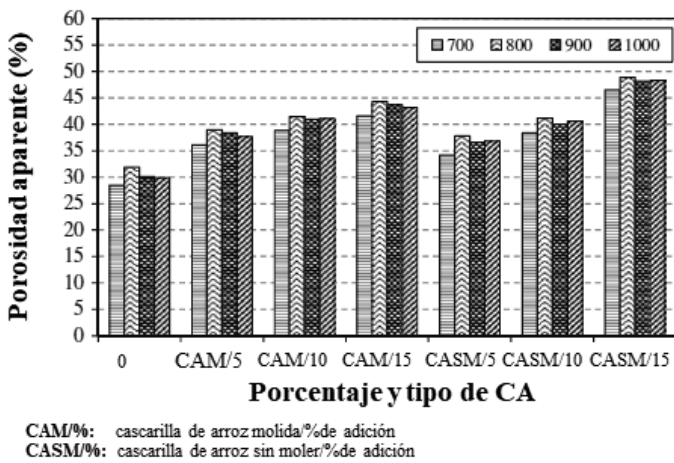


Fig. 8. Porosidad aparente de ladrillos con adición de CA molida y sin moler, del 5% al 15% [56].

La absorción de agua está relacionada con el volumen de los poros conectados a la superficie del ladrillo. La CA se quema durante el proceso de sinterización, y forma poros en la estructura por la emisión de CO_2 . Debido a que la fase líquida disminuirá con la reducción de la cantidad de arcilla, los poros formados no pueden ser llenados completamente. Esto hace que a medida que sea adiciona más cantidad de CA a la mezcla, se aumenta la absorción de agua en el ladrillo fabricado. En la Figura 9 puede observarse este comportamiento [57].



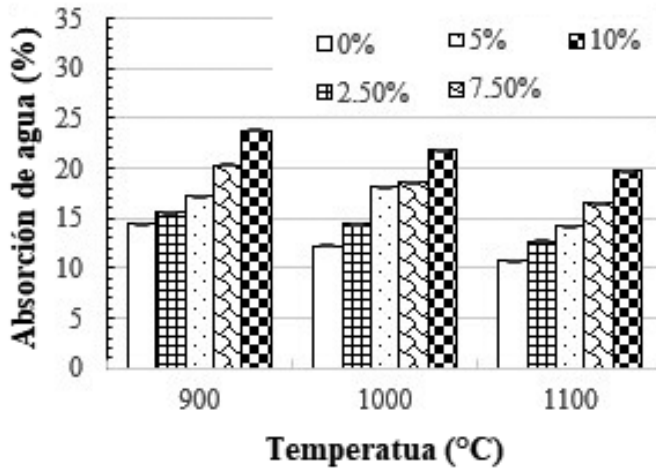


Fig. 9. Absorción de agua de ladrillos con adición de CA del 5% al 10% [57].

Cuando aumenta la adsorción de agua y la porosidad, propiedades mecánicas, como la resistencia a la compresión, disminuyen. Los ladrillos con la adición del 5% y el 10% de CA lograron una resistencia a la compresión de 5-16 MPa, en relación a todos los casos inferior a sin CA, y disminuyó esta propiedad cuando se aumentó el porcentaje de residuo [56], [57].

La adición en mezclas para ladrillos de CCA sola o combinada con otros residuos también se ha analizado. La adición de CCA en la mezcla de ladrillos tiene influencia sobre la plasticidad y que es importante para el proceso de moldeado del ladrillo. El valor del índice de plasticidad (PI) se utiliza para clasificar el suelo (arcilla) según esta. Los rangos de plasticidad baja para suelos en ausencia de CCA se encuentran entre 5% y 30% y se observó que al adicionar CCA, el PI se mantiene en estos límites. Este comportamiento puede observarse en la Figura 10 (A - G), las curvas muestran resultados de varias investigaciones donde se adicionan porcentajes de CCA entre 5% y 20%, manteniendo el índice de plasticidad dentro de los límites que permite el moldeado. La contracción lineal disminuye también, con la adición de CCA en las mezclas. Puede



notarse que a partir del 10% de reemplazo, principalmente la plasticidad de la mezcla disminuye más drásticamente.

A pesar de esta disminución en la plasticidad, el ladrillo puede fabricarse con CCA sin perder el comportamiento plástico de la mezcla para poder ser moldeada permitiendo su procesamiento [30].

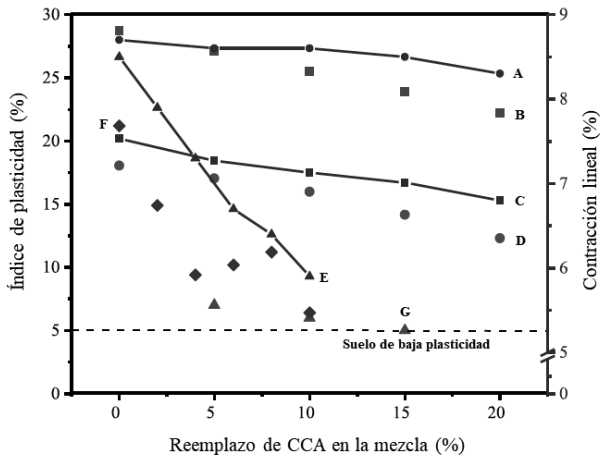


Fig. 10. Comportamiento plástico de las mezclas para ladrillos con CCA resultado de varias investigaciones [30].

La adición de CCA permite aumentar la relación $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ en la mezcla de arcilla y mejorar las características de resistencia de los ladrillos de arcilla cocida. Esto en el caso de que la sílice de la CCA sea de tipo amorfo, si tiene un alto porcentaje de sílice cristalina, puede comportarse como material de relleno. Con la adición de la CCA, varios estudios reportan que un porcentaje adecuado para que las propiedades del ladrillo sean aceptables, se encuentra entre 4% y 5% en peso en mezcla, obteniéndose mejoras de 30% en la resistencia a la compresión y absorción de agua moderada (alrededor de 19%). Con 4% de CCA, el ladrillo muestra una reducción de la temperatura interior de 6 °C y una reducción del ruido de 10 dB en comparación con el ladrillo convencional de arcilla cocida. Los ladrillos con CCA



muestran mejores propiedades estructurales, térmicas y acústicas que los ladrillos de arcilla convencionales [58], [30].

La adición de CCA y ceniza de bagazo de caña, en la producción de ladrillos de arcilla, no logró mejoras en cuanto a la resistencia de la compresión y módulo de rotura; sin embargo, se fabricó un ladrillo bastante ligero, y utilizarlo podría contribuir a una reducción de cargas estructurales y lograría una construcción más sostenible y económica de mampostería. La Tabla 6 desarrolla algunas propiedades obtenidas para estos ladrillos. La resistencia a la compresión y módulo de ruptura disminuyeron a medida que aumentaba la adición de los materiales de desecho en la mezcla de arcilla. Estas propiedades señalaron los mejores resultados cuando los ladrillos fueron los producidos con un 5% por peso de arcilla con CCA y ceniza de bagazo de caña. [51], [59]. La Figura 11 muestra los ladrillos frescos sin pasar por el proceso de secado y cocción.

TABLA 6. PROPIEDADES DE LADRILLOS DE ARCILLA CON CCA Y CENIZA DE BAGAZO DE CAÑA [59]

Propiedades	Ladrillo convencional	Ladrillo con CCA/ Ceniza bagazo caña
Peso por unidad de área (kg/m ²)	97,13	91,15
Resistencia a la compresión (MPa)	8,38	5,10
Módulo de ruptura (MPa)	1,49	0,72
Absorción de agua (%)	17,45	20,93
Porosidad aparente (%)	35,83	39,71
Pérdida de peso en 50 ciclos de congelamiento-descongelamiento	9,12	13,85



La porosidad y absorción de agua aumenta tras la incorporación de estos residuos. No obstante, los cerámicos obtenidos pueden ser usados como ladrillos resistentes a climas moderados. Los ladrillos porosos suelen tener mejores propiedades de aislamiento que los que presentan menores porosidades.



Fig. 11. Ladrillos de arcilla frescos con CCA y bagazo de caña [59].

C. Estabilización de suelos

Como base estructural de cualquier construcción los suelos son uno de los aspectos más importantes a estudiar en cualquier proyecto de infraestructura; por esto, se añaden a estos estabilizadores, preferiblemente agentes cementantes como cemento Pórtland, cal y el asfalto para mejorar sus propiedades de ingeniería.

La estabilización de suelos con CCA ofrece resultados muy positivos con respecto a las mejoras que causa en los suelos, cuando sus condiciones naturales podrían ocasionar problemas en las construcciones y por su baja capacidad de soporte [60], [61]. Por ejemplo, las acillas expansivas son altamente peligrosas y provocan daños en obras civiles existentes; especialmente, genera fallas y problemas a nivel de cimentaciones



de la estructura [62], [63]. Para estabilizar este tipo de suelos de alto potencial expansivo, se ha usado la CCA y ceniza volcánica. Estas dos puzolanas naturales se mezclaron con el suelo en proporciones del 10%, 20% y 30% de ambas puzolanas en composiciones iguales. Con estas adiciones se ha determinado que varios parámetros físicos y mecánicos cambiaron en el suelo arcilloso, reduciendo su límite líquido y plástico, la expansión volumétrica, gravedad específica y densidad seca máxima, e incrementando su resistencia a la deformación y al deslizamiento. Este comportamiento deriva en la estabilización de estas arcillas con comportamiento expansivo [64]. Aponte y Calderon analizan otro tipo de suelo limoso de baja plasticidad, con la adición del 12% de CCA. Esta adición modificó su resistencia y fue posible estabilizarlo.

La adición de estas puzolanas al suelo, hacen que su estructura sea más aglomerada y compacta, evitando el ingreso de agua a los poros y disminuyendo la expansión del suelo [18]. Generalmente, la estabilización del suelo se hace mediante la combinación de diferentes materiales. La adición de CCA como único material requeriría una gran cantidad para la estabilización del suelo. Estas combinaciones y las cantidades óptimas de CCA, encontradas en varios estudios se detallada en la Tabla 7.

TABLA 7. USO DE LA CCA COMO ESTABILIZADOR DE SUELOS [30]

Tipo de suelo	Estabilizador(es)	Cantidad recomendada de CCA (%)
Laterítico	CCA	18
	CCA+fibra de sisal	8
Granítico	CCA+cemento	20
Arcilloso	CCA	16-20
	CCA+cal	10-20
	CCA+cal+escoria de acero	10
Limoso	CCA+cal+fibra de plástico	12
	CCA+cal	25



Tipo de suelo	Estabilizador(es)	Cantidad recomendada de CCA (%)
Arenoso	CCA+cal	20
Aluvial	CCA	7,5

6. USOS EN LA FABRICACIÓN U OBTENCIÓN DE MATERIALES

A. Fabricación de cerámicos avanzados

Los materiales cerámicos tienen una gran variedad de aplicaciones que van desde la fabricación de materiales para la construcción, hasta aplicaciones de mayor desempeño como materiales refractarios, aislantes, aplicaciones eléctricas y electrónicas, materiales ferroeléctricos o piezoeléctricos, etc.]

Las características químicas, morfológicas y mineralógicas de la CCA varían según el equipo de transformación térmica y los parámetros del proceso durante la quema de la cascarilla [5]. Su composición alta en sílice (entre 80% y 95%), la resistencia química y a los choques térmicos, y su baja conductividad térmica, la convierten en un material adecuado para ser utilizada como materia prima en procesos industriales de cerámica avanzada como los aislantes térmicos [3].

En la fabricación de aislantes térmicos a partir de CCA, se comparó con aislantes a partir de otras fuentes de sílice, como la diatomea [3]. Los aislantes térmicos se fabricaron a partir de diferentes formulaciones con CCA, aditivos y aglutinantes, plastificantes, aserrín de madera, agua y fundente. Se usaron dos tipos de moldeo, extrusión y prensado; dos temperaturas de sinterización 1350°C y 1250°C. Finalmente, las piezas se enfriaron a temperatura ambiente. El proceso usado en este estudio es típico para la obtención de piezas de cerámica avanzada como los aislantes térmicos y se ilustra en la Figura 12.



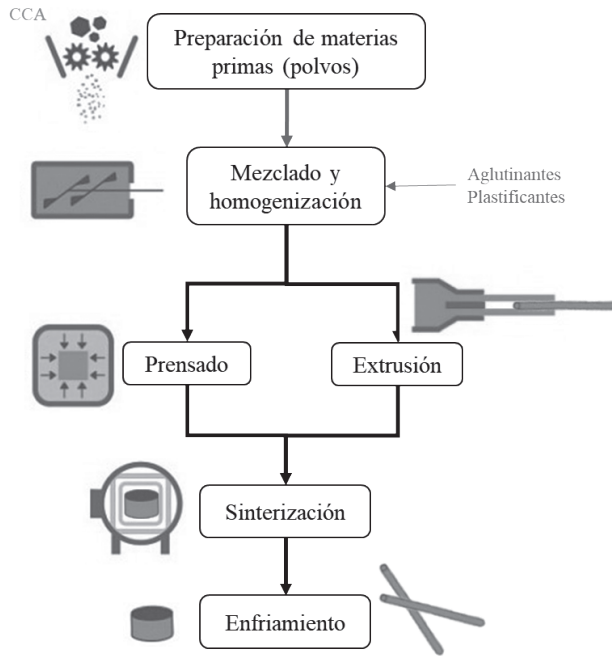


Fig. 12. Proceso de fabricación de aislantes térmicos con CCA.

Fuente: elaboración propia.

Los aislantes térmicos obtenidos con CCA presentaron una conductividad térmica baja, pero mayor al aislante térmico comercial de sílice de diatomeas, debido a la presencia de poros de mayor tamaño y forma irregular que se presentaron. Otras propiedades que se analizaron, se pueden observar en la Tabla 8, presentaron alta porosidad, baja densidad aparente y baja resistencia a la compresión [3].



TABLA 8. PROPIEDADES FÍSICAS Y MECÁNICAS DE AISLANTES TÉRMICOS A PARTIR DE CCA Y COMERCIALES [3]

Característica	Aislante extruido con CCA	Aislante prensado con CCA	Aislante comercial*
Densidad aparente (kg/m ³)	660	464	392
Porosidad (%)	70	75	73
Resistencia a la compresión (kgf/cm ²)	6,6	3,9	8,0
*Fabricado con sílice de diatomeas.			

Otros materiales susceptibles de fabricar a partir de CCA como materia prima son los vitrocerámicos. Estos son materiales cerámicos avanzados que combinan propiedades de los cerámicos cristalinos con la de los vidrios. Se obtienen como los vidrios, pudiéndose conformar fácilmente, pero luego, mediante un proceso térmico controlado, puede cristalizar hasta el 90 % de la masa vítrea.

Para fabricar este tipo de cerámicos, utilizaron cenizas de carbón y CCA para sintetizarlos [66]. En la Figura 13 se muestra el procedimiento realizado, utilizando CaO/SiO₂ y SiO₂/Al₂O₃ para la formación de las fases cristalinas. Con el fundido a 1450°C se forma la fase vítrea y al sinterizar se constituyen las fases cristalinas. En las pruebas con SiO₂/Al₂O₃ más alta, se inhibe la cristalización de estas fases, lo que afecta significativamente a las propiedades finales del material. Por otro lado, las muestras con proporciones molares CaO/SiO₂ más altas, pero con proporciones más bajas de SiO₂/Al₂O₃, dan como resultado la formación de anortitas y albitas [66].



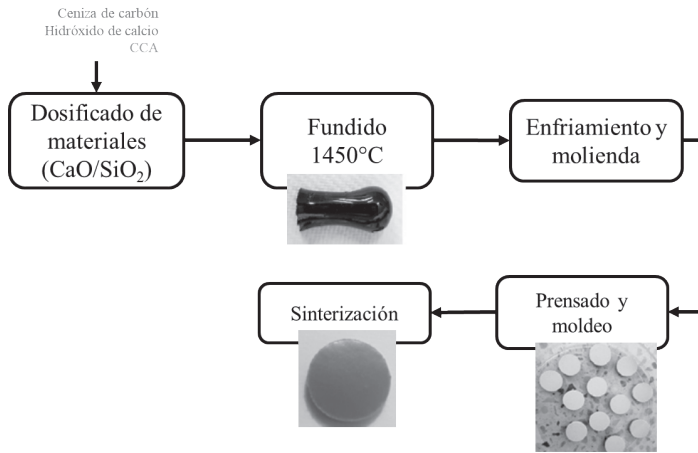


Fig. 13. Procedimiento usado para preparar materiales vitro-cerámicos de CCA y cenizas de carbón [66].

Los valores promedio para las características físicas y mecánicas de las vitrocerámicas obtenidas usando CCA se pueden observar en la Tabla 9.

TABLA 9. PROPIEDADES FÍSICAS Y MECÁNICAS DE LAS VITRO-CERÁMICAS [66]

Característica	Unidad de medida
Densidad	2607 – 2739 kg/m ³
Absorción de agua	< 0,1%
Dureza de Vickers	> 600 Mpa
Rigidez (prueba de nanoindentación)	96 Gpa
Resistencia a la fractura (K_{ic})	0,39 – 0,59 Mpa/m
Durabilidad química (expuestas a HCl y NaOH)	Aprox. 0,5 mg/cm ²

Los resultados de las características de los productos vitrocerámicos fabricados mostraron que son aptos para aplicaciones como materiales de construcción, azulejos, placas cerámicas, revestimientos, entre otros [66].



B. Producción de sílice

Los silicatos están compuestos de sílice y oxígeno. La sílice puede existir en formas amorfas, cristalinas y gelatinosas. Se utiliza como precursor de varios materiales ópticos, revestimientos o películas finas en la electrónica. También se utiliza comúnmente en otros campos como catalizadores, agentes anticorrosivos, cromatografía y cerámica. La extracción/producción de sílice convencional de la arena o el cuarzo tiene varias desventajas: el alto consumo de energía y la contaminación ambiental.

Numerosos vegetales están compuestos por sílice, principalmente para cumplir funciones estructurales o para aumentar su resistencia. Varios métodos han sido reportados para la producción de sílice a partir de residuos agrícolas. La sílice puede obtenerse mediante tratamiento térmico a temperaturas elevadas o puede extraerse de la CA en forma de silicato de sodio (Na_2SiO_3) a través de métodos químicos. La morfología de la sílice obtenida varía significativamente según la temperatura, el tiempo y condiciones de proceso. Normalmente, la sílice amorfa se estructura entre 550°C y 800°C y la sílice cristalina se produce a una temperatura de alrededor de 900°C o superior. La sílice amorfa y cristalina tienen diferentes propiedades y, por ende, diferentes posibles usos. Un resumen de los métodos térmicos y químicos se describe en la Figura 14 [67].



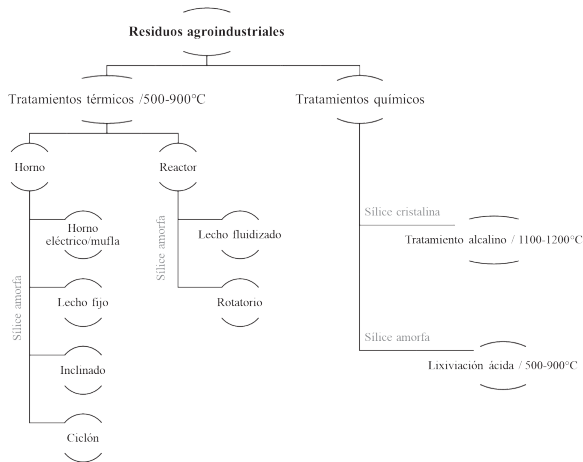


Fig. 14. Tratamientos usados para la obtención de sílice a partir de residuos agroindustriales [67].

El alto contenido de sílice de la CA y sus cenizas, la convierte en un residuo susceptible para la obtención de este producto en sus estructuras cristalina y amorfa, de tamaños del orden micro y nanométrico mediante diferentes métodos. Los procedimientos comunes para extraer sílice a partir de la CA se resumen en la Figura 15, incluida la eliminación de impurezas antes y después de los tratamientos térmicos comunes para producir la CCA.

De los diversos métodos de síntesis, el método químico es la técnica más exitosa y sencilla para sintetizar nanopartículas de sílice ultrafinas a partir de CCA. El tratamiento de CA con una solución de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico (lixiviación ácida), o de hidróxido de amonio o hidróxido sódico (tratamiento alcalino) pueden realizarse antes del térmico. Estos procesos pueden ser muy eficaces para eliminar la mayoría de las impurezas metálicas y acelerar la hidrólisis de la hemicelulosa y la celulosa en la CA. Esto permite producir una sílice de alta pureza de alta área específica y completamente incolora [68], [69].



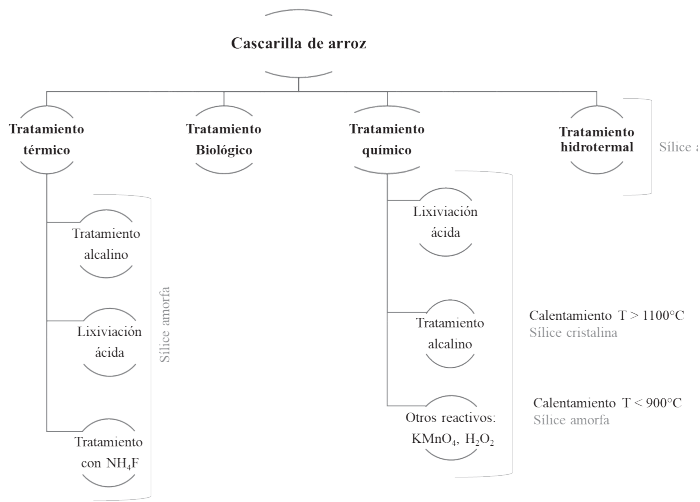


Fig. 15. Tratamientos usados para la obtención de sílice a partir de CA [70].

Muchos autores han llegado a la conclusión de que la CA es una fuente excelente de sílice amorfa de alto grado. La aplicación y el valor de diversos productos de sílice están muy relacionados con su cristalinidad y su microestructura. Las aplicaciones directas de la sílice cristalina son limitadas debido a su baja reactividad. Sin embargo, la sílice amorfa, en particular las que tienen gran superficie específica (porosa y/o con un tamaño de partícula pequeño) son de gran interés para muchas aplicaciones en varias industrias como la química, cerámica, producción de acero, farmacéutica, caucho, plástico, materiales refractarios, cemento, pinturas, jabones, compuestos de polímeros, refinado de aceites vegetales, etc. [71], [72], [73].

C. Obtención de carbón activado

El carbono activado (AC, por sus siglas en inglés, *activated carbon*) se ha utilizado para el tratamiento de aguas residuales, agua potable y eliminación de una amplia variedad de contaminantes. Es uno de los adsorbentes más populares que ha tenido un éxito considerable y se ha utilizado ampliamente debido a su gran capacidad de adsorción.



Sin embargo, particularmente en los países en desarrollo, la aplicación del AC comercial como adsorbente es limitada debido a su alto costo y a la pérdida del 10-15 % durante la regeneración. Por esto, se ha optado por encontrar fuentes alternativas para su obtención. Una de estas fuentes es la CCA.

Generalmente, la fabricación de AC implica dos procesos principales, la carbonización de los materiales de carbono en bruto en una atmósfera inerte y la activación del producto carbonizado. Para la activación se usan procesos físicos (con empleo de CO_2 , vaporizador) y químicos (KOH/NaOH, K_2CO_3 , ZnCl_2 , H_3PO_4). La activación química se aplica ampliamente debido a su baja temperatura de activación y a su alto rendimiento comparado con la activación física [74], [75], [76]. Los procesos de obtención del AC a partir de la CA se ilustran en la Figura 16.

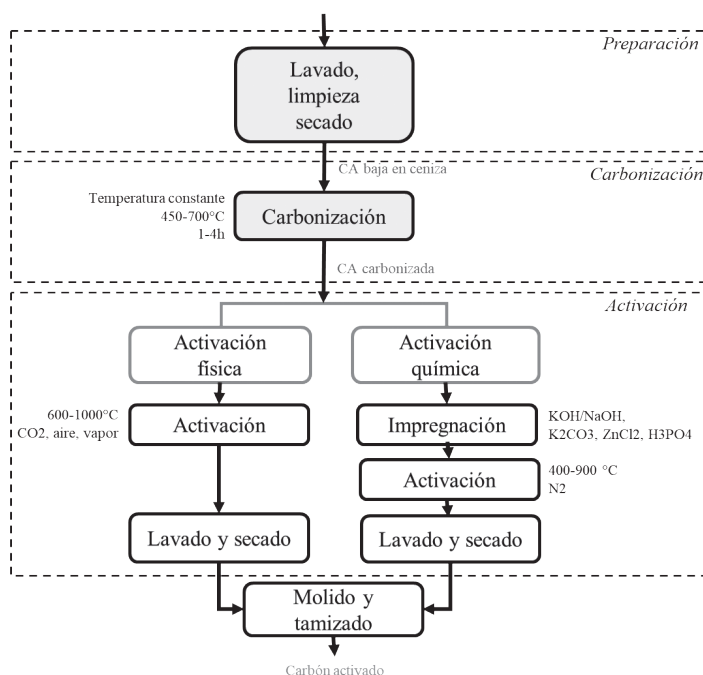


Fig. 16. Principales procesos usados para la obtención de carbón activado a partir de CA., Fuente: elaboración propia modificado [74], [75].



7. USOS EN EL SECTOR ENERGÍA Y COMBUSTIBLES

En esta sección se profundiza en investigaciones realizadas para procesos industriales que se enfocan en el uso de CA y sus cenizas para la producción de diversos tipos de combustibles y aprovechamiento energético.

A. Producción de combustible sólido

Debido a la crisis energética, es necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de energías alternativas y más amables con el medio ambiente, que permitan el desarrollo de los diferentes sectores económicos. Una alternativa es el desarrollo de biocombustibles sólidos, los cuales podrían ser usados en centrales eléctricas tradicionales, reemplazando el carbón y donde la infraestructura actual de la planta puede ser utilizada [77].

Los pellets, por ejemplo, son un biocombustible densificado y fabricado con biomasa molida, con o sin aditivos y generalmente de forma cilíndrica como se ilustra en la Figura 17, con longitud entre 5 y 40 mm [78]. Este biocombustible tiene la característica de ser altamente durable, según la naturaleza de la materia prima y condiciones ambientales (humedad, temperatura, entre otros) [79].

Se realizó un estudio de fabricación de pellets con diferentes mezclas de biomasa, entre ellas la CA [77]. Cuando se combinó CA con paja de trigo, se exhibieron los valores más altos de humedad, volatilidad, carbono orgánico total, contenido total de nitrógeno y valores de poder calorífico. Las combinaciones de varias biomasa pueden mejorar las propiedades energéticas del combustible sólido de biomasa [80]. La adición de CA permite una alta generación de H_2 y menor contenido de CO_2 en la combustión de estos pellets, proporcionando una mayor estabilidad del gas generado debido a una mayor densidad energética, en comparación al gas tradicional producto de derivados del petróleo o del carbón [81].





Fig. 17. Pellets de biomasa [77].

Otro combustible sólido desarrollado son las briquetas [82]. La sustitución de la leña por briquetas puede reducir la deforestación y las emisiones de gases de efecto invernadero, así como la tasa de enfermedades respiratorias y pulmonares. Residuos como la CA podría sustituir combustibles contaminantes convencionales, como la leña y el carbón, lo que aumentaría la eficiencia en el sector doméstico. Otras ventajas de la utilización de la biomasa en forma de briquetas: facilidad de manipulación, transporte y almacenamiento, el aumento de la densidad energética y la mejora de la combustibilidad y la uniformidad de tamaño.

El proceso para la fabricación de estos elementos comienza con la conversión de la CA en un polvo fino, mediante su molienda en un molino de martillos. Luego se mezcla el polvo fino con agua y una sustancia aglomerante. La mezcla pastosa formada es puesta en una prensa briqueteadora. Finalmente, la briqueta necesita ser secada para reducir el contenido de agua. El secado puede realizarse al aire libre o en un secador eléctrico [11], [83]. Algunas características típicas de las briquetas fabricadas con CA se muestran en la Tabla 10, sus dimensiones y forma en la Figura 18.



TABLA 10. PRINCIPALES CARECTERÍSTICAS TÉCNICAS DE LAS BRIQUETAS FABRICADAS A PARTIR DE CA [83], [84]

Característica	Unidad de medida
Poder calorífico	5.000 – 6.000 Kcal/Kg
Diámetro	3 – 200 cm
Largo	15-50cm
Densidad	360-600 Kg/m ³
Apariencia física	Áspera

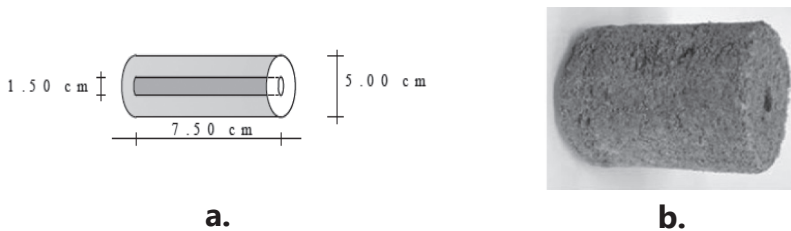


Fig. 18. Dimensiones y forma de la briqueta de CA [83], [85].

En países en vía de desarrollo, la mayoría de los residuos agrícolas que se queman como combustible se utilizan en su estado natural con algún tratamiento previo como el secado y el corte. En comparación con los combustibles de madera, los residuos agrícolas suelen tener un alto contenido de materia volátil y cenizas, una menor densidad y valores energéticos más bajos. Las estufas convencionales están diseñadas principalmente para quemar leña o carbón [86]. El uso directo de residuos sólidos de biomasa sin procesar para cocinar en estufas de leña tiene algunas ventajas y desventajas, como se muestra en la Tabla 11.



TABLA 11. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE USO DE RESIDUOS AGRÍCOLAS COMO COMBUSTIBLE DOMÉSTICO [86]

Ventajas	Desventajas
Disponible gratuitamente para las familias rurales pobres.	Contaminación del aire cuando se queman en fuegos abiertos o en estufas mejoradas tradicionales.
Forma útil de eliminar los residuos de las cosechas en el campo, en lugar de quemarlos in situ.	La disponibilidad estacional de los residuos de las cosechas puede ser un límite para su uso.
Fácil de manejar y transportar	Menor tiempo de combustión.
Bajo impacto en el tiempo de las mujeres para la cosecha.	Muy voluminoso (problemas de transporte y almacenamiento).
Combustión limpia en las estufas de gasificación.	

A. Combustible o energía alternativa

Diversos estudios demuestran que las propiedades térmicas de la CA son aprovechables para usos domésticos e industriales [87].

Las tecnologías de conversión para la producción de energía, incluyen calentamiento por combustión directa, generación de energía por ese medio, gasificación y generación de energía (motor de gas, turbina de vapor, pila de combustible), gasificación y producción de metanol, la pirólisis instantánea, la hidrólisis ácida y la fermentación de etanol, y la co-combustión. Solo dos de estas tecnologías, el calentamiento por combustión y la combustión directa son ahora ampliamente utilizadas [75].

La gasificación de la biomasa (es decir, la combustión calefacción) no está tan madura como las tecnologías de combustión, pero se ha desplegado en muchas partes del mundo en desarrollo. Cada tonelada de CA gasificada puede ahorrar alrededor de 1t de emisiones de gas de efecto invernadero (CO₂), en comparación con los usos actuales [88].



La gasificación indica que el gas de síntesis es el principal producto energético, ya que está compuesto por CO , H_2 , CH_4 y una mezcla de otros gases menores; también se produce un residuo de carbón en la gasificación, aunque con menor contenido de carbono que el carbón de pirólisis. El gas de síntesis puede utilizarse en un motor de combustión interna para producir calor, o en un sistema de cogeneración para producir calor y electricidad. La gasificación de la paja y la CA incluye tres pasos: 1. La gasificación de la biomasa, que convierte la CA en gas de síntesis. 2. La purificación del gas natural sintético: el gas productor que sale del gasificador suele contener contaminantes como polvo, coque y alquitrán, pero estos son eliminados por el sistema de purificación para asegurar el funcionamiento normal del motor de gas. 3. La generación de energía en un motor de gas. Estos pasos se ilustran en la F; el gas de escape de alta temperatura puede ser reutilizado por la caldera de calor residual para generar vapor o agua caliente para uso civil o industrial [89], [90], [91].

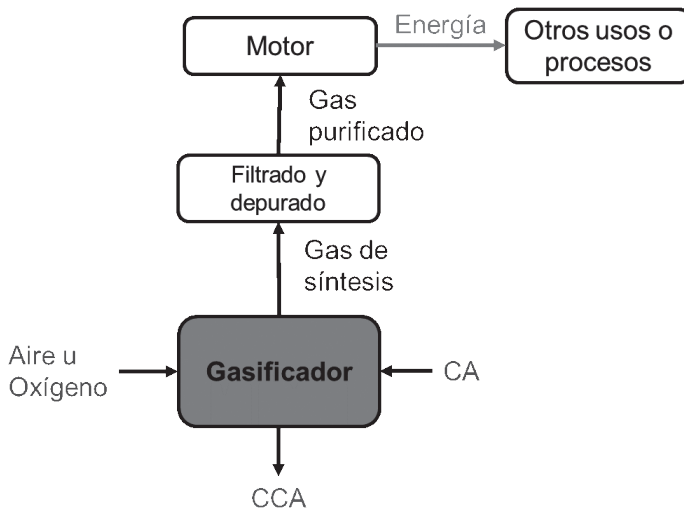


Fig. 19. Sistema de energía del gasificador de biomasa de CA [75].



Las características de la CA permiten también considerarla como una fuente de energía mediante pirólisis. La pirólisis es un proceso térmico en el que la materia orgánica se descompone en presencia de altas temperaturas y ausencia de oxígeno. Existen diferentes tipos de pirólisis, pero los estudios indican que la tecnología más adecuada para la CA es la pirólisis rápida. Esto debido a su mayor contenido de celulosa y hemicelulosa en comparación con la lignina y debido a un mayor contenido de materias volátiles que el contenido de carbono fijo. La pirólisis rápida se produce en muy pocos segundos y la biomasa se descompone en aerosoles, vapores y carbón vegetal, obteniendo tres subproductos: bio-aceite, gas de síntesis y bio-carbón [92], [93]. El bio-aceite se considera una fuente de biocombustibles de segunda generación. El gas de síntesis puede recircularse o utilizarse como combustible en las calderas, en los procesos de secado de la biomasa y como materia prima para la producción de hidrógeno. En la Figura 20, se ilustra el proceso de pirólisis de CA; los porcentajes de subproductos son rangos obtenidos de varias investigaciones.

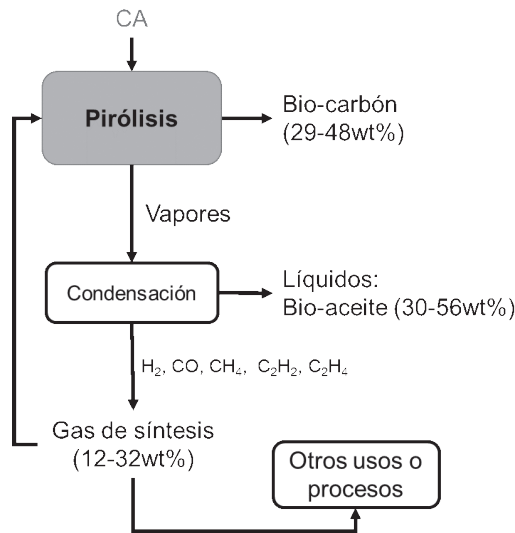


Fig. 20. Proceso de pirólisis de CA y subproductos obtenidos [84].



Los hornos de combustión directa se utilizan ampliamente en los procesos agroindustriales (café, arroz, caña de azúcar, etc.). Estos hornos tienen una cámara de combustión, en donde se quema la biomasa y se obtiene calor. El calor liberado puede utilizarse directa o indirectamente, a través de un intercambiador de calor para la operación de secado, ya sea para granos o productos agrícolas en general [84].

Para el secado del grano de arroz, los hornos más usados en la industria arrocera funcionan con diésel y energía eléctrica, lo cual resulta en un alto consumo energético; por tales motivos, se hace necesaria la búsqueda de otras alternativas viables para remplazar las fuentes de energía para llevar a cabo el secado del grano con iguales o mejores estándares de calidad [94]. Díaz et al. realizaron el diseño de un horno de secado del grano de arroz, que utiliza CA como combustible principal. Para su funcionamiento se aprovecha la transferencia de calor de la combustión de la CA hacia el horno. Este combustible alternativo produce menos contaminación, teniendo en cuenta que se generan emisiones de 864 kg de CO₂, comparado con 13.600 kg de CO₂ cuando se usa diésel como combustible [95], [87].

Otra opción para obtener energía alternativa a partir de CA es la producción de bioetanol o biogás. El desarrollo de enfoques rentables para la producción de biomasa a biocombustibles sigue siendo el principal obstáculo que impide su comercialización generalizada.

La CA es un material lignocelulósico compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Solo la celulosa y las hemicelulosas son constituyentes que producen etanol, mientras que la lignina y las cenizas de la CA pueden convertirse en energía por combustión o en otros productos secundarios. Mediante la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa, se liberan azúcares monoméricos que pueden convertirse en etanol por fermentación o en biogás por digestión anaeróbica [96]. La producción de etanol para el mercado energético se ha realizado tradicionalmente a partir de la biomasa del maíz y la caña de azúcar. Recientemente, se ha criticado el uso de esta biomasa como materia



prima energética debido a la amenaza competitiva contra el suministro de alimentos. Al mismo tiempo, la producción de etanol a partir de biomasa celulósica como la cascarilla de arroz ha sido de gran interés. Las rutas de conversión de la CA en etanol se pueden observar en la Figura 21.

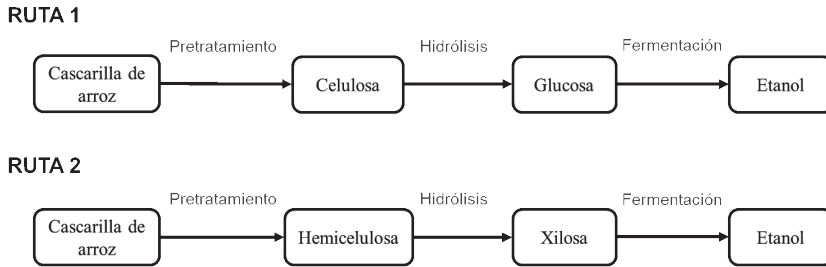


Fig. 21. Rutas de conversión de CA en etanol [96].

Es necesario un proceso de pretratamiento eficiente para acelerar la degradación de la biomasa y mejorar el rendimiento de biogás o bioetanol producido en las etapas posteriores. Existen diversas investigaciones sobre la caracterización de la materia prima, tras aplicar pretratamientos físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, a pesar de los muchos beneficios de la etapa de pretratamiento, el alto coste relacionado con este proceso sigue siendo un gran reto para la comercialización de los biocombustibles de segunda generación. Por lo tanto, sigue siendo necesario el desarrollo de métodos de pretratamiento ecológicos y de bajo coste en la producción de biogás y bioetanol [97].

Para la producción de bioetanol, es necesario pretratar la biomasa antes de la hidrólisis enzimática y la fermentación de la glucosa (Figura 21). El pretratamiento se realiza para eliminar una cierta cantidad de lignina y hemicelulosas para mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. Se han aplicado diferentes técnicas para el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos que implican el uso de ácidos, álcalis, enzimas y/o microorganismos, ultrasonidos y plasma; se han



probado temperaturas y presiones entre moderadas y altas [98]. El pretratamiento alcalino se utiliza en condiciones más suaves que los pretratamientos ácidos. Los reactivos más utilizados son el amoníaco sódico y los hidróxidos de calcio y de sodio [99], [100].

Tras el pretratamiento de la CA, se lleva a cabo la sacarificación o hidrólisis enzimática, que consiste en escindir los polímeros de celulosa y hemicelulosas con la ayuda de enzimas y, a continuación, el azúcar liberado durante la hidrólisis se convierte en etanol mediante la fermentación. Se ha reportado la conversión en etanol de paja de arroz y CA mediante la sacarificación y fermentación (SSF) o por hidrólisis enzimática y fermentación separadas (SHF). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* seguida de otras, como *Kluyveromyces marxianus* y la bacteria *Zymomonas mobilis* son los microorganismos más conocidos para la producción de etanol [99], [100], [101].

Por otro lado, la digestión anaeróbica de residuos agrícolas y otros desechos biodegradables, se utiliza ampliamente como la mejor opción de tratamiento porque produce metano y biogás rico en CO₂ que es adecuado para la producción de energía [102]. Los residuos de arroz (paja de arroz, CA y residuos de arroz del proceso de secado) son potencialmente una importante fuente de carbono para la digestión anaeróbica. Sin embargo, algunas investigaciones mediante análisis de biodegradabilidad, apuntan a que la CA no es un sustrato apropiado para la digestión anaeróbica, en comparación con los demás residuos del arroz. La paja de arroz y los residuos del proceso de secado, muestran mejores rendimientos en la producción de biogás y metano. Además de otros factores, el contenido de lignina presente en la CA influye en este rendimiento [103], [104]. Lo anterior se ilustra en la Tabla 12.



TABLA 12. RENDIMIENTOS DE PRODUCCIÓN DE BIOGÁS Y METANO MEDIANTE DIGESTIÓN ANAERÓBICA DE RESIDUOS DEL ARROZ [103]

Residuo	Rendimiento m ³ kg-				Contenido de lignina del residuo (%)
	Condiciones mesofílicas* (37°C)		Condiciones termofílicas* (55°C)		
	Biogás	Metano	Biogás	Metano	
Paja de arroz	0,436	0,226	0,518	0,298	10,8
Residuos de arroz del secado	0,320	0,168	0,364	0,196	13,4
CA	0,044	0,019	0,075	0,044	24,3

*36 días de retención en reactores anaeróbicos discontinuos.

Debido a la baja biodegradabilidad de los materiales lignocelulósicos, son pocos los autores que evalúan la digestión anaeróbica de la CA con el objetivo de producir bioenergía y se tiene claro la necesidad de pretratamiento de este residuo para tener mejores rendimientos [105].

Okeh et al. evaluaron los efectos de diversos parámetros, como la dilución en agua, el pH inicial, los metales pesados y las fuentes de nitrógeno, en el rendimiento del digester. La proporción de dilución de materia prima en agua de 1:6 p/v y el pH inicial de 7 dio el máximo rendimiento de biogás de 382 y 357 ml/día, respectivamente. La adición de metales pesados (Ni², Zn², y Cu²) mejoró el rendimiento del digester. Con Ni² (100 ppm) se obtuvo el mejor rendimiento de biogás. Los valores máximos de la tasa de producción de biogás fueron de 30 y 69 ml/día y el uso de excrementos de aves de corral como suplementos de nitrógeno, mejoró la generación de biogás.

En la producción de biogás y el contenido de metano a partir de CA, se mejoraron mediante pretratamientos químicos en estado sólido. Los pretratamientos alcalinos (con NaOH) y organosolventes (C₂H₅OH) mejoraron la calidad del biogás con contenidos de metano de 50,27 y 50,68% [107].



Otros autores proponen un pretratamiento biológico de la CA, como la inoculación de hongos aislados como Pleu1 y Shi2. Este último mostró aumentos de aproximadamente 4,5 veces en el potencial bioquímico de metano en comparación con la CA no inoculada [108].

Las tecnologías emergentes para el pretratamiento de la lignocelulosa ofrecen resultados prometedores; sin embargo, el alto coste de capital y la falta de disponibilidad de datos de eficiencia comparativa de estos métodos en diferentes sustratos, como la CA, presentan importantes obstáculos para su comercialización. Recientemente, las tecnologías combinadas para el pretratamiento de la biomasa han mostrado un mejor rendimiento que un solo método, esto podría hacer realidad las perspectivas de futuro de las aplicaciones industriales a gran escala [105].

De manera general, se han reportado ventajas y desventajas asociadas a la obtención de biocombustibles (bioetanol, biogás) de segunda generación obtenidos de residuos agrícolas como la CA. Las más relevantes se pueden observar en la Tabla 13.

TABLA 13 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES DE SEGUNDA GENERACIÓN [109], [110]

Ventajas	Desventajas
No hay competencia con los alimentos.	Altos costos de transporte.
Mayor rendimiento y menor necesidad de tierra	Se requieren procesos complejos y costosos para el pretratamiento.
Materias primas disponibles en grandes cantidades.	Baja conversión en comparación con el combustible de petróleo
La materia prima puede producirse fácilmente con la infraestructura y la tecnología ya existentes	Las tecnologías de conversión están en desarrollo.



Ventajas	Desventajas
Bajo coste de la materia prima. Seguridad energética	Falta de avances tecnológicos y de investigación.
Producción de productos de alto valor añadido	Falta de tecnologías eficientes para aplicaciones comerciales
Reduce la generación de gases de efecto invernadero.	Emisión de óxido nitroso por la descomposición de fertilizantes nitrogenados.

8. USOS EN LA AGRICULTURA Y APLICACIONES MEDIOAMBIENTALES

En esta sección se describen dos usos importantes de la CA y sus cenizas para el acondicionamiento de suelos y como materiales adsorbentes de diversos contaminantes.

A. Acondicionamiento de suelos

Ciertas actividades antropogénicas, principalmente agrícolas e industriales, como la minería y refinado de metales, obtención de hidrocarburos, tratamiento de cultivos con plaguicidas, entre otros, que tienden a causar contaminación en los suelos [111]. Esto representa una amenaza a la salud humana y al ecosistema, debido a la alta toxicidad que causa y a la disminución de la fertilidad de los suelos [112], [113]. La CA se ha usado como fertilizante complementario para suelos. Tal como se describió en la sección anterior, al pirolizar la CA se obtiene biocarbón. El biocarbón es un material sólido obtenido a partir de la combustión incompleta de la biomasa. La creciente necesidad por sustituir los fertilizantes químicos por los de origen orgánico, ha puesto al biocarbón como una estrategia efectiva a corto plazo en el campo de la agricultura y el manejo de suelos. Dentro de las propiedades del biocarbón se encuentran la capacidad para aumentar la fertilidad del suelo y la disponibilidad de nutrientes. Se ha demostrado que la



aplicación de biocarbón a suelos mejora la productividad y calidad de las plantas, efectos atribuidos a los aumentos de capacidad de intercambio catiónico (CIC), pH, cantidad de materia orgánica, retención de nutrientes, disminución de la lixiviación y el desarrollo y de las comunidades microbianas del suelo [75], [114].

El carbono residual en el biocarbón puede persistir en los suelos durante largos períodos de tiempo. Se utiliza como enmienda del suelo para mejorar sus características, las más importantes se describen en la tabla 14.

TABLA 14 PRINCIPALES BENEFICIOS DEL BIOCARBÓN DE CA EN EL SUELO [114].

Característica del suelo	Efecto del biocarbón
Densidad	Incrementa la porosidad del suelo y la densidad aparente.
Absorción	Absorbe 5 a 6 veces más en peso.
Fertilidad del suelo	Mejora la fertilidad del suelo, estimulando el crecimiento de las plantas.
Necesidad de fertilizantes	Reduce la necesidad de fertilizantes químicos.
Emisiones de N ₂ O y CH ₄	Reduce las emisiones de óxido nitroso y metano, potenciales gases de efecto invernadero.
Vida microbiana	Incrementa la vida microbiana en el suelo, lo que resulta en mayor almacenamiento de carbono.

El compostaje de residuos orgánicos es también una alternativa para reciclar coproductos de arroz en forma de fertilizante orgánico [91].

El carbón de cascarilla de arroz como sustrato presenta las siguientes características físicas y químicas: densidad seca 150g/l, capacidad de retención de agua 53,9 %; capacidad de intercambio catiónico 3,7



meq/100g, pH en el agua de 7,4, contenido de sales solubles de 0,7 g/l, nitrógeno 0,7%; fósforo 0,2% y potasio 0,32% [115].

También se ha usado la CCA y el biocarbón a partir de CA, como fertilizantes inorgánicos en fitorremediación de suelos contaminados. La fitorremediación utiliza las plantas para remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes. Se han identificado una amplia diversidad de especies que se emplean para este fin. Algunas de ellas, debido a su gran capacidad para acumular metales pesados, reciben el nombre de hiperacumuladoras [116].

Evelin et al. adicionaron CCA y bio-carbón para contribuir con la fitorremediación de suelos contaminados con plomo. Al adicionar ambas cenizas al suelo, se causó un efecto positivo sobre el rendimiento del *Ricinus communis*, debido a que se mejoró el pH del suelo, el carbono orgánico, y por las cenizas, el plomo se precipitó, aumentando así la disponibilidad de nutrientes para la planta. También Samsuri et al. analizaron el efecto de la CCA y el fertilizante inorgánico en la fitorremediación de metales pesados en los relaves de la mina por *vetiver grass*. Los relaves de la mina se modificaron con CCA y se recubrió de hierro (Fe-CCA) a 0 o 10% de las tasas de aplicación y se plantó hierba vetiver en los relaves. La plantación fue fertilizada con tres tasas (0, 50 y 100 kg/ha) de fertilizantes. En la cosecha, el brote y la raíz de las plantas se separaron y se determinó su absorción de As, Cd, Cu, Cr, Pb, Mn y Zn. La aplicación de CCA mostró un aumento en el pH y carbono orgánico disuelto de los relaves. El crecimiento y la biomasa seca total del vetiver fueron mayores que en los relaves de control. También fue evidente que se mejoró la absorción de metales pesados por parte de la planta, cuando se adicionaron la CCA y Fe-CCA, en conjunto con NPK [118].



B. Adsorción de contaminantes

Se utilizan diferentes procesos físico-químicos para el tratamiento de aguas contaminadas, dentro de estos se encuentra la adsorción. La adsorción es una técnica eficiente, prometedora y muy utilizada en los procesos de tratamiento de aguas residuales, especialmente en los países en desarrollo, debido principalmente a su sencillez, facilidad de manejo, económicamente viable, técnicamente factible y socialmente aceptable [119]. Algunos materiales como el carbón activado, se han usado ampliamente debido a su gran capacidad de adsorción [120].

La CCA por su alta superficie específica, grado de porosidad y composición, presenta buenas propiedades de adsorción, cualidad que la hace susceptible para su aplicación en la descontaminación de aguas y suelos.

Las principales aplicaciones de la CCA como adsorbente, se reportan para descontaminación de aguas residuales y purificación de agua. La CCA actúa como adsorbente de muchos de estos compuestos en fase líquida, entre ellos metales pesados, aceites, algunos tintes, entre otros [121].

Los metales pesados (por ejemplo, Cr, Ni, Co, Pb, Hg, As, Cd, Cu, Zn) como los principales contaminantes inorgánicos, existen en muchas aguas residuales industriales. Estos iones metálicos son tóxicos y no son biodegradables. Otros grandes grupos de contaminantes orgánicos son los tintes sintéticos y reactivos. Cabe mencionar que los hidrocarburos fenólicos y policíclicos, los plaguicidas y herbicidas, los fertilizantes, los bifenilos, los detergentes, las grasas, los aceites y los compuestos farmacéuticos son también los otros contaminantes orgánicos importantes de las aguas residuales.

En la Tabla 15 se puede observar los diferentes contaminantes que pueden ser adsorbidos por este residuo. La información está basada en las investigaciones de diversos estudios que así lo reportan.



TABLA 15. CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE LA CCA PARA DIFERENTES CONTAMINANTES LÍQUIDOS [119]

Adsorbato	Capacidad de adsorción (mg/g)
Fenol	14,40-25,00
1,3-Dihidroxibencene	8,89
2-Clorofenol	0,21
Plomo (II)	12,61-207,50
Mercurio (II)	9,32-46,14
Tinte verde brillante	24,20
Zinc (II)	3,08-26,10
Oro	21,12
Índigo carmín	65,91
Níquel (II)	2,62-25,33
Cadmio (II)	2,30-11,79
Cromo (VI)	26,31
Piridina	11,72
Cromo (III)	240,22
Tinte azul de metileno	690,00-1455,60
Ácidos grasos libres	45,00-168,00
Tinte rojo congo	171,00
Aceite	31,76
Ácidos láuricos	35,70
Ácidos estéricos	36,00
Fosfolípidos	7,00
Cobre	16,10

La CA es químicamente estable, tiene una alta resistencia mecánica y es insoluble en agua, lo que la convierte en uno de los mejores adsorbentes para la eliminación de metales pesados. La CA puede usarse modificada o no; también puede modificarse utilizando ácido clorhídrico, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, epíclorhidrina, ácido tartárico, entre otros.



El pretratamiento de la cáscara de arroz ayuda a reducir la cristalinidad de la celulosa y el aumento de la superficie o la porosidad, así como a eliminar la lignina y las hemicelulosas, mejorando la capacidad de adsorción de los metales pesados [122].

La CA y CCA como adsorbentes se han utilizado como parte de elementos de filtración de aguas. La CA se ha usado como parte de biofiltros para la remoción de materia orgánica. Higuera evalúa un biofiltro para el tratamiento de aguas residuales. El biofiltro está compuesto por capas de CA, arena fina y pasto vetiver en la superficie, tal como se ilustra en la Figura 22.

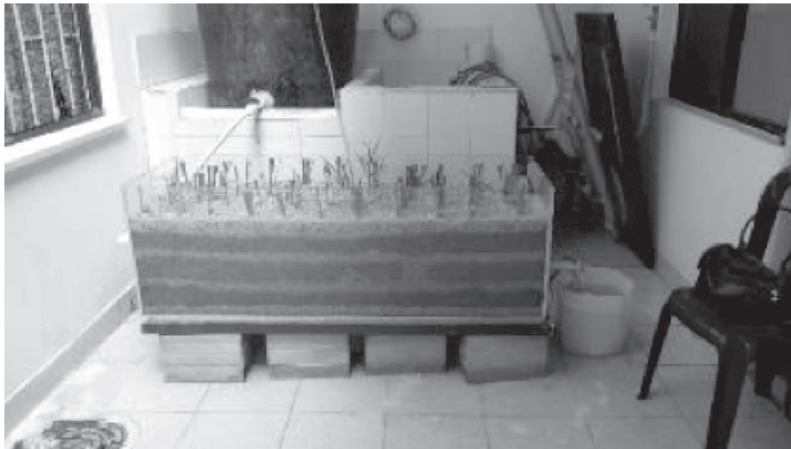


Fig. 22. Biofiltro para aguas residuales con CA [123].

El biofiltro remueve de manera efectiva la materia orgánica, también se disminuyeron las grasas, óxidos metálicos y la acidez del agua residual. El estudio demostró la viabilidad de usar este material orgánico como sustrato en humedales artificiales [123].

En sistemas de purificación de agua, la CA y CCA se ha usado en combinación con otros materiales. Algunas innovaciones se han investigado y comercializado en India en filtros de bajo costo. Una de



estas iniciativas es un lecho filtrante que puede atrapar hasta el 95% de la turbiedad y las bacterias presentes en el agua, y está compuesto de CCA, piedras o agregado fino y cemento. Esta innovación proliferó en pueblos de toda la India como un filtro rural de agua hecho por uno mismo. Otra innovación consiste en incrustar o impregnar nanopartículas de plata en CA y CCA para crear un lecho filtrante bactericida [124]. La plata es un agente antimicrobiano seguro y efectivo que es letal para el microorganismo unicelular, pero es inofensivo para las células humanas. Una vez impregnado el residuo con nanoplata, es capaz de inactivar completamente bacterias como la *escherichia coli*. Estos purificadores de agua se introdujeron en el mercado indio en 2009, con una visión de reducir el impacto de las enfermedades transmitidas por el agua, por suministro de agua potable [125].

9. CONCLUSIONES

La CA y sus cenizas son producidos en altos volúmenes en Colombia y a nivel mundial, por lo cual es indispensable buscar soluciones para su disposición y utilizarlos para la optimización de procesos actuales y la obtención de nuevos productos, buscando hacer parte del modelo de economía circular.

Sus características físicas y químicas la convierten en un material susceptible de ser utilizado como materia prima alternativa en diferentes procesos y procedimientos en diversos sectores industriales. Desde que se identificaron sus principales características desde hace más de una década, gran cantidad de aplicaciones han surgido, desarrollado y algunas se han llevado al mercado. Algunas de ellas continúan en estado inicial o etapas experimentales de investigación

En el sector de la construcción, la CCA actualmente se utiliza principalmente en la producción de materiales y elementos constructivos, en menor proporción en la estabilización de suelos. Teniendo en cuenta sus características como alto contenido de sílice y alta actividad



puzolánica, se utiliza como material cementante suplementario en el concreto convencional, como reemplazo del agregado fino en mezclas de concreto, también en la fabricación de cemento Portland. Por su alto porcentaje de materia volátil y celulosa, la CA se ha usado para la obtención de ladrillos de arcilla.

La CCA principalmente por su alto contenido de sílice se ha probado en la fabricación y obtención de materiales, tanto tradicionales como avanzados, pero también en productos aislantes térmicos, sílice micro y nanoestructurada y carbón activado. Estas aplicaciones se encuentran en su mayoría a escala de laboratorio o prototipos.

En el sector de energía y combustibles la CA ha demostrado sus propiedades térmicas aprovechables para usos tanto domésticos e industriales. Su uso en tecnologías de calentamiento y generación de energía por combustión directa, ha sido más ampliamente utilizada por el desarrollo actual de la tecnología y la alta generación del residuo. Su uso como biomasa en la gasificación y pirólisis ha probado ser satisfactoria, pero teniendo en cuenta que estas tecnologías aún están madurando, inclusive en los países con mayor generación de CA como China, India, Indonesia, su aplicación aún es limitada. En la producción de biocombustibles de segunda generación como etanol y biogás, para el uso de CA se destacan algunos inconvenientes como su baja biodegradabilidad al ser un material lignocelulósico.

Se han reportado usos en el sector agrícola y medioambiental, destacándose el uso de la CA como fertilizante complementario para suelos y en procesos físico-químicos como adsorbente de contaminantes.

En la búsqueda de alternativas medioambientales más viables y que proporcionen una valorización a la CA y sus cenizas, el sector industrial y académico continúa investigando, desarrollando y aplicando opciones tecnológicas que permitirán acercarse al aprovechamiento sostenible de este tipo de residuos agroindustriales de alta generación en Colombia y el mundo.



REFERENCIAS

- [1] M. Acevedo, W. Castrillo, y U. Belmonte, "Origen, evolución y diversidad del arroz," *Agronomía Tropical*, vol. 56, n° 2, p. 18, 2006.
- [2] S. Gnanamanickam, "Biological control of rice diseases," Springer Science & Business Media, vol. 8, 2009.
- [3] M. Gonçalves, and C. Bergmann, "Thermal insulators made with rice husk ashes: Production and correlation between properties and microstructure," *Construction and Building Materials*, vol. 21, pp. 2059-2065, 2007.
- [4] L. Zen, G. Ocácia, and D. Sadhu, "Prospect of an environmentally balanced energy system from rice husk and wind," *Renewable Energy*, vol. 3, n° 8, pp. 885-889, 1993.
- [5] J. Cunha, y E. Canepa, "Aproveitamento energético da casca de arroz," *Programa energia. Research Project Report*, Porto Alegre, 1986.
- [6] R. Vásquez, y P. Bach, "Las cenizas de cáscara de arroz; adición puzolánica en cemento y concreto," Piura, Perú, 2000.
- [7] D. Dendy, y B. Dobraszcyk, "Cereales y productos derivados química y tecnología," Zaragoza, Editorial Acribia, S.A., 2004.
- [8] S. Olmos, "Apunte de morfología, fenología, ecofisiología, y mejoramiento genético del arroz," 2007.
- [9] F. García, B. Lanfranco, y G. Hareau, "Efecto sobre el comercio y bienestar de distintas estrategias tecnológicas para el arroz uruguayo," vol. 197, 2012.
- [10] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-FAO, "Perspectivas alimentarias. Resúmenes de mercadeo," 2019. [Online]. Available: <http://www.fao.org/3/ca5040es/ca5040es.pdf>. [Último acceso: 13 Julio 2020].
- [11] J. Sierra, "Alternativas de aprovechamiento de la cascarilla de arroz en Colombia," Universidad de Sucre, Sincelejo, 2009.



- [12] Unidad De Planificación Rural Agropecuaria, "Análisis situacional Cadena productiva del arroz en Colombia," 2019. [Online]. Available: https://www.upra.gov.co/documents/10184/101496/20190709_DOCUMENTO+ANALISIS+SITUACIONAL.pdf/9051a2a6-a998-4386-8c6b-ded8309e8f4f. [Último acceso: 13 Julio 2020].
- [13] Federación nacional de arroceros - Fondo nacional del arroz-FEDEARROZ, "Estadísticas del arroz," Revista Arroz, vol. 67, nº 541, 2019.
- [14] Federación nacional de arroceros - Fondo nacional del arroz-FEDEARROZ, "Estadísticas arroceras," Revista arroz, vol. 68, nº 545, p. 48, 2020.
- [15] I. C. Becerra, A. Díaz, E. García, J. Giraldo, A. Maluendas, L. Quintero, D. Reina, M. Ortegón, H. Samacá, y J. Viveros, "Análisis situacional cadena productiva del arroz en Colombia," Unidad de Planificación Rural Agropecuaria, Bogotá, 2019.
- [16] Departamento administrativo nacional de estadística - DANE, "Boletín Técnico, Encuesta Nacional de Arroz Mecanizado (ENAM), Segundo semestre 2019," 2019. [Online]. Available: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/arroz/bol_arroz_IIsem19.pdf. [Último acceso: 13 Julio 2020].
- [17] R. Ferraro, and A. Nanni, "Effect of off-white rice husk ash on strength, porosity, conductivity and corrosion resistance of white concrete," *Construction and Building Materials*, vol. 31, pp. 220-225, 2012.
- [18] E. Chicaiza, y F. Oña, "Estabilización de arcillas expansivas de la Provincia de Manabí con puzonala extraída de ceniza de cascarilla de arroz," Escuela Politécnica Nacional, Quito, 2018.
- [19] Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural., "La cadena del arroz en Colombia", 2005. [Online]. Available: http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6376/1/2005112141728_caracterizacion_arroz.pdf. [Último acceso: 13 Julio 2020].



- [20] C. Najar, y J. Álvarez, "Mejoras en el proceso productivo y modernización mediante sustitución y tecnologías limpias en un molino de arroz," 2007.
- [21] E. Aprianti, "A huge number of artificial waste material can be supplementary cementitious material (SCM) for concrete production – a review part II," *Journal of Cleaner Production*, vol. 142, pp. 4178-4194, 2017.
- [22] B. S. Thomas, "Green concrete partially comprised of rice husk ash as a supplementary cementitious material – A comprehensive review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 82, pp. 3913-3923, 2018.
- [23] A. P. Gursel, H. Maryman, and C. Ostertag, "A life-cycle approach to environmental, mechanical, and durability properties of "green" concrete mixes with rice husk ash," *Journal of Cleaner Production*, vol. 112, pp. 823-836, 2015.
- [24] Unidad De Planificación Rural Agropecuaria, "Línea base cadena productiva del cultivo de arroz," 2019. [Online]. Available: https://www.upra.gov.co/documents/10184/101496/20190611_DDT_LB-Arroz.pdf/a86401e0-d235-46fa-a749-abd1cf291352. [Último acceso: 13 Julio 2020].
- [25] G. Sensale, "Effect of rice-husk ash on durability of cementitious materials," *Cement and Concrete Composites*, vol. 32, n° 9, pp. 718-725, 2010.
- [26] A. Valverde, B. Sarria, y J. Monteagudo, "Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz," *Scientia et Technica*, vol. XIII, n° 37, pp. 255-260, 2007.
- [27] B. I. Treviño Cardona, I. Gómez, y D. Fuente, "Obtención y caracterización de carburo y nitruro de silicio a partir de cascarilla de arroz," *Ingenierías*, vol. 6, n° 19, pp. 21-27, 2003.
- [28] S. Huang, S. Jing, J. Wang, Z. Wang, and Y. Jin, "Silica white obtained from rice husk in a fluidized bed," *Powder Technology*, vol. 117, n° 3, pp. 232-238, 2001.



- [29] E. Ayswarya, K. Vidya Francis, V. Renju, and E. Thachil, "Rice husk ash – A valuable reinforcement for high density polyethylene," *Materials & Design*, vol. 41, n° 1, pp. 1-7, 2012.
- [30] V. Jittin, A. Bahurudeen, and S. Ajinkya, "Utilisation of rice husk ash for cleaner production of different construction products," *Journal of Cleaner Production*, vol. 263, 2020.
- [31] J. Martínez Ángel, T. Vásquez, J. Zapata, y M. Vélez, "Experimentos de combustión con cascarilla de arroz en lecho fluidizado para la producción de ceniza rica en sílice," *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, vol. 51, pp. 97-104, 2010.
- [32] A. Salas, S. Delvasto, R. De Gutierrez, and D. Lange, "Comparison of two processes for treating rice husk ash for use in high performance concrete," *Cement and Concrete Research*, vol. 39, n° 9, pp. 773-778, 2009.
- [33] Banco de Desarrollo de Latinoamérica, CAF, "Economía circular e innovación tecnológica en residuos sólidos, oportunidades en Latinoamérica", Corporación Andina de Fomento, 2018.
- [34] "The European Cement Association, CEMBUREAU, Activity Report," 2013. [En línea]. Available: www.cembureau.eu
- [35] M. Gonçalves, "Thermal insulators made with rice husk ashes: production and correlation between properties and microstructure," *Construction and Building Materials*, vol. 21, pp. 2059-2065, 2007.
- [36] R. Tomoshige, T. Ashitani, H. Yatsukawa, R. Nagase, A. Kato, and K. Sakai, "Synthesis of ceramic compounds utilizing woody waste materials and rice husk," *Materials Science Forum*, Vols. %1 de %2437-438, pp. 411-414, 2003.
- [37] E. Basha, R. Hashim, H. Mahmud, and A. Muntohar, "Muntohar, Stabilization of residual soil with RHA and cement," *Construction and Building Materials*, vol. 19, n° 6, pp. 448-453, 2005.



- [38] G. Cordeiro, R. Toledo, L. Tavares, and E. Fairbairn, "Experimental characterization of binary and ternary blended-cement concretes containing ultrafine residual rice husk and sugar cane bagasse ashes," *Construction and Building Materials*, vol. 29, pp. 641-646, 2012.
- [39] N. Farzadnia, S. Bahmani, A. Asadi, and S. Hosseini, "Mechanical and microstructural properties of cement pastes with rice husk ash coated with carbon nanofibers using a natural polymer binder," *Construction and Building Materials*, vol. 175, pp. 691-704, 2018.
- [40] H. Huang, X. Gao, H. Wang, and H. Ye, "Influence of rice husk ash on strength and permeability of ultra-high," *Construction and Building Materials*, vol. 149, pp. 621 - 628, 2017.
- [41] H. Mahmud, S. Bahri, Y. Yee, and Y. Yeap, "Effect of rice husk ash on strength and durability of high strength high performance concrete.World," *World Academy of Science, Engineering and Technology*, vol. 10, pp. 390 - 395, 2016.
- [42] Wahyuni, F. Supriani, and G. A. Elhusna, "Performance of concrete with rice husk ash, sea shell ash and bamboo fibre addition," *Procedia Engineering*, vol. 95, pp. 473-478, 2014.
- [43] J. Wei, and C. Meyer, "Utilization of rice husk ash in green natural fiber-reinforced cement composites: mitigating degradation of sisal fiber," *Cement and Concrete Research*, vol. 81, pp. 94-111, 2016.
- [44] S. Azhagarsamy, and K. Jaiganesan, "A Study on Strength Properties of Concrete with Rice Husk Ash and Silica Fume with Addition of Glass," *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)*, vol. 03, pp. 1681 - 1684, 2016.
- [45] M. Koushkbaghi, M. Kazemi, H. Mosavi, and E. Mohseni, "Acid resistance and durability properties of steel fiber-reinforced." *Construction and Building Materials*, n° 202, pp. 266 - 275, 2019.



- [46] E. Mohseni, M. Mehrinejad, F. Naseri, and M. Monazami, "Polypropylene fiber reinforced cement mortars containing rice husk ash and nano-alumina," *Construction and Building Materials*, vol. 111, pp. 429-439, 2016.
- [47] N. Fuentes, O. Fragozo, y L. Vizcaino, "Residuos agroindustriales como adiciones en la elaboración de bloques de concreto no estructural," *Ciencia e ingeniería neogranadina*, vol. 25, n° 2, pp. 99-116, 2015.
- [48] C. Hendriks, E. Worrell, D. de Jager, and K. R. P. Blok, "Emission reduction of greenhouse gases from the cement industry," In *IEA Greenhouse Gas Control Technologies Conference*, 2004.
- [49] V. Ajiwe, C. Okeke, and F. Akigwe, "A preliminary study of manufacture of cement from rice husk ash," *Bioresource Technology*, vol. 73, pp. 37-39, 2000.
- [50] S. Sinyoung, K. Kunchariyakun, and S. Asavapisit, "Synthesis of belite cement from nano-silica extracted from two rice husk ashes," *Journal of Environmental Management*, vol. 190, pp. 53-60, 2017.
- [51] S. Kazmi, S. Abbas, M. Saleem, M. Munir, and A. Khitab, "Manufacturing of sustainable clay bricks: Utilization of waste sugarcane bagasse and rice husk ashes," *Construction and Building Materials*, vol. 120, pp. 29-41, 2016.
- [52] L. Zhang, "Production of bricks from waste materials: a review," *Construction and Building Materials*, vol. 47, pp. 643-655, 2013.
- [53] L. Henry, B. Shankha, J. William, and S. Melissa, "Test on mercury vapour emission from fly ash bricks," *World of Coal Ash*, Covington, Kentucky, USA., 2017.
- [54] A. Kadir, and N. Maasom, "Recycling sugarcane bagasse waste into fired clay brick," *International Journal of Zero Waste Generation*, vol. 1, n° 1, pp. 21-26, 2013.



- [55] J. Lucas, "Azulejos ou Ladrilhos Ceramicos," *Descricao Geral, Exigencias Normativas, Classificacao Funcional*, LNEC, Lisboa, 2003.
- [56] G. Görhan, and O. Şimşek, "Porous clay bricks manufactured with rice husks," *Construction and Building Materials*, vol. 40, 2013.
- [57] N. Phonphuak, C. Saengthong and A. Srisuwan, "Physical and mechanical properties of fired clay bricks with rice husk waste addition as construction materials," *Materials Today: Proceedings*, vol. 17, n° 4, pp. 1668-1674, 2019.
- [58] G. S. D. Silva, and B. Perera, "Effect of waste rice husk ash (RHA) on structural, thermal and acoustic properties of fired clay bricks," *Journal of Building Engineering*, vol. 18, pp. 252-259, 2018.
- [59] S. Kazmi, S. Abbas, M. Munir, and A. Khitab, "Exploratory study on the effect of waste rice husk and sugarcane bagasse ashes in burnt clay bricks," *Journal of Building Engineering*, vol. 7, pp. 372-378, 2016.
- [60] S. Ganta, "Soil Stabilization with Rice Husk Ash and Lime Sludge," *International Journal of Research*, vol. 4, n° 14, pp. 1112-1119, 2017.
- [61] R. Montejo, J. Raymundo, y J. Chávez, "Materiales alternativos para estabilizar suelos: el uso de ceniza de cáscara de arroz en vías de bajo tránsito de piura," *TZHOECOEN*, vol. 12, n° 1, pp. 131-140, 2020.
- [62] R. Brooks, "Soil Stabilization with fly ash and rice husk ash," *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*, vol. 1, n° 1, 2009.
- [63] Y. Cheng, S. Wang, J. Li, X. Huang, C. Li, and J. Wu, "Engineering and mineralogical properties of stabilized expansive soil compositing lime and natural pozzolans," *Construction and Building Materials*, vol. 187, pp. 1031-1038, 2018.
- [64] C. Licuy, y K. Román, "Estudio de la estabilización de arcillas expansivas utilizando el 10,20 y 30% en peso, de puzolanas de ceniza del volcán Tungurahua y ceniza de la cascarilla de arroz en composiciones iguales," Quito, 2020.



- [65] C. Aponte, y B. Calderon, "Evaluación del comportamiento de la resistencia de un suelo limoso con adición de ceniza de cascarilla de arroz," Girardot, 2020.
- [66] J. Dávalos, A. Bonilla, M. Villaquirán, R. Gutiérrez, and J. Rincón, "Preparation of glass–ceramic materials from coalash and rice husk ash: Microstructural, physical and mechanical properties," *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 2020.
- [67] K. Patel, R. Shettigar, and N. Misra, "Recent advance in silica production technologies from agricultural waste stream: review," *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, vol. 4, pp. 274-279, 2017.
- [68] S. Chandrasekhar, K. G. Satyanarayana, P. N. Pramada, P. Raghavan, and T. N. Gupta, "Review Processing, properties and applications of reactive silica from rice husk—an overview," *Journal of Materials Science*, vol. 38, p. 3159–3168, 2003.
- [69] R. Ghosh, "A Review Study on Precipitated Silica and Activated Carbon from Rice Husk," *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, vol. 4, 2013.
- [70] S. Pratap Singh, and N. Endley, "Fabrication of nano-silica from agricultural residue and their application," de *Nanomaterials for Agriculture and Forestry Applications*, *Elsevier*, pp. 107-134, 2020.
- [71] V. S. N. Yalçın, "Studies on silica obtained from rice husk," *Ceramics International*, vol. 29, n° 2, pp. 219-224, 2001.
- [72] M. d. Souza, W. Magalhaes, and M. PERSEGIL, "Silica Derived from Burned Rice Hulls," *Materials Research*, vol. 5, n° 4, pp. 467-474, 2002.
- [73] P. Deshmukh, J. Bhatt, D. Peshwe, and S. Pathak, "Etermination of silica activity index and XRD, SEM and EDS studies of amorphous SiO₂ extracted from rice Husk Ash," *Transactions of the Indian Institute of Metals*, vol. 65, pp. 63-70, 2011.



- [74] M. Alam, M. Hossain, M. Hossain, M. Johir, J. Hossen, M. Rahman, J. Zhou, A. Hasan, A. Karmakar, and M. Ahmed, "The Potentiality of Rice Husk-Derived Activated Carbon: From Synthesis to Application," *Processes* 2020, 8, 203, vol. 8, n° 2, p. 203, 2020.
- [75] R. Pode, "Potential applications of rice husk ash waste from rice husk biomass power plant," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 16, pp. 1468-1485, 2016.
- [76] E. Menya, P. Olupot, H. Storz, M. Lubwama, and Y. Kiros, "Production and performance of activated carbon from rice husks for removal of natural organic matter from water: A review," *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 129, pp. 271-296, 2018.
- [77] I. Ríos, I. Luzardo, J. García, J. Santos, and C. Gutiérrez, "Production and characterization of fuel pellets from rice husk and wheat straw," *Renewable Energy*, vol. 145, pp. 500-507, 2019.
- [78] M. Jakob, and J. Steckel, "How climate change mitigation could harm development in poor countries," *WIRE Climate Change*, vol. 5, n° 2, pp. 161-168, 2014.
- [79] G. Alemán, V. Casiano, D. Cárdenas, R. Díaz, N. Scarlat, J. Mahlkecht, J. Dallemand, and R. Parra, "Renewable energy research progress in Mexico: a review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 32, pp. 140-153, 2014.
- [80] Z. Liu, B. Fei, Z. Jiang, Cai, and Y. Z, "The properties of pellets from mixing bamboo and rice straw," *Renewable Energy*, vol. 55, pp. 1-5, 2013.
- [81] S. Yoon, Y. Son, Y. Kim, and J. Lee, "Gasification and power generation characteristics of rice husk and rice husk pellet using a downdraft fixed-bed gasifier," *Renewable Energy*, vol. 42, pp. 163-167, 2012.
- [82] I. Quispe, R. Navia, and R. Kahhat, "Energy potential from rice husk through direct combustion and fast pyrolysis- a review," *Waste Management*, vol. 59, pp. 200-210, 2017.



- [83] J. Arévalo, G. Quispe, and C. Raymundo, "Sustainable Energy Model for the production of biomass briquettes," *Energy Procedia*, vol. 141, pp. 138 - 145, 2017.
- [84] I. Quispe, R. Navia y R. Kahhat, "Energy potential from rice husk through direct combustion and fast pyrolysis: A review," *Waste Management*, vol. 59, pp. 200-210, 2017.
- [85] S. Ndindeng, J. Mbassi, W. Mbacham, J. Manful, S. Graham-Acquaah, J. Moreira, J. Dossou, and K. Futakuchi, "Quality optimization in briquettes made from rice milling by-products," *Energy for Sustainable Development*, vol. 29, pp. 24-31, 2015.
- [86] F. Vitali, S. Parmigiani, M. Vaccari, and C. Collivignarelli, "Agricultural waste as household fuel: Techno-economic assessment of a new rice-husk cookstove for developing countries," *Waste Management*, vol. 33, n° 12, pp. 2762-2770, 2013.
- [87] S. Ramón-Ramón, J. Cárdenas, y J. Rojas, "Poder calorífico de la cascarilla de arroz usada como combustible en hornos de secado," *Mundo Fesc*, vol. 8, n° 16, pp. 63-67, 2018.
- [88] S. Shackley, S. Carter, T. Knowles, E. Middelink, S. Haefele, S. Sohi, A. Cross, and S. Haszeldine, "Ustainable gasification–biochar systems? A case-study of rice-husk gasification in Cambodia, Part I: Context chemical properties, environmental and health and safety issues," *Energy Policy*, vol. 41, pp. 49-58, 2012.
- [89] R. Blissett, R. Sommerville, N. Rowson, J. Jones, and B. Laughlin, "Valorisation of rice husks using a TORBED® combustion process," *Fuel Processing Technology*, vol. 159, pp. 247-255, 2017.
- [90] F. Okasha, G. Zaater, S. El-Emam, M. Awad, and E. Zeidan, "Co-combustion of biomass and gaseous fuel in a novel configuration of fluidized bed: Combustion characteristics," *Fuel*, vol. 133, pp. 143-152, 2014.
- [91] E. R. Abaide, M. V. Tres, G. L. Zobot, and M. A. Mazutti, "Reasons for processing of rice coproducts: Reality and expectations," *Biomass and Bioenergy*, vol. 20, pp. 240-256, 2019.



- [92] M. Balat, M. Balat, E. Kirtay, and H. Balat, "Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems," *Energy Conversion and Management*, vol. 50, n° 12, pp. 3147-3157, 2009.
- [93] H. S. Heo, H. J. Park, J.-I. Dong, S. H. Park, S. Kim, D. J. Suh, Y.-W. Suh, S.-S. Kim, and Y.-K. Park, "Fast pyrolysis of rice husk under different reaction conditions," *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 16, n° 1, pp. 27-31, 2010.
- [94] P. Díaz Navarro, "Gestión Energética Empresarial en la "Unidad Económica Básica Industrial Victoria de Girón"," Pinar del Río., 2014.
- [95] P. Díaz, J. Rivero, y D. Regalado, "Diseño de un horno para calentar aire empleando la cascarilla del arroz como combustible," *Revista Científica Avances*, vol. 18, n° 3, pp. 201-212, 2016.
- [96] A. Abbas, and S. Ansumali, "Global potential of rice husk as a renewable feedstock foethanol biofuel production," *Bioenergy Research*, vol. 3, pp. 328-334, 2010.
- [97] F. Momayez, K. Karimi, and I. Sárvári, "Enhancing ethanol and methane production from rice straw by pretreatment with liquid waste from biogas plant," *Energy Conversion and Management*, vol. 178, pp. 290-298, 2018.
- [98] B. A. Goodman, "Utilization of waste straw and husks from rice production: A review," *Journal of Bioresources and Bioproducts*, vol. 5, n° 3, pp. 143-162, 2020.
- [99] C. Lamb, B. Martini, D. Souza, F. Fornasier, L. Riça, Larissa Brixner, and R. Souza, "Bioethanol production from rice hull and evaluation of the final solid residue," *Chemical Engineering Communications*, pp. 1-13, 2018.
- [100] M. Hans, S. Kumar, A. Chandel, and I. Polikarpov, "A review on bioprocessing of paddy straw to ethanol using simultaneous saccharification and fermentation," *Process Biochemistry*, vol. 85, pp. 125-134, 2018.



- [101] M. Nikzad, K. Movagharnejad, G. D. Najafpour, and F. Talebnia, "Comparative studies on the effect of pretreatment of rice husk on enzymatic digestibility and bioethanol production," *International Journal of Engineering, Transactions B: Applications*, vol. 26, n° 5, pp. 455-464, 2013.
- [102] W. Zhong, Z. Zhang, W. Qiao, P. Fu, and M. Liu, "Comparison of chemical and biological pretreatment of corn straw for biogas production by anaerobic digestion," *Renewable Energy*, vol. 36, n° 6, pp. 1875-1879, 2011.
- [103] L. M. Contreras, H. C. Schelle, R. Sebrango, and I. Pereda, "Methane potential and biodegradability of rice straw, rice husk and rice residues from the drying process," *Water science & technology*, vol. 65.6, pp. 1142-1149, 2012.
- [104] Y. Huang, and L. Shang-lien, "Chapter 19. Utilization of rice hull and straw," *de Rice*, 2019, pp. 627-661.
- [105] B. J. Poddar, S. P. Nakhate, R. K. Gupta, A. R. Chavan, A. K. Singh, A. A. Khardenavis, and H. J. Purohit, "A comprehensive review on the pretreatment of lignocellulosic wastes for improved biogas production by anaerobic digestion," *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. Marzo, 2021.
- [106] C. Okeh, C. O. Onwosi, and F. J. C. Odibo, "Biogas production from rice husks generated from various rice mills in," *Renewable Energy*, n° 62, pp. 204 - 208, 2014.
- [107] A. David, O. Labunmi, L. Albert, A. Bodunde, and J. Owolabi, "Enhanced Biogas Production from Rice Husk Through Solid-State Chemical Pretreatments," *Waste and Biomass Valorization*, vol. 11, n° 6, pp. 2397-2407, 2020.
- [108] F. Kuhn, E. Berghahn, M. Marder, O. Konrad, R. A. Sperotto, and C. Eichelberger Granada, "Inoculation of environmental fungal isolates improve the methane biochemical potential of rice hulls in anaerobic digestion processes," *Journal of Material Cycles and Waste Management*, vol. 23, n° 2, pp. 717-726, 2021.



- [109] R. Ruan, Y. Zhang, P. Chen, S. Liu, L. Fan, N. Zhou, K. Ding, P. Peng, M. Addy, Y. Cheng, E. Anderson, Y. Wang, Y. Liu, H. Lei, and B. Li, "Biofuels: Introduction," de Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels, El Sevier, pp. 3-43, 2019.
- [110] R. Singh, M. Srivastava, and A. Shukla, Environmental sustainability of bioethanol production from rice straw in India: a review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 54, pp. 202-2016, 2016.
- [111] R. Wuana, and F. Okieimen, "Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation," *International Scholarly Research Notices*, 2011.
- [112] U. Ashraf, A. Kanu, Z. Mo, S. Hussain, S. Anjum, I. Khan, R. Abbas, and X. Tang, "Lead toxicity in rice: effects, mechanisms and mitigation strategies: a minireview," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 22, p. 18318–18332, 2015.
- [113] M. Laidlaw, G. Filippelli, S. Brown, J. Paz-Ferreiro, S. Reichman, P. Netherway, A. Truskewycz, A. Ball, and H. Mielke, "Case studies and evidence-based approaches to addressing urban soil lead contamination," *Applied Geochemistry*, vol. 83, pp. 14-30, 2017.
- [114] C. Atkinson, J. Fitzgerald, and N. Hips, "Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review," *Plant Soil*, vol. 337, pp. 1-18, 2010.
- [115] F. N. Quintero Peralta, y R. I. Umanzor Amador, "Evaluación del efecto de cascarilla de arroz carbonizada en propiedades físicas y retención de nitrógeno en el suelo," Universidad Católica del Trópico Seco, Estelí, 2018.
- [116] D.-L. A. Evelin, G.-R. C. Abelardo, P.-G. Francisco, V.-I. J. Roberto, and A.-S. Otilio, "Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación," *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 14, nº 2, pp. 597-612, 2011.



- [117] B. Kiran, and M. Prasad, "Biochar and rice husk ash assisted phytoremediation potentials of *Ricinus communis* L. for lead-spiked soils," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 183, 2019.
- [118] Samsuri, F. Tariq, D. Karam, A. Aris, and G. Jamilu, "The effects of rice husk ashes and inorganic fertilizers application rates on the phytoremediation of gold mine tailings by vetiver grass," *Applied Geochemistry*, vol. 108, 2019.
- [119] K. Foo, and B. Hameed, "Utilization of rice husk ash as novel adsorbent: A judicious recycling of the colloidal agricultural waste," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 152, pp. 39-47, 2009.
- [120] B. Kumar, D. Sengupta, T. Dasgupta, S. Mandal, and S. Datta, "Recovery of value-added products from rice husk ash to explore an economic way for recycle and reuse of agricultural waste," *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, vol. 15, p. 47–65, 2016.
- [121] X. Liu, X. Chen, L. Yang, H. Chen, Y. Tian, and Z. Wang, "A review on recent advances in the comprehensive application of rice husk ash," *Research Chemistry Intermedia*, vol. 42, pp. 893-913, 2016.
- [122] B. Mathew, M. Jaishankar, V. Biju, and K. Beeregowda, "Role of Bioadsorbents in Reducing Toxic Metals," *Journal of Toxicology*, pp. 1-13, 2016.
- [123] S. Higuera, "Biofiltro con cascarilla de arroz y pasto vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) para el tratamiento del efluente de la PTAR del INPEC," Grupo de Investigación CAZAO. Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente – ECAPMA. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD., Yopal, 2016.
- [124] D. He, A. Ikeda-Ohno, D. D. Boland, and T. D. Waite, "Synthesis and Characterization of Antibacterial Silver Nanoparticle-Impregnated Rice Husks and Rice Husk Ash," *Environmental Science & Technology*, vol. 47, n° 10, pp. 5276-5284, 2013.



- [125] C. Malhotra, R. Patil, S. Kausley, and D. Ahmad, "Novel uses of rice-husk-ash (a natural silica-carbon matrix) in low-cost water purification applications," *AIP Conference Proceedings*, vol. 113, p. 1538, 2013.



Biocarbón derivado de pellets de *Pinus patula* para la enmienda de suelos degradados

Gutiérrez Jonatan.

Grupo de Manejo Eficiente de la Energía – Gimel, Departamento de Ingeniería Mecánica, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Calle 67, No. 53-108 Medellín, Colombia.

Pérez Juan F.

Grupo de Manejo Eficiente de la Energía – Gimel, Departamento de Ingeniería Mecánica, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Calle 67, No. 53-108 Medellín, Colombia.

Rubio-Clemente Ainhoa.

Grupo de Investigación Energía Alternativa (GEA), Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70, No. 52-21 Medellín, Colombia.
Facultad de Ingeniería, Tecnológico de Antioquia – Institución Universitaria TdeA, Calle 78b, No. 72A-220, Medellín, Colombia

***Autor de correspondencia.**

Correo electrónico:

ainhoarubioclem@gmail.com

Resumen— La degradación de suelos es una problemática cuya preocupación va en aumento, debido a las implicaciones que trae consigo para la sostenibilidad del medio ambiente y la salud del ser humano. En este sentido, se hace necesario llevar a cabo prácticas encaminadas a la remediación de suelos, a través de la modificación de sus características fisicoquímicas y biológicas, constituyéndose el biocarbón en una alternativa de gran interés. Este trabajo tomó el biocarbón procedente de la gasificación de pellets de madera de *Pinus patula* (BC-P) para evaluar su aplicación como enmendador de suelos degradados; para ello, se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y se determinó el contenido mineral de las cenizas. Posteriormente, esta caracterización fue comparada con estándares, tomando como base la norma técnica colombiana NTC 5167 y la literatura científica, principalmente. Se encontró que el BC-P generado cuenta con un área superficial BET de 367,33 m²/g y un volumen de poro de 0,20 cm³/g, propiedades que le permitieron alcanzar una capacidad de retención de agua (CRA) de 219%. Además, se observó que el contenido de cenizas, el contenido de humedad, el carbono orgánico oxidable total (COT), el pH y la presencia de metaloides se encuentran dentro de los estándares de la norma NTC 5167, al igual que la CRA. De hecho, el pH de 8,80 y la presencia de macro



y micronutrientes hacen viable la utilización del BC-P obtenido para la enmienda de suelos ácidos. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) fue la única propiedad que no cumplió con la norma NTC 5167, al tener un valor de 21,70 meq/100 g; si bien, esta puede ser mejorada al realizar mezclas biocarbón-compost. Así, a partir de la caracterización fisicoquímica del BC-P, se evidenció su uso potencial para la recuperación de suelos degradados, especialmente aquellos de carácter ácido.

Palabras clave— Biocarbón de gasificación, enmienda de suelos, caracterización fisicoquímica, composición mineral de las cenizas, norma técnica colombiana NTC 5167.

Abstract— Soil degradation is a problem whose concern is increasing due to the health implications on both the environmental sustainability and the human health. In this regard, conducting soil amendment practices are required by modifying their physicochemical and biological characteristics, being the use of biochar an attractive alternative. In this work, the biochar produced from the gasification of *Pinus patula* wood pellets (BC-P) was characterized for its application as an amendment of degraded soils. For this, its physicochemical properties were evaluated, and the mineral content of the ashes was determined. Subsequently, this characterization was compared with guidelines, mainly based on the Colombian technical standard NTC 5167 and the scientific literature. It was found that the generated BC-P has a BET surface area of 367.33 m²/g and a pore volume of 0.20 cm³/g, properties that allowed it to reach a water retention capacity (WRC) of 219%. Furthermore, it was found that the ash composition, the moisture content, the total oxidizable organic carbon (TOC), the pH and the presence of metalloids are within the requirements of the NTC 5167 standard, as well as the WRC. In fact, the pH value of 8.80 and the presence of macro and micronutrients make the use of the obtained BC-P feasible for the amendment of acid soils. The cation exchange capacity (CEC) was the only property that did not meet the NTC 5167 standard, having a value of 21.70 meq/100 g. Nevertheless, it can be improved by making biochar-compost mixtures. Thus, from the physicochemical characterization of the BC-P, its potential use for the recovery of degraded soils, especially those ones of an acid nature, was evidenced.

Keywords— Gasification biochar, soil amendment, physicochemical characterization, mineral ash composition, Colombian technical standard NTC 5167.



1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas constituyen un soporte esencial para la vida; por esta razón, su transformación negativa y deterioro tienen consecuencias drásticas para la fauna y flora [1], [2]. En Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) desarrolló el informe denominado “Carga de enfermedad ambiental en Colombia” [3], el cual determinó que en el país se presentan nueve tipos de enfermedades asociadas a la contaminación del aire, el agua y el suelo. Entre las causas de la mala calidad del agua y el suelo se encuentran la minería ilegal, la deforestación, el monocultivo de especies foráneas o de carácter ilícito y el uso de fertilizantes y plaguicidas [4]. Adicionalmente, los contaminantes orgánicos e inorgánicos procedentes de fuentes antropogénicas como las actividades industriales, comerciales y residenciales, son otros de los factores que degradan los ecosistemas circundantes, en donde el suelo es uno de los principales afectados [5], [6].

Por tal motivo, la búsqueda de soluciones para mitigar y remediar el evidente daño ambiental, especialmente a los recursos edáficos, se ha convertido en una necesidad. Es en este punto donde los biocarbones exhiben un buen potencial, debido a que pueden disminuir la biodisponibilidad de los contaminantes, principalmente mediante adsorción, reduciendo su acumulación y toxicidad en plantas y animales [7]. Además, se ha determinado que el biocarbón (BC), debido a sus propiedades fisicoquímicas como la alta área superficial y el elevado contenido de carbono orgánico oxidable total (COT), junto con su hidrofobicidad, puede emplearse como acondicionador de suelos degradados, ya que estas características aumentan su capacidad de retención de agua (CRA) [8], mejorando la germinación de las semillas, el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos [9], así como el aumento en la población y actividad microbiana [10].



El BC puede definirse como “a carbonaceous solid material obtained from the thermochemical conversion of biomass in an oxygen-limited environment” [11]; i.e., un material sólido obtenido de la conversión termoquímica de la biomasa en un ambiente con escasez de oxígeno, el cual se produce, principalmente, por pirólisis, carbonización hidrotérmica y gasificación [12]. Cabe destacar que desde el conocimiento de los autores y a diferencia de los datos sobre el carbón procedente de pirólisis, el cual incluso ha sido utilizado como precursor del carbón activado [13], la caracterización del biocarbón derivado de las plantas de gasificación es escasa en la literatura [14], [15], [16].

Durante la gasificación, la biomasa se degrada mediante reacciones térmicas y químicas, en presencia de cantidades limitadas de agente oxidante, generalmente aire; no obstante, también puede utilizarse vapor de agua, oxígeno (O_2), dióxido de carbono (CO_2) o una mezcla de estos [17] [18]. Durante el proceso termoquímico de gasificación, la transformación de la materia prima se lleva a cabo en un ambiente con deficiencia de O_2 y altas temperaturas ($> 700\text{ }^\circ\text{C}$), dando lugar a la producción de un gas combustible compuesto por monóxido de carbono (CO), CO_2 , metano (CH_4), hidrógeno (H_2), nitrógeno (N_2), vapor de agua y cantidades pequeñas de hidrocarburos pesados [18]. Como subproducto de la gasificación, se obtiene el BC [19] cuyas características y, por tanto, las posibles aplicaciones en las que este material puede ser utilizado, están estrechamente relacionadas con la materia prima, la tecnología y las condiciones de gasificación utilizadas [20], [21], [22]. Para temperaturas elevadas, como las que se presentan en el proceso de gasificación, se ha encontrado que los BC tienen una relación positiva con el pH, la estructura de poro, el área superficial, el carbono fijo y el contenido de cenizas; mientras que se presenta una relación negativa con el rendimiento, el tamaño promedio de poro, el contenido de material volátil y las fracciones de masa de hidrógeno (H) y oxígeno (O), igualmente del número y densidad de grupos funcionales ácidos [23].

Entre las propiedades más importantes para utilizar el BC como enmendador de suelos se encuentran la composición elemental (carbono



–C–, H, O y nitrógeno –N–), el análisis próximo, el área superficial, el volumen de poro, el contenido mineral de las cenizas, el pH, la CRA, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y el COT [21], [24]. Se ha establecido que la proporción atómica H/C está relacionada con la estabilidad del BC al ser aplicado este como enmendador de suelos [25]. Asimismo, se ha determinado que la estabilidad a largo plazo del BC en el suelo es un factor clave que afecta la disminución de las emisiones de CO₂ a la atmósfera [26]. Por otro lado, el BC de gasificación, generalmente, tiene un pH entre neutro y alcalino [27], el cual induce un efecto calizo en suelos ácidos al aumentar su pH a valores de 8 y 9, lo que en consecuencia aumenta la productividad de las plantas [28]. A su vez, un pH básico está asociado con un aumento en la retención de contaminantes catiónicos, como son los metales pesados, disminuyendo su movilización en el suelo [29]. Este efecto se ve favorecido por la cantidad notable de grupos funcionales que contienen O en la superficie del BC, así como por las grandes áreas superficiales y la CIC, reduciendo la biodisponibilidad y fitotoxicidad en el suelo de estos compuestos tóxicos [30]. Se ha establecido que los BC de gasificación son más efectivos para tratar contaminantes orgánicos, debido a su elevada área superficial y estructuras de poro desarrolladas [12].

Bajo este contexto, este trabajo tuvo como objetivo la caracterización del BC derivado del proceso de gasificación de pellets de madera de *Pinus patula* (BC-P), con miras a ampliar el conocimiento sobre sus propiedades y su uso potencial como enmendador de suelos, al ser un material económico, ambientalmente sostenible y con propiedades para mejorar las características del suelo. Para ello, se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y su contenido mineral bajo diferentes estándares como la norma técnica colombiana NTC 5167 y experiencias reportadas en la literatura.



2.MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo, se estudiaron las propiedades del BC-P en aras de determinar su potencial uso para la enmienda de suelos degradados. Este BC-P fue obtenido en un reactor de lecho fijo equicorriente (*reverse downdraft* o *top-lit updraft* (TLUD), por sus siglas en inglés), a presión atmosférica y bajo flujo constante de aire, como agente gasificante. El BC-P fue caracterizado fisicoquímicamente mediante análisis último, análisis próximo, área superficial (BET), volumen de poro, pH, COT, CRA, CIC y fluorescencia de rayos X (XRF, por sus siglas en inglés).

A. Materiales

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), en el año 2018, la producción forestal en el mundo contó con aproximadamente 43 millones de m³ de pellets de madera [31], los cuales pueden considerarse como una de las presentaciones más comunes de la biomasa en el mercado internacional [32] para la producción de energía, por medio de procesos de transformación termoquímica como la gasificación. Colombia, por su parte, de acuerdo con la información registrada por la FAO, tuvo un total de $\sim 7,1 \times 10^6$ m³ de madera para ser utilizada como combustible [31], y cuenta con un potencial forestal de 24 millones de ha para explotación comercial [33], que no compiten con la agricultura ni la ganadería, y están por fuera del área contemplada como selva y bosques húmedos tropicales [32]. Entre las especies con gran potencial dendroenergético en Colombia, se encuentra el pino patula (*Pinus patula*), cuyas propiedades silviculturales como el rendimiento volumétrico anual de ~ 20 m³/ha-año, tiempo de cosecha de ~ 13 años, y área plantada en el país de ~ 38500 ha [34], le permiten ser considerado como un referente en cultivos energéticos y como materia prima para la generación de energía, mediante procesos termoquímicos [35], sin afectar las áreas destinadas a otros usos ecosistémicos [32].



En el presente trabajo, los pellets utilizados como materia prima para la obtención de BC fueron adquiridos comercialmente en un aserradero ubicado en la ciudad de Medellín (Colombia). Sus dimensiones fueron de 8 mm de diámetro y entre 10 y 15 mm de longitud.

B. Métodos

- Obtención del BC-P

El BC-P fue obtenido en un reactor de gasificación TLUD con geometría cilíndrica, de 0,16 m de diámetro interno y altura de 0,28 m. Para su producción, se utilizó un caudal de aire de gasificación de $146 \pm 4,3$ L/min, con el que se obtuvo un dosado relativo de gasificación de 1,52 y temperaturas promedio en las paredes del reactor de 391 °C. La biomasa fresca (~550 g de pellets) se depositó en el lecho del reactor y se encendió, de tal forma que en la biomasa se presentaron las etapas de secado, pirólisis, oxidación y reducción, en las que se produjeron la evaporación del agua y la transformación del material volátil, obteniendo como productos el gas de gasificación y el BC. Este último se muestra en la Figura 1.



Fig. 1. Biocarbón derivado de pellets (BC-P).



- Caracterización del BC-P como enmendador de suelos

La caracterización fisicoquímica del BC-P está conformada por la composición elemental (CHON), medida a través del análisis último en un equipo Leco Truspec micro y bajo la norma ASTM D-5373-08 [36]. El contenido elemental de CHN se determinó a 1050 °C en una atmósfera de helio (He). La concentración de O se estimó por diferencia [37]. El análisis próximo se determinó utilizando un equipo TGA Q50, bajo la norma modificada ASTM D-5142-04 [38]. Mediante esta prueba se cuantificó el contenido de humedad, el material volátil, el carbono fijo y el contenido de cenizas. El procedimiento consistió en someter el BC-P a una atmósfera inerte de nitrógeno (N₂) y un caudal de 100 mL/min. Para determinar el contenido de humedad, la muestra se llevó hasta 105 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min y manteniendo una isoterma durante 15 min. Posteriormente, se realizó un nuevo calentamiento hasta 900 °C a 10 °C/min; manteniendo una isoterma durante 25 min para determinar el contenido de material volátil (pérdida de masa entre 105 °C y 900 °C). A continuación, la temperatura interna de la termobalanza se equilibró a 715 °C; a esta temperatura se cambió de atmósfera inerte a atmósfera oxidante, suministrando 100 mL/min de aire durante 20 min. La masa restante después del estado isotérmico a 715 °C se consideró como el contenido de cenizas de la muestra. El carbono fijo se calculó por diferencia.

Por su parte, el área superficial y el volumen de poro se determinaron con un equipo ASAP 2020, mediante isotermas de adsorción con nitrógeno. El cálculo del área superficial se llevó a cabo mediante el método Brunauer, Emmett y Teller (BET); mientras que el volumen de poro se obtuvo utilizando el método Barrett, Joyner y Halenda (BJH) [20]. Las propiedades pH, COT, CRA y CIC se obtuvieron mediante potenciometría, titulometría, gravimetría y volumetría, respectivamente, bajo la norma NTC 5167, utilizando una muestra de BC-P seca, molida y tamizada [39]. Para determinar la CRA, se pesaron 100 g de BC-P y se añadió paulatinamente agua destilada en pequeñas cantidades hasta alcanzar el punto de saturación, es decir, hasta formar una pasta que no fuera capaz ni de absorber ni de escurrir más agua. A continuación,



el porcentaje de saturación, o CRA, se calculó mediante la ecuación (1), donde P_{BC} (g) es el peso de la muestra de BC-P, V (mL) es el volumen de agua necesario para alcanzar el punto de saturación y H (%) es el contenido de humedad del BC-P.

$$CRA = ((V * 100) / P_{BC}) * ((100 - H) / 100) \quad (1)$$

El pH del BC-P se obtuvo al introducir un potenciómetro calibrado en la pasta saturada, utilizada para determinar la CRA. Por otro lado, el COT se analizó por el método Walkley Black, fundamentado en la reducción del ión dicromato, y la CIC se determinó con el método del acetato de amonio 1 N a pH 7 [40]. Ambos métodos se describen detalladamente en la NTC 5167 [39].

La composición mineral de las cenizas del BC-P se midió por análisis de XRF bajo la norma ASTM D4326-94 [41]. El equipo usado fue un Thermo ARL Optim'X WDXRF. El procedimiento para la ejecución de la prueba consistió en secar la muestra durante 24 h a 110 °C; posteriormente, la muestra fue estabilizada en un desecador y calcinada a 950 °C. El análisis XRF se ejecutó en una atmósfera de He a temperatura ambiente y durante 25 min. De esta forma, se determinó la cantidad de óxidos presentes en las cenizas, tales como CaO, MgO, P₂O₅, K₂O, MnO, SO₃, SiO₂, Al₂O₃, Na₂O, BaO, CuO, TiO₂, Fe₂O₃, NiO y SrO.

3. RESULTADOS

El BC obtenido a partir de la gasificación de *Pinus patula* en un reactor TLUD fue caracterizado fisicoquímicamente para determinar las propiedades que le permitan ser catalogado como un enmendador de suelos degradados, atendiendo a lo establecido en la norma NTC 5167 [39]. Los resultados de las propiedades químicas y físicas, así como la composición mineral de las cenizas del BC-P se muestran en la Tabla 1. El contenido mineral de las cenizas se presenta en base absoluta y sin considerar pérdidas por ignición.



TABLA 1. PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS Y COMPOSICIÓN MINERAL DE LAS CENIZAS DEL BC-P.

Propiedad	Estándar	Valor	
Análisis último (% peso base seca sin ceniza)			
C	ASTM D5378-08	97,94	
H	ASTM D5378-08	0,97	
O	Por diferencia	0,90	
N	ASTM D5378-08	0,19	
H/C	-	0,12	
Análisis próximo (% peso base seca)			
Material volátil	ASTM D5142-04	20,59	
Carbono fijo	Por diferencia	77,49	
Cenizas	ASTM D5142-04	1,92	
Humedad (% peso)	ASTM D5142-04	11,13	
Propiedades físicas			
BET (m²/g)	-	367,33	
Volumen de poro (cm³/g)	-	0,20	
Enmendador de suelos			
pH	NTC 5167	8,80	
COT (%)	NTC 5167	33,80	
CRA (%)	NTC 5167	219,00	
CIC (meq/100 g)	NTC 5167	21,70	
Composición mineral de las cenizas (% cenizas)			
CaO	53,41	Fe₂O₃	0,74
MgO	15,41	Na₂O	0,46
P₂O₅	9,23	SrO	0,33
K₂O	6,91	BaO	0,21
MnO	6,17	CuO	0,12
Al₂O₃	2,58	TiO₂	0,00
SO₃	2,43	NiO	0,00
SiO₂	1,99	-	-



4. DISCUSIÓN

En los análisis último y próximo reportados en la Tabla 1, se observa que debido a las altas temperaturas, a los procesos difusivos de transferencia de calor y masa, y, por ende, a las reacciones (pirólisis, oxidación y reducción) asociadas a la gasificación de la biomasa, gran parte del contenido de las sustancias volátiles presentes en la materia prima se transformaron en gas de gasificación [42], tal y como lo evidencia el bajo contenido de H y O (0,97 % peso y 0,90 % peso, respectivamente), y el elevado contenido de C (97,94 % peso), el cual se asocia con la formación de un material constituido principalmente por carbono fijo (77,49 % peso) [43]. Pokhare et al. [44] y Bayu et al. [45] indicaron que el contenido de C favorece las propiedades del BC como enmendador del suelo, puesto que conduce a una mayor disponibilidad de este elemento en el suelo tratado. Adicionalmente, el BC-P obtenido supera el valor límite de contenido de C establecido por la European Biochar Certificate (EBC) para el uso del biocarbón en la enmienda del suelo [46].

Por otro lado, el contenido de cenizas (1,92 % peso) se debe a que el BC-P se deriva de una biomasa lignocelulósica, la cual posee un contenido de cenizas < 2,5 % peso [47]. Además, la mayoría de los minerales (excepto los elementos alcalinos químicamente reactivos y alcalinotérreos como el potasio (K) y el calcio (Ca)), permanecen estables durante la gasificación; en consecuencia, la cantidad total de cenizas en la fase sólida no cambia, permitiendo predecir la composición mineral de un BC desde la caracterización de la materia prima utilizada en el proceso de gasificación [48].

En cuanto al contenido de humedad, si bien las temperaturas durante el proceso de gasificación son superiores a 100 °C, la humedad remanente de 11,13 % peso en el BC-P se atribuye al vapor de agua procedente de las reacciones de oxidación, el cual se condensa en la matriz sólida carbonosa del BC, debido a la configuración del reactor de gasificación [49]. Por otro lado, según Hansen et al. [25], la relación



atómica H/C con valor de 0,12 indica una buena estabilidad del BC-P para ser aplicado como enmendador de suelos.

Respecto del contenido mineral, los BC procedentes de biomásas lignocelulósicas, en general, contienen macronutrientes como el Ca, K, el fósforo (P) y el magnesio (Mg), y micronutrientes como el boro (B), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe) y molibdeno (Mo); por lo que representan una importante reserva para los nutrientes del suelo [50]. En la Tabla 1 se puede observar que el BC-P generado tiene una significativa cantidad de macronutrientes, donde el Ca es el elemento más abundante con un 53,41%, seguido del Mg y el P con un 15,41% y 9,23%, respectivamente, y del K con un 6,91%. Este contenido mineral permite inferir un buen comportamiento del BC-P en la enmienda del suelo, puesto que las plantas requieren altos niveles de los elementos referidos [50]. Por su parte, los micronutrientes alcanzaron valores de 6,17%, 0,12% y 0,74% para el Mn, Cu y Fe, respectivamente. Cabe destacar que la presencia de Fe es importante en la enmienda del suelo puesto que permite la retención de P, especialmente en suelos ácidos [45]. La estabilidad de la estructura del suelo, especialmente la de los poros secundarios, se ve favorecida por la presencia de diversas sustancias con efectos aglutinantes, como las sustancias orgánicas y los óxidos de aluminio (Al) y de Fe. El efecto aglutinante de estas sustancias incrementa la resistencia al cizallamiento, tanto entre las partículas primarias como entre los agregados del suelo [51]. Cabe destacar que en la norma NTC 5167, en los estándares establecidos por la International Biochar Initiative (IBI) para el uso del biocarbón en el suelo [52] y en las guías para la producción de biocarbón sostenible establecidas por la EBC [46] no se especifican los niveles máximos permisibles de Al en los BC. Por otra parte, en la caracterización del BC-P objeto de estudio no se encontró presencia de metales pesados no esenciales como plomo (Pb), cadmio (Cd) y mercurio (Hg), los cuales son altamente tóxicos para el suelo [53].

De acuerdo con la NTC 5167 [39], los materiales utilizados como enmendadores de suelos deben cumplir con los siguientes



requerimientos: contenido de cenizas < 60%, contenido de humedad para materiales de origen vegetal < 35%, COT > 15% y CIC > 30 meq/100 g. Asimismo, la CRA debe ser como mínimo igual a su propio peso, el pH debe estar entre 4 y 9, y el contenido máximo de metales pesados no debe superar los siguiente valores: arsénico (As) < 41 mg/L, Cd < 39 mg/L, cromo (Cr) < 1200 mg/L, Hg < 17 mg/L, níquel (Ni) < 420 mg/L y Pb < 300 mg/L.

Es de resaltar que las propiedades del BC-P analizado en este trabajo cumplieron con los requerimientos de la norma, a excepción de la CIC, la cual interviene en la nutrición y crecimiento de las plantas [54], [55]. La CIC fue de 21,70 meq/100 g, inferior al valor establecido por la NTC 5167. El valor de CIC obtenido puede ser atribuido a las altas temperaturas a las que se llevó a cabo el proceso de gasificación, las cuales pudieron haber ocasionado una reducción en los grupos funcionales carboxilo (-COOH), hidroxilo (-OH) y carbonilo (-CO) [56]. En consecuencia, el BC cuenta con una estructura más estable (estructura aromática) que facilitó las uniones con los cationes Na^+ , K^+ y Mg^{2+} , a través de interacciones catión- π ; uniones que están directamente relacionadas con la disminución de la CIC [56]. Además, el reducido contenido de cenizas del BC-P se asocia con un bajo contenido de minerales como el Mg, el K y el sodio (Na), los cuales participan en el aumento de la CIC [57].

Por otro lado, el COT con un valor de 33,80% cumplió con la norma NTC 5167. Este valor de COT probablemente se deba a la elevada fracción recalcitrante del BC-P, siendo el resultado de la desvolatilización de la biomasa durante el proceso de gasificación y la estructura carbonosa del BC [54]. La CRA, por su parte, es una propiedad de especial importancia en la utilización del BC en la enmienda del suelo, debido a que contribuye a aumentar la absorción de agua y nutrientes por parte de los cultivos [58]. En este caso, la CRA alcanzó un valor de 219%, el cual se atribuye a la apertura de los poros cerrados y al ensanchamiento de los poros abiertos en el BC, debido a la liberación del material volátil durante el proceso de gasificación [59]. Tal y como se observa en la



Tabla 1, el BC-P tuvo un volumen de poro de 0,20 cm³/g y un área superficial BET de 367,33 m²/g. Estos valores, según González y Pérez [60] corresponden a una estructura considerablemente porosa, lo cual fue corroborado por Díez y Pérez [61].

En relación al pH, el BC-P cuenta con un valor de 8,80. De acuerdo con el estudio realizado por van Zwieten et al. [28], el BC-P producido podría ser adecuado para mejorar los suelos ácidos, puesto que permitiría el intercambio de protones (H⁺) con el suelo, generando un aumento en el pH del mismo y, con ello, la biodisponibilidad de nutrientes para las plantas como el Mg, Ca y P. Por lo tanto, se destacan las propiedades con las que cuenta el BC-P objeto de estudio para ser utilizado en la enmienda de suelos, principalmente ácidos [45]. Si bien, atendiendo al valor obtenido para la CIC, se puede pensar en el empleo de alternativas para mejorar las propiedades del BC-P generado; entre las cuales destaca su combinación con compost [62].

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se caracterizó el biocarbón obtenido a partir de la gasificación de pellets de *Pinus patula* en un reactor tipo TLUD como material aplicable en la enmienda de suelos degradados, dada la escasa información reportada en la literatura respecto a este tema de estudio. Las propiedades fisicoquímicas y el contenido mineral de las cenizas indicaron que el BC-P obtenido cumple con los requerimientos de la NTC 5167 para ser utilizado como enmendador de suelos. El pH alcalino del BC-P lo hace apropiado para incrementar el pH de suelos ácidos y, de esta forma, mejorar la biodisponibilidad de los nutrientes. Se encontró que el BC-P tiene una buena presencia de macro y micronutrientes, entre los que destacan el Ca con un 53,41% y el Mg con un 15,41%, además de la presencia de Fe, el cual permite la retención de P en suelos ácidos. Otras propiedades que corroboran el uso potencial del BC-P en la enmienda de suelos son el elevado contenido de C, con un valor de 97,94 % peso, el volumen de poro de 0,20 cm³/g y el área superficial BET



de 367,33 m²/g. De acuerdo con la caracterización realizada, se considera pertinente investigar de forma experimental el uso del BC-P en suelos de carácter ácido, explorando la posibilidad de aplicarlo en mezcla con compost para mejorar sus propiedades.

REFERENCIAS

- [1] S. P. Vilardy-Quiroga, y J. A. González Novoa, "Repensando la ciénaga: Nuevas miradas y estrategias para la sostenibilidad en la Ciénaga Grande de Santa Marta," vol. 1, 2011.
- [2] World Health Organization, "Biodiversity and Health," 2015. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/biodiversity-and-health>. [Accessed: 24 Marzo 2021].
- [3] Instituto Nacional de Salud, "Carga de enfermedad ambiental en Colombia," 2019. [Online]. Available: https://www.ins.gov.co/Direcciones/ONS/Informes/10_Carga_de_enfermedad_ambiental_en_Colombia.pdf. [Accessed: 30 Septiembre 2019].
- [4] G. Martínez, A. Corredor, y Á. Silva, "Problemática de la Pudrición del cogollo en Tumaco e instrumentos para su manejo y la renovación del cultivo," *Revista Palmas*, vol. 29, n° 3, pp. 11–16, 2008.
- [5] J. E. Lim, M. Ahmad, A. Usman, S. Lee, W. Jeon, S. Oh, J. Yang, and Y. Ok, "Effects of natural and calcined poultry waste on Cd, Pb and As mobility in contaminated soil," *Environmental Earth Science*, vol. 69, n° 1, pp. 11–20, 2013.
- [6] X. Zhang, H. Wang, L. He, K. Lu, A. Sarmah, J. Li, N. Bolan, J. Pei, H. Huang, "Using biochar for remediation of soils contaminated with heavy metals and organic pollutants," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 20, n° 12, pp. 8472–8483, 2013.
- [7] S. P. Sohi, "Carbon storage with benefits," *Science (80)*, vol. 338, n° 6110, pp. 1034–1035, 2012.



- [8] F. Verheijen, S. Jeffery, A. C. Bastos, M. van der Velde, I. Diafas, and C. Parsons, *Biochar Application to Soils: A Critical Scientific Review of Effects on Soil Properties, Processes and Functions*. *Joint Research Centre*, 2009.
- [9] B. Glaser, J. Lehmann, and W. Zech, "Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal - A review," *Biology and Fertility Soils*, vol. 35, n° 4, pp. 219–230, 2002.
- [10] J. Lehmann, M. C. Rillig, J. Thies, C. A. Masiello, W. C. Hockaday, and D. Crowley, "Biochar effects on soil biota - A review," *Soil Biology Biochemistry*, vol. 43, n° 9, pp. 1812–1836, 2011.
- [11] "International Biochar Initiative," What is biochar?, 2019. [Online]. Available: <https://biochar-international.org/biochar-in-developing-countries/>. [Accessed: 03-Jun-2019].
- [12] M. Ahmad, A. Upamali, J. Lim, M. Zhang, N. Bolan, D. Mohan, M. Vithanage, S. Lee, and Y. Ok, "Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review," *Chemosphere*, vol. 99, pp. 19–33, 2014.
- [13] T. Brudey, L. Largitte, C. Jean-Marius, T. Tant, P. C. Dumesnil, and P. Lodewyckx, "Adsorption of lead by chemically activated carbons from three lignocellulosic precursors," *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol. 120, pp. 450–463, 2016.
- [14] N. B. Klinghoffer, M. J. Castaldi, and A. Nzihou, "Catalyst properties and catalytic performance of char from biomass gasification," *Industrial Engineering Chemistry Research*, vol. 51, n° 40, pp. 13113–13122, 2012.
- [15] A. García-García, A. Gregório, C. Franco, F. Pinto, D. Boavida, and I. Gulyurtlu, "Unconverted chars obtained during biomass gasification on a pilot-scale gasifier as a source of activated carbon production," *Bioresource Technology*, vol. 88, n° 1, pp. 27–32, 2003.
- [16] L. Lundberg, P. A. Tchoffor, D. Pallarès, R. Johansson, H. Thunman, and K. Davidsson, "Influence of surrounding conditions and fuel size on the gasification rate of biomass char in a fluidized bed," *Fuel Processing Technology*, vol. 144, pp. 323–333, 2016.



- [17] J. J. Hernández, M. Lapuerta, and E. Monedero, "Characterisation of residual char from biomass gasification: effect of the gasifier operating conditions," *Journal of Cleaner Production*, vol. 138, pp. 83–93, 2016.
- [18] J. F. Perez, P. N. Benjumea, and A. Melgar, "Sensitivity analysis of a biomass gasification model in fixed bed downdraft reactors: Effect of model and process parameters on reaction front," *Biomass and Bioenergy*, vol. 83, pp. 403–421, 2015.
- [19] J. J. Hernández, M. Lapuerta, and E. Monedero, "Characterisation of residual char from biomass gasification: effect of the gasifier operating conditions," *Journal Cleaner Production*, vol. 138, pp. 83–93, 2016.
- [20] K. Qian, A. Kumar, K. Patil, D. Bellmer, D. Wang, W. Yuan, and R. Huhnke, "Effects of biomass feedstocks and gasification conditions on the physiochemical properties of char," *Energies*, vol. 6, n° 8, pp. 3972–3986, 2013.
- [21] K. Qian, A. Kumar, H. Zhang, D. Bellmer, and R. Huhnke, "Recent advances in utilization of biochar," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 42, pp. 1055–1064, 2015.
- [22] J. M. Novak, W. J. Busscher, D. L. Laird, M. Ahmedna, D. W. Watts, and M. A. S. Niandou, "Impact of biochar amendment on fertility of a southeastern coastal plain soil," *Soil Science*, vol. 174, n° 2, pp. 105–112, 2010.
- [23] B. Zhao, D. O'Connor, J. Zhang, T. Peng, Z. Shen, D. Tsang, and D. Hou. "Effect of pyrolysis temperature, heating rate, and residence time on rapeseed stem derived biochar," *Journal Cleaner Production*, vol. 174, pp. 977–987, 2018.
- [24] W. Buss, J. G. Shepherd, K. V. Heal, and O. Mašek, "Spatial and temporal microscale pH change at the soil-biochar interface," *Geoderma*, vol. 331, n° April, pp. 50–52, 2018.
- [25] V. Hansen, D. Müller-Stöver, J. Ahrenfeldt, J. K. Holm, U. B. Henriksen, and H. Hauggaard-Nielsen, "Gasification biochar as a valuable by-product for carbon sequestration and soil amendment," *Biomass and Bioenergy*, vol. 72, n° 1, pp. 300–308, 2015.



- [26] B. P. Singh, A. L. Cowie, and R. J. Smernik, "Biochar carbon stability in a clayey soil as a function of feedstock and pyrolysis temperature," *Environmental Science Technology*, vol. 46, n° 21, pp. 11770–11778, 2012.
- [27] Y. Almaroai, A. Usman, M. Ahmad, D. Moon, C. Jeon, S. Lee, and Y. Ok, "Effects of biochar, cow bone, and eggshell on Pb availability to maize in contaminated soil irrigated with saline water," *Environmental Earth Sciences*, vol. 71, n° 3, pp. 1289–1296, 2014.
- [28] L. van Zwieten, S. Kimber, S. Morris, K. Y. Chan, A. Dowie, J. Rust, S. Joseph, and A. Cowie, "Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility," *Plant Soil*, vol. 327, n° 1, pp. 235–246, 2010.
- [29] F. Rees, M. O. Simonnot, and J. L. Morel, "Short-term effects of biochar on soil heavy metal mobility are controlled by intra-particle diffusion and soil pH increase," *European Journal of Soil Science*, vol. 65, n° 1, pp. 149–161, 2014.
- [30] J. Paz-Ferreiro, H. Lu, S. Fu, A. Méndez, and G. Gascó, "Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: A review," *Solid Earth*, vol. 5, n° 1, pp. 65–75, 2014.
- [31] FAO, "FAOSTAT - Forestry production and trade," 2019. [Online]. Available: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FO/visualize>. [Accessed: 14 Abril 2020].
- [32] J. F. Pérez, and G. L. Ramírez, "Aplicaciones agroenergéticas con maderas cultivadas y oportunidades preliminares de mercado," 1st ed. Medellín (Colombia), Editorial Universidad de Antioquia, 2019.
- [33] Minagricultura, "Colombia tiene un potencial forestal de 24 millones de hectáreas para explotación comercial," 2015. [Online]. Available: <https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Colombia-tiene-un-potencial-forestal.aspx>. [Accessed: 14 Abril 2020].
- [34] J. F. Pérez, M. R. Pelaez-Samaniego, and M. García-Pérez, "Torrefaction of fast-growing Colombian wood species," *Waste and Biomass Valorization*, vol. 10, n° 6, pp. 1655–1667, 2019.



- [35] S. Ramos-Carmona, J. D. Martínez, and J. F. Pérez, "Torrefaction of patula pine under air conditions: A chemical and structural characterization," *Industrial Crops and Products*, vol. 118, pp. 302–310, 2018.
- [36] ASTM, "D5373-08 standard test methods for instrumental determination of carbon, hydrogen, and nitrogen in laboratory samples of coal, ASTM International, West Conshohocken, PA,," 2008.
- [37] T. de P. Protásio, L. Bufalino, G. H. Denzin, M. G. Junior, P. F. Trugilho, and L. M. Mendes, "Brazilian lignocellulosic wastes for bioenergy production: Characterization and comparison with fossil fuels," *BioResources*, vol. 8, n° 1, pp. 1166–1185, 2013.
- [38] D. Medic, M. Darr, A. Shah, B. Potter, and J. Zimmerman, "Effects of torrefaction process parameters on biomass feedstock upgrading," *Fuel*, vol. 91, n° 1, pp. 147–154, 2012.
- [39] NTC, "Productos para la industria agrícola. Productos orgánicos usados como abonos o fertilizantes y enmiendas de suelo - NTC 5167 Standard," 2011.
- [40] V. Gunarathne, A. Senadeera, U. Gunarathne, J. K. Biswas, Y. A. Almaroai, and M. Vithanage, "Potential of biochar and organic amendments for reclamation of coastal acidic-salt affected soil," *Biochar*, vol. 2, n° 1, pp. 107–120, 2020.
- [41] D. Vamvuka, M. Pitharoulis, G. Alevizos, E. Repouskou, and D. Pentari, "Ash effects during combustion of lignite/biomass blends in fluidized bed," *Renewable Energy*, vol. 34, n° 12, pp. 2662–2671, 2009.
- [42] W. A. González, J. F. Pérez, S. Chapela, and J. Porteiro, "Numerical analysis of wood biomass packing factor in a fixed-bed gasification process," *Renewable Energy*, vol. 121, pp. 579–589, 2018.
- [43] L. Dunnigan, B. J. Morton, P. J. Ashman, X. Zhang, and C. W. Kwong, "Emission characteristics of a pyrolysis-combustion system for the co-production of biochar and bioenergy from agricultural wastes," *Waste Management*, vol. 77, pp. 59–66, 2018.



- [44] P. Pokharel, and S. X. Chang, "Manure pellet, woodchip and their biochars differently affect wheat yield and carbon dioxide emission from bulk and rhizosphere soils," *Science of the Total Environment*, vol. 659. pp. 463–472, 2019.
- [45] D. Bayu, A. Dejene, R. Alemayehu, and B. Gezahegn, "Improving available phosphorus in acidic soil using biochar," *Journal of Soil Science and Environmental Managemet*, vol. 8, n° 4, pp. 87–94, 2017.
- [46] H. Schmit, S. Abiven, C. Kammann, and B. Glaser, "European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar," *Agronomical Use of Biochar*, vol. 8, pp. 1–22, 2019.
- [47] H. E. Díez, and J. F. Pérez, "Physicochemical characterization of representative firewood species used for cooking in some Colombian regions," *International Journal of Chemical Engeeniring*, vol. 2017, pp. 1–13, 2017.
- [48] Y. Wang, R. Yin, and R. Liu, "Characterization of biochar from fast pyrolysis and its effect on chemical properties of the tea garden soil," *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol. 110, n° 1, pp. 375–381, 2014.
- [49] F. V. Tinaut, A. Melgar, J. F. Pérez, and A. Horrillo, "Effect of biomass particle size and air superficial velocity on the gasification process in a downdraft fixed bed gasifier. An experimental and modelling study," *Fuel Processing Technology*, vol. 89, n° 11, pp. 1076–1089, 2008.
- [50] I. Baptista, I. Miranda, T. Quilhó, J. Gominho, and H. Pereira, "Characterisation and fractioning of *Tectona grandis* bark in view of its valorisation as a biorefinery raw-material," *Industrial Crops and Products*, vol. 50, pp. 166–175, 2013.
- [51] H. Blume, G. W. Brümmer, R. Horn, and I. Kögel-knabner, *Soil Science*. Berlin, Springer, 2016.
- [52] International Biochar Initiative, "Standardized Product Definition and Product Testing Guidelines for Biochar That Is Used in Soil," *IBI*, p. 23, 2015.



- [53] P. Godlewska, Y. S. Ok, and P. Oleszczuk, "The dark side of black gold: Ecotoxicological aspects of biochar and biochar-amended soils," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 403, 2020-2021.
- [54] Y. Ok, S. Uchimiya, S. Chang, and N. Bolan, *Biochar: production, characterization, and applications*. New York, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016.
- [55] J. W. Lee, M. Kidder, B. Evans, S. Paik, A. Buchanan, C. Garten, and R. Brown, "Characterization of biochars produced from cornstovers for soil amendment," *Environmental Science Technology*, vol. 44, n. 20, pp. 7970–7974, 2010.
- [56] J. L. Gomez-Eyles, T. Sizmur, and E. Moreno-Jiménez, "The potential of biochar amendments to remediate contaminated soils," *Biochar Soil Biota*, 2013.
- [57] S. Mia, N. Uddin, S. A. Al Mamun Hossain, R. Amin, F. Z. Mete, and T. Hiemstra, "Production of Biochar for Soil Application: A Comparative Study of Three Kiln Models," *Pedosphere*, vol. 25, n° 5, pp. 696–702, 2015.
- [58] O. Y. Yu, M. Harper, M. Hoepfl, and D. Domermuth, "Characterization of biochar and its effects on the water holding capacity of loamy sand soil: Comparison of hemlock biochar and switchblade grass biochar characteristics," *Environmental Progress and Sustainable Energy*, vol. 36, n° 5, pp. 1474–1479, 2017.
- [59] W. A. W. A. K. Ghani, A. Mohd, G. Silva, R. Bachmann, Y. Taufiq, U. Rashid, and A. Muhtaseb, "Biochar production from waste rubber-wood-sawdust and its potential use in C sequestration: Chemical and physical characterization," *Industrial Crops and Products*, vol. 44, pp. 18–24, 2013.
- [60] W. A. González, and J. F. Pérez, "CFD analysis and characterization of biochar produced via fixed-bed gasification of fallen leaf pellets," *Energy*, vol. 186, 2019.



- [61] H. E. Díez and J. F. Pérez, "Effects of wood biomass type and airflow rate on fuel and soil amendment properties of biochar produced in a top-lit updraft gasifier," *Environmental Progress and Sustainable Energy*, vol. 38, n° 4, pp. 1–14, 2019.
- [62] H. K. Nsamba, S. E. Hale, G. Cornelissen, and R. T. Bachmann, "Designing and Performance Evaluation of Biochar Production in a Top-Lit Updraft Up-scaled Gasifier," *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, vol. 05, n° 02, pp. 41–55, 2015.



Bioprecipitación de carbonato de calcio mediada por aislados nativos de *Bacillus* spp

Juan Felipe Zapata Martínez.

Bacteriólogo, Especialista y Magíster en Biotecnología de Bioprocesos Microbianos Universidad Pontificia Bolivariana, Profesor tiempo Completo en la Corporación Universitaria Remington, investigador del grupo de investigación de Ciencias Básicas Biomédicas de la Corporación Universitaria Remington, juan.zapata@uniremington.edu.co, juan.zapatam@udea.edu.co

Cardona Echeverry Andrés.

Ingeniero Biomédico, Magíster en Ingeniería Biomédica Instituto Tecnológico Metropolitano, Estudiante de Doctorado en ciencias de la vida y de la Salud, Université Côte d'Azur, iBV, CNRS UMR7277, Inserm, Niza, Francia, andres.cardona@unice.fr

García Ávila Carolina.

Bacterióloga, Especialista y Magíster en Biotecnología de Bioprocesos Microbianos, Profesor tiempo Completo Tecnológico de Antioquia, Institución Universitaria, Grupo de Investigación en Temas Agroambientales (INTEGRA) Tecnológico de Antioquia, IU, cavilaga@tdea.edu.co

Resumen— En el ambiente existen diferentes carbonatos inorgánicos en forma de minerales y rocas importantes, entre ellos están la calcita (CaCO_3). En cuanto a este compuesto se ha reportado en la literatura que la mayoría de las bacterias heterotróficas del suelo inducen la precipitación de carbonato cálcico. Este tipo de investigaciones pueden aportar solución a múltiples problemas ambientales, como lo son la erosión, ecosíntesis, la estabilización de suelos, la fijación de CO_2 atmosférico a través de la formación de sedimento de carbonato y litificación, entre otros. El objetivo de este estudio fue establecer las condiciones óptimas en la curva de crecimiento de aislados nativos de *Bacillus* spp para la producción de cristales, en el cual se encontró que en la fase exponencial de su ciclo de crecimiento es donde los microorganismos poseen mayor capacidad precipitadora, igualmente se determinó que las condiciones óptimas para la bioprecipitación y la estabilidad de los cristales están directamente relacionadas con un pH ligeramente alcalino.

Palabras clave— Carbonato de calcio, *Bacillus* spp, bioprecipitación, biomineralización, curva de crecimiento.



1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza suceden diversos procesos químicos de sedimentación y nucleación mineral, estos procesos están generalmente acompañados por procesos biológicos [1], [2], los cuales ocurren a menudo de manera simultánea o secuencialmente. A estos fenómenos de mineralización, con participación en la precipitación y formación de cristales o estructuras minerales de seres vivos o con un sustrato orgánico, se les conoce como bioprecipitación o biomineralización.

Los exo y endo esqueleto de múltiples organismos son claros ejemplos de biomineralización [3]. Asimismo, se han encontrado diversos microorganismos asociados a la bioprecipitación de cristales. Actualmente, la aplicación de estos procesos microbianos emerge como un área de estudio de interés para la investigación científica y diversas industrias, tales como la química, farmacéutica, nuevos materiales y construcción, entre otros [1], [2], [4], [8].

Uno de los procesos de mineralización más ampliamente estudiado, en el cual se ha reportado participación de microorganismos, está en la formación de cristales de carbonatos. Dichos cristales son aquellos compuestos por el ion carbonato CO_3^{2-} , el cual tiene la capacidad de interactuar con otros iones y formar así diversos tipos de cristales de carbonato, como la siderita (ZnCO_3), magnetita (MgCO_3) o la calcita (CaCO_3), entre otros [2], [4], [9], [14].

Diversos microorganismos participan y están asociados a la precipitación natural del carbonato en varios medios naturales [15], incluyendo suelos, formaciones geológicas, biofilms de agua dulce, océanos y lagos salinos [16], [17], al igual que en depósitos de carbonato en meteoritos marcianos [18]. Numerosos estudios indican que el proceso ocurre como producto del metabolismo microbiano [19], [21], el cual aumenta la alcalinidad del medio, favoreciendo la precipitación del CaCO_3 .



Debido a que es un área de estudio que emerge como una alternativa ambientalmente limpia en los procesos industriales y en el sector de la construcción, este trabajo tuvo como objetivo buscar microorganismos nativos en suelos con capacidad de inducir mineralización o bioprecipitación para ser aplicados como alternativa innovadora en las diferentes áreas mencionadas, sin provocar alteraciones en el ambiente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Microorganismos

Para este estudio se utilizaron nativos aislados de microorganismos obtenidos a partir de una mina de oro de Antioquia-Colombia (6°55'52.3"N 74°62'88.6"W). Estos aislados fueron reconstituidos en medio Ampes (compuesto de NaCl 0,5%, peptona 1%, extracto de levadura 0,5%, agua destilada desionizada y agar bacteriológico 1%) e incubados por 24 horas a 35°C. Después del periodo de incubación, se realizó una tinción de Gram para, primero, corroborar pureza del cultivo y así seleccionar los bacilos Gram positivos y, segundo, preparar el inóculo.

B. Clasificación bacteriana

En la clasificación del microorganismo seleccionado, se realizaron pruebas bioquímicas de rutina y técnicas de biología molecular de secuenciación del gen del ARNr 16s, con los primers universales 27F, 518F, 800R, y 1492R [22].

C. Medios de cultivo para la curva de crecimiento

Se prepararon 24 frascos estériles tapa rosca con 50 ml del medio de cultivo líquido B4 (compuesto de acetato de calcio 0,25%, extracto de levadura 0,4%, dextrosa 0,5% y agua destilada y desionizada, esterilizado mediante vapor húmedo a 121°C) [23], [24].



D. Preparación inóculo

En cámara de bioseguridad, bajo condiciones de asepsia, se tomó de cada frasco 5ml de medio B4 líquido y se agregó el inóculo bacteriano de *Bacillus* spp nativo hasta alcanzar una turbidez semejante a la del patrón de MacFarland N° 5, equivalente a 15×10^8 UFC/ml; luego, se preparó una dilución de 1:10 regresando estos 5ml al frasco del que habían sido extraído; se sellaron; y se llevaron a incubar en agitación a 35°C y 120 rpm por 48 horas. Los frascos fueron rotulados según el tiempo de medición de variables, dado que cada uno de ellos se descartó conforme fue extraído para realizar los análisis de seguimiento.

E. Método de medición

Cada 2 horas se tomó un frasco del agitador y se le realizó mediciones de pH, peso seco celular, presencia de cristales amorfos de carbonato y se sembraron 100µL y 10 µL en agar B4 (compuesto de acetato de calcio 0,25%, extracto de levadura 0,4%, dextrosa 0,5%, agar bacteriológico 1% y agua destilada y desionizada), los cuales se llevaron a incubar por 24 horas a 37°C para hacer conteo de colonias y para evaluar la producción de cristales en medio sólido, los bordes de la caja Petri fueron sellados con cinta de enmascarar y se almacenaron en incubadora a 37°C por 30 días, se realizó revisión diaria de la producción del cristal.

F. Estimación del crecimiento y producción de cristales de carbonato en medio sólido

Para la estimación de la concentración y el seguimiento del crecimiento mediante conteo celular se tomó un frasco sellado del agitador y se llevó a cámara de bioseguridad, en donde se procesó en condiciones estériles, se sembraron 100µL y 10 µL en agar B4 y luego se incubó a 37°C por 24 horas para conteo de unidades formadoras de colonias. Seguido al conteo, la caja de Petri se cerró con cinta de enmascarar en los bordes y se llevó a incubar durante 30 días para observar la formación de cristales de carbonato sobre el medio sólido, utilizando



microscopía óptica (microscopio óptico Olympus CH30). Después de evidenciar los cristales sobre el agar, este fue evaporado para aislarlos por raspado y ser analizados en microscopio óptico en un medio de contraste de Dimetilsulfóxido (DMSO), lo cual permitió observar mejor la morfología de los cristales de carbonato de Calcio. Además del análisis morfológico bajo microscopía óptica, se sometieron los cristales al ácido clorhídrico, para evidenciar la reacción de efervescencia característica de estos cristales en presencia de ácidos.

G. Estimación del crecimiento y producción de cristales de carbonato en medio líquido

Para la estimación de la concentración y el seguimiento del crecimiento mediante la técnica de peso seco celular, se tomaron dos frascos tapa rosca con capacidad de 5 ml completamente secos y estériles, en cada uno se depositaron 2 ml de medio cultivo líquido extraído cada 2 horas del frasco al que le correspondía la medición, según el orden asignado luego de la inoculación. El contenido de uno de los frascos se centrifugó a 4.500 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue destinado a un examen directo para buscar cristales amorfos y ver la pureza del medio; el precipitado del otro frasco se llevó a un horno a 75°C para obtener peso seco.

H. Medición de pH

Simultáneamente con la medición del crecimiento y producción de cristales de carbonato en medio líquido, proceso realizado cada dos horas, para lo cual se calibró el equipo (pH-meter Shott) con las soluciones estándar de 4,01 y 7,01, se procedió a lavar el electrodo con agua desionizada, se homogenizó la muestra y se realizó medición directa de pH por triplicado, lavando entre cada medición para reportar el valor promedio de las lecturas realizadas.



I. Análisis de datos

Los datos fueron procesados en el programa Excel® y posteriormente fueron graficados relacionando variables como tiempo, crecimiento (peso seco), pH y producción de cristales en medio sólido y líquido.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Reconstitución bacteriana y Gram

Los *Bacillus* spp fueron reconstituidos en medio B4 agar, los cuales en la tinción de Gram revelaron un aislado puro de bacilos Gram positivos con granulaciones. Estos microorganismos son los procariotas más ampliamente estudiados en relación a los procesos de biomineralización, específicamente asociados a la precipitación de carbonatos, debido a su rica composición de una matriz de macromoléculas orgánicas (MMO), la ruta por la que estos se ven involucrados en la matriz se denomina biomineralización inducida, la cual se lleva a cabo en un ambiente abierto, y no se cree que esté asociada ninguna estructura celular especializada o mecanismo molecular específico [8], [10], [14], [16], [20].

El depósito de carbonato de calcio por las bacterias generalmente se considera inducido, y el tipo de mineral producido depende en gran medida de las condiciones ambientales [25]. Sin embargo, estudios más recientes demostraron la participación de un grupo de genes en la precipitación de carbonatos de calcio por parte de bacterias tipo *Bacillus* spp [26].

B. Clasificación bacteriana

El análisis de las secuencias obtenidas mediante técnicas de biología molecular de secuenciación del gen del ARNr 16s, con los primers universales 27F, 518F, 800R, y 1492, fue realizado con el clasificador de



RDP (Ribosomal Database Project), determinando que se trataba de una secuencia de un microorganismo perteneciente al género *Bacillus*; sin embargo, el poder de resolución de este clasificador, no permitió asignar una especie, esta dificultad se debe posiblemente a las estrechas relaciones evolutivas entre diversas especies de *Bacillus spp* [27].

C. Curva de crecimiento

La estimación de la concentración y el seguimiento del crecimiento mediante la técnica de peso seco celular determinaron la curva de crecimiento. Los datos de los pesos fueron tabulados para luego ser graficados; se observó que la fase de latencia duró entre ocho a diez horas para luego dar inicio a la fase exponencial, en la que los microorganismos se adaptan a las condiciones de cultivo e inician una multiplicación exponencial o logarítmicamente. Este momento terminó a las 22 horas y dio inicio a la fase estacionaria que tuvo una duración de 16 horas. No obstante, en la hora 30 se nota una caída en la fase estacionaria para luego volver a estabilizarse a las 32 horas de incubación. Posteriormente, comienza la fase de muerte, donde es mayor la concentración de microorganismos que de nutrientes (Figura 1).

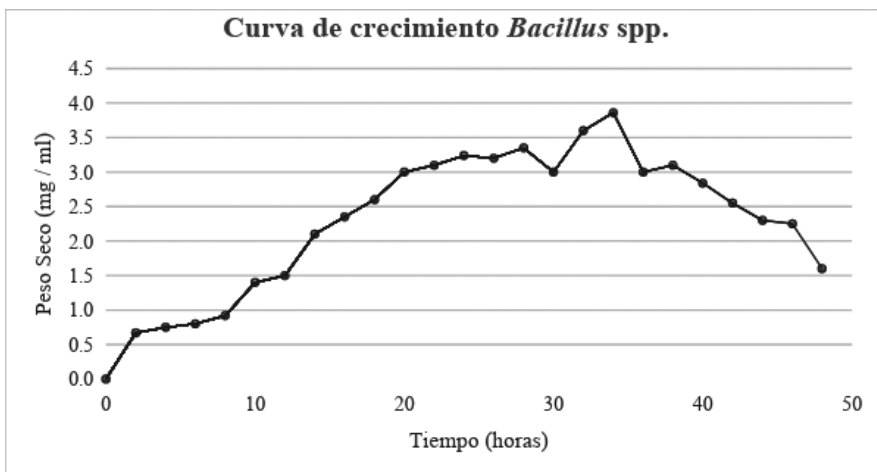


Fig. 1. Determinación del crecimiento de *Bacillus spp* en medio del cultivo líquido B4, mediante peso seco.



El comportamiento de la curva fue el de una de crecimiento normal [28]; a pesar de ello, como se indicó anteriormente, a las 30 horas de incubación se presentó una disminución en la concentración, tal vez por una mala desecación durante el procesos para determinar el peso seco, o probablemente porque la bacteria tiene un crecimiento escalonado, que suele suceder cuando se agota un nutriente del medio y la bacteria tiene un receso para activar otra ruta metabólica y aprovechar otro sustrato del medio. En un estudio piloto previo y de menos tiempo de incubación para estandarizar la curva de crecimiento, se encontró un fenómeno parecido, el cual es para estudiar en futuras investigaciones. Determinar el comportamiento de la curva de crecimiento bacteriana fue un paso importante para establecer relaciones entre la producción de cristales y el crecimiento bacteriano, el pH y la concentración bacteriana y el pH con respecto a la estabilidad de los cristales.

D. Medición de pH

Durante el tiempo de incubación a temperatura constante, el pH se tornó más ácido, esto debido a los metabolitos bacterianos que tienden a acidificar los medios, a medida que se disminuye el sustrato y aumenta la población bacteriana; por ende, se aumentan los residuos metabólicos de carácter ácido (Figura 2) [29].

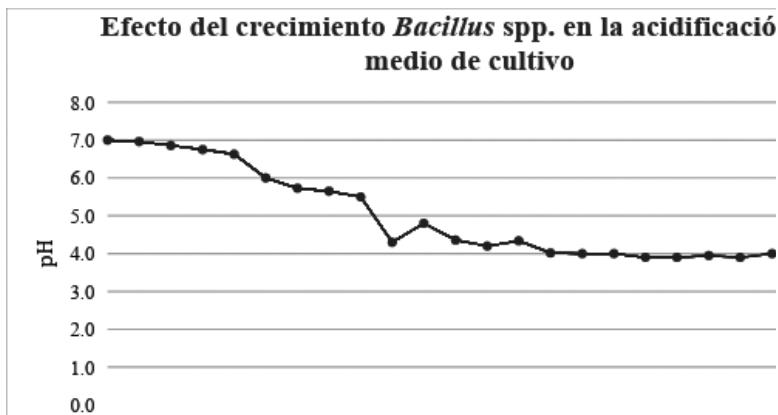


Fig. 2. Efecto del crecimiento *Bacillus* spp en la acidificación del medio de cultivo B4.



Luego de las 30 horas de incubación, el pH del medio tuvo un valor por debajo de 4.0 y la población microbiana comenzó a descender para entrar a la fase de muerte, debido al desequilibrio entre disponibilidad de nutrientes y el aumento de la población. La tendencia del pH a valores ácidos no es favorable para la bioprecipitación de los carbonatos de calcio, pues su formación requiere medios alcalinos, otra posible explicación es la internacionalización del Ca como medida homeostática, lo cual disminuye la concentración de calcio extracelular, el cual debe encontrarse a altas concentraciones en el medio respecto al calcio intracelular para poder inducir la nucleación sobre la membrana o pared bacteriana [15].

E. Observación de cristales

En las observaciones microscópicas de los precipitados, en las primeras cuatro horas se evidenciaron cristales amorfos en forma de ripio o fragmentos, estas fueron estructuras pequeñas y refringentes, poco compactas y muy dispersas, a las ocho horas cuando el pH era de 5,8, las estructuras aumentaron de tamaño y comenzaron a compactarse. Empero, a medida que el valor del pH descendió las estructuras perdieron tamaño y se separaron. Hasta las 20 horas, cuando el pH era de 4,2, se evidenciaron cristales en los precipitados del medio de cultivo líquido, indicando esto que los cristales amorfos tienen una estabilidad pH hasta de 4,2.

Después de las 20 horas y con el pH por debajo de 4,0, no se comprobaron más cristales, corroborando esto lo reportado en la literatura sobre la degradación de los cristales en medios ácidos [30]. Desde el punto de vista de la química energética, es compleja la nucleación de un cristal a partir de una solución acuosa y se requiere de un grado muy alto de súper saturación [31].



F. Crecimiento en medio sólido (agar B4)

Después de 24 horas de incubación solo se observó crecimiento hasta el subcultivo número 14 ,correspondiente a 28 horas de incubación, y el conteo celular para la dilución de 100 μ L fue de 500 ufc/ml, en la dilución de 10 μ L para esta siembra no hubo crecimiento.

G. Observación de cristales en agar B4

Sobre los agares solo se observó producción de cristales en ambas diluciones (100 μ L y 10 μ L) hasta la siembra número 10, equivalente a 20 horas de incubación, sobre el agar se observaron cristales característicos de carbonato, con un tamaño de 0,5 a 1 milímetro aproximadamente (Figura 3). Esto podría sugerir que la actividad de bioprecipitación es mucho mayor durante la fase exponencial, seguramente por la alta actividad enzimática; por ende, se sugiere realizar estudios que permitan identificar enzimas o actividad génica relacionada con la biomineralización, la relevancia de la curva de crecimiento se relaciona con un potencial uso industrial en la producción de carbonatos. En este estudio, puede evidenciarse que la biomineralización tanto en medio líquido como en medio sólido coinciden en las primeras 20 horas de incubación.

En la observación en microscopio óptico de los cristales (Figura 4) se encontró bifurcaciones centrales, morfología que en la literatura se relaciona con vaterita o calcita, siendo más probable la formación de calcita por su estabilidad, la prueba con ácido clorhídrico fue positiva, pues al someter los cristales obtenidos a esta sustancia se evidenció efervescencia, producto de la liberación de oxígeno. Sin embargo, el actual estudio no pudo discriminar entre estos carbonatos y se sugiere realizar estudios que permitan esta caracterización en las condiciones planteadas.



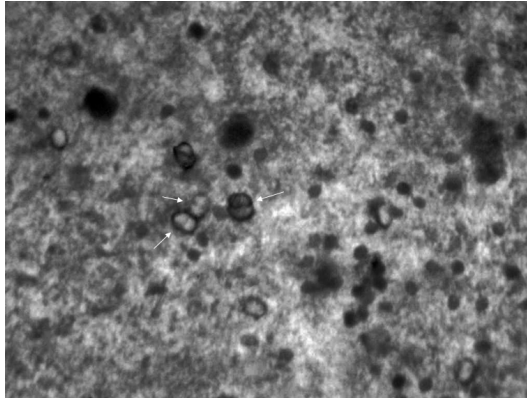


Fig. 3. Observación de cristales con morfología de pesa (flecha) característicos de carbonato y otras morfologías de cristales dispersos y más oscuros en sobre el agar.

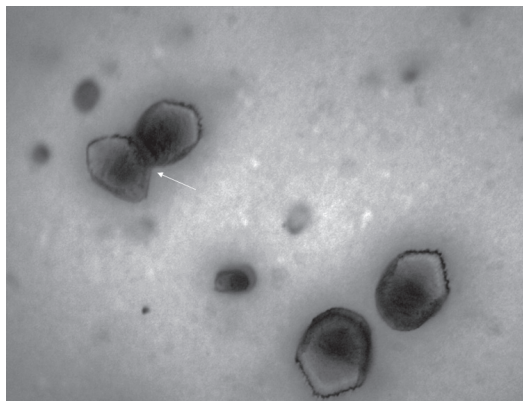


Fig. 4. Cristales característicos de carbonato de calcio con bifurcación central (flecha) y otras estructuras amorfas de carbonato de calcio al ser observados mediante microscopio óptico y con DMSO como medio.

Finalmente, al someter los cristales a la prueba de HCl al 5%, se evidenció efervescencia sugiriendo que estos son estructuras de carbonato de calcio, debido a la disociación del carbonato por parte del ácido que se ve obligado a fluir dentro de la estructura de poros del cristal alterando sus características [32].



4. CONCLUSIONES

La fase óptima de precipitación de cristales por la bacteria se encuentra durante la fase exponencial del *Bacillus* spp, fase en la cual se determinó que el microorganismo tiene mayor capacidad de bioprecipitación.

El pH está relacionado directamente con la producción de cristales y medios muy ácidos inhiben su precipitación, tal como se reporta en la literatura.

La evaluación de las condiciones de crecimiento de aislados nativos de *Bacillus* spp brindan aproximaciones a la estandarización de procesos de biomineralización con potencial biotecnológico e industrial.

5. AGRADECIMIENTOS

A la PhD Margarita Enid Ramirez del Centro de Estudios y de Investigación en Biotecnología (CIBIOT) por incentivar este estudio y motivar y orientar en la profundización de estos resultados en investigaciones posteriores.



REFERENCIAS

- [1] S. K. Ramachandran, V. Ramakrishnan, and S. S. Bang, «Remediation of Concrete Using Microorganisms,» *Acid Materials Journal*, vol. 98, nº 1, pp. 3-9, 2001, doi: 10.14359/10154.
- [2] B. Krajewska, «Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: A review,» *Journal of Advanced Research*, vol. 13, pp. 59-67, 2018, doi: 10.1016/j.jare.2017.10.009.
- [3] S. Weiner, and L. Addadi, «Design strategies in mineralized biological materials,» *Juornal Materials Chemistry*, vol. 7, nº 5, pp. 689-702, ene. 1997, doi: 10.1039/A604512J.
- [4] E. E. Rios-Valenciana, R. Briones-Gallardo, L. F. Cházaro-Ruiz, N. Martínez-Villegas, and L. B. Celis, «Role of indigenous microbiota from heavily contaminated sediments in the bioprecipitation of arsenic,» *Journal of Hazardous Materials*, vol. 339, pp. 114-121, oct. 2017, doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.06.019.
- [5] C. Lors, D. Damidot, L. Petit, A. Legrix, N. C. Tran, and B. Masson, «Bioprecipitation of a calcium carbonate – Biofilm composite on the surface of concrete for the maintenance of nuclear reactor enclosures,» *Construction and Building Materials*, vol. 237, p. 117618, 2020, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2019.117618.
- [6] L. Jiang, X. Liu, H. Yin, Y. Liang, H. Liu, B. Miao, Q. Peng, D. Meng, S. Wang, J. Yang, and Z. Guo, «The utilization of biomineralization technique based on microbial induced phosphate precipitation in remediation of potentially toxic ions contaminated soil: A mini review,» *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 191, p. 110009, 2020, doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.110009.
- [7] Z. Basaran Bundur, M. J. Kirisits, and R. D. Ferron, «Biomineralized cement-based materials: Impact of inoculating vegetative bacterial cells on hydration and strength,» *Cement and Concrete Research*, vol. 67, pp. 237-245, 2015, doi: 10.1016/j.cemconres.2014.10.002.



- [8] V. Achal, A. Mukherjee, D. Kumari, and Q. Zhang, «Biomineralization for sustainable construction – A review of processes and applications,» *Earth-Science Reviews*, vol. 148, pp. 1-17, 2015, doi: 10.1016/j.earscirev.2015.05.008.
- [9] V. Pasquale, S. Fiore, D. Hlayem, A. Lettino, F. Huertas, E. Chianese, and S. Duomontet, «Biomineralization of carbonates induced by the fungi *Paecilomyces inflatus* and *Plectosphaerella cucumerina*,» *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 140, pp. 57-66, may 2019, doi: 10.1016/j.ibiod.2019.03.005.
- [10] S. Anne, O. Rozenbaum, P. Andreazza, and J.-L. Rouet, «Evidence of a bacterial carbonate coating on plaster samples subjected to the Calcite Bioconcept biomineralization technique,» *Construction and Building Materials*, vol. 24, n° 6, pp. 1036-1042, 2010, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2009.11.014.
- [11] N. K. Dhimi, M. E. C. Quirin, and A. Mukherjee, «Carbonate biomineralization and heavy metal remediation by calcifying fungi isolated from karstic caves,» *Ecological Engineering.*, vol. 103, pp. 106-117, 2017, doi: 10.1016/j.ecoleng.2017.03.007.
- [12] J. Li, K. Benzerara, S. Bernard, and O. Beyssac, «The link between biomineralization and fossilization of bacteria: Insights from field and experimental studies,» *Chemical Geology*, vol. 359, pp. 49-69, 2013, doi: 10.1016/j.chemgeo.2013.09.013.
- [13] X. Qian, C. Fang, M. Huang, and V. Achal, «Characterization of fungal-mediated carbonate precipitation in the biomineralization of chromate and lead from an aqueous solution and soil,» *Journal Cleaner Productions*, vol. 164, pp. 198-208, 2017, doi: 10.1016/j.jclepro.2017.06.195.
- [14] P. P. F. Brasileiro, R. D. C. F. S. D. Silva, F. C. P. D. R. E. Silva, Y. B. Brandao, L. A. Sarubbo, and M. Benachour, «Biomineralization of Calcium Carbonate by *Bacillus Cereus* for Self-healing Biocement,» *Chemical Engineering Transactions*, vol. 79, pp. 97-102, 2020, doi: 10.3303/CET2079017.



- [15] F. Hammes, and W. Verstraete, «Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation,» *Reviews Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 1, n° 1, pp. 3-7, 2002, doi: 10.1023/A:1015135629155.
- [16] J. Peckmann, J. Paul, and V. Thiel, «Bacterially mediated formation of diagenetic aragonite and native sulfur in Zechstein carbonates (Upper Permian, Central Germany),» *Sedimental Geology*, vol. 126, n° 1, pp. 205-222, 1999, doi: 10.1016/S0037-0738(99)00041-X.
- [17] S. Wei, H. Cui, Z. Jiang, H. Liu, H. He, and N. Fang, «Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments,» *Brazilian Journal Microbiology*, vol. 46, n° 2, pp. 455-464, 2015, doi: 10.1590/S1517-838246220140533.
- [18] D. S. McKay, E. Gibson, K. Thomas, H. Vali, C. Romanek, S. Clemett, X. Chillier, C. Maechiling, and R. Zare, «Search for Past Life on Mars: Possible Relic Biogenic Activity in Martian Meteorite ALH84001,» *Science*, vol. 273, n° 5277, pp. 924-930, 1996, doi: 10.1126/science.273.5277.924.
- [19] C. Rodriguez-Navarro, M. Rodriguez-Gallego, K. Ben Chekroun, and M. T. Gonzalez-Muñoz, «Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, n° 4, pp. 2182-2193, 2003, doi: 10.1128/aem.69.4.2182-2193.2003.
- [20] P. Tiano, L. Biagiotti, and G. Mastromei, «Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation,» *Journal of Microbiological Methods*, vol. 36, n° 1-2, pp. 139-145, 1999, doi: 10.1016/s0167-7012(99)00019-6.
- [21] K. L. Bachmeier, A. E. Williams, J. R. Warmington, and S. S. Bang, «Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation,» *Journal of Biotechnology*, vol. 93, n° 2, pp. 171-181, 2002, doi: 10.1016/s0168-1656(01)00393-5.
- [22] M. del R. Rodicio, y M. del C. Mendoza, «Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica,» *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 22, n° 4, pp. 238-245, 2004.



- [23] E. Boquet, A. Boronat, and A. Ramos-Cormenzana, «Production of Calcite (Calcium Carbonate) Crystals by Soil Bacteria is a General Phenomenon.» *Nature*, vol. 246, n.º 5434, Art. n.º 5434, 1973, doi: 10.1038/246527a0.
- [24] M. Marvasi, K. Gallagher, L. Martinez, W. Molina, R. Rodríguez, and G. Vega, «Importance of B4 Medium in Determining Organomineralization Potential of Bacterial Environmental Isolates,» *Geomicrobiology*, vol. 29, n.º 10, pp. 916-924, 2012, doi: 10.1080/01490451.2011.636145.
- [25] N. Ben Omar, J. M. Arias, and M. T. González-Muñoz, «Extracellular bacterial mineralization within the context of geomicrobiology,» *Microbiology Madrid Spain*, vol. 13, n.º 2, pp. 161-172, 1997.
- [26] C. Barabesi, A. Galizzi, G. Mastromei, M. Rossi, E. Tamburini, and B. Perito, «*Bacillus subtilis* Gene Cluster Involved in Calcium Carbonate Biomineralization.» *Journal of Bacteriology*, vol. 189, n.º 1, pp. 228-235, 2007, doi: 10.1128/JB.01450-06.
- [27] D. A. Rasko, J. Ravel, O. Ostad, E. Helgason, R. Cer, L. Jiang, K. Shores, D. Fouts, N. Tourasse, S. Angiouli, J. Kolonay, W. Nelson, A. Kolsto, C. Fraser, and T. Read, «The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1,» *Nucleic Acids Research*, vol. 32, n.º 3, pp. 977-988, 2004, doi: 10.1093/nar/gkh258.
- [28] E. Castañeda, and L. C. Sánchez, «Evaluation of growth of four species of the genus *Bacillus* sp., the first step to understand their biocontrol effect on *Fusarium* sp.,» *Nova*, vol. 14, n.º 26, pp. 53-62, dic. 2016.
- [29] S. Castanier, G. Le Métayer-Levrel, G. Oriol, J.-F. Loubière, and J.-P. Perthuisot, «Bacterial Carbonatogenesis and Applications to Preservation and Restoration of Historic Property,» In *Of Microbes and Art: The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*, O. Ciferri, P. Tiano, y G. Mastromei, Eds. Boston, MA, Springer US, pp. 203-218, 2000.



- [30] M. R. Ferrer, J. Quevedo-Sarmiento, M. A. Rivadeneyra, V. Bejar, R. Delgado, and A. Ramos-Cormenzana, «Calcium carbonate precipitation by two groups of moderately halophilic microorganisms at different temperatures and salt concentrations,» *Curr. Microbiology.*, vol. 17, n° 4, pp. 221-227, 1988, doi: 10.1007/BF01589456.
- [31] B. D. Eyre, A. J. Andersson, and T. Cyronak, «Benthic coral reef calcium carbonate dissolution in an acidifying ocean,» *Nature Climate Change*, vol. 4, n.º 11, Art. n.º 11, 2014, doi: 10.1038/nclimate2380.
- [32] B. B. Williams, J. L. Gidley, J. A. Guin, and R. S. Schechter, «Characterization of Liquid-Solid Reactions. Hydrochloric Acid-Calcium Carbonate Reaction,» *Chemistry Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*, vol. 9, n° 4, pp. 589-596, 1970, doi: 10.1021/i160036a011.





Recurrencia de toxinas cianobacterianas en cuerpos de agua eutrofizados

Loaiza-González Jinna Marcela.

Grupo de Diagnóstico y Control de la Contaminación – GDCON, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70, No. 52-21, Medellín, Colombia;

Rubio-Clemente Ainhoa.

Grupo de Diagnóstico y Control de la Contaminación – GDCON, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70, No. 52-21, Medellín, Colombia.

Grupo de Investigación en Tecnologías de Información y Medio Ambiente - GITIMA, Facultad de Ingeniería, Tecnológico de Antioquia – Institución Universitaria TdeA, Calle 78b, No. 72A-220, Medellín, Colombia.

León Cristina.

Grupo de Diagnóstico y Control de la Contaminación – GDCON, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70, No. 52-21, Medellín, Colombia.

Rodríguez Diana Catalina.

Grupo de Diagnóstico y Control de la Contaminación – GDCON, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70, No. 52-21, Medellín, Colombia.

Peñuela Gustavo Antonio.

Grupo de Diagnóstico y Control de la Contaminación – GDCON, Universidad de Antioquia UdeA, Calle 70, No. 52-21, Medellín, Colombia.

***Autor de correspondencia.**

Correo electrónico:

ainhoarubioclem@gmail.com

Resumen— Las cianobacterias, también denominadas algas verde-azuladas, se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo. Entre éstas, destacan las floraciones de algas nocivas (HAB, por sus siglas en inglés). Estos microorganismos han sido muy estudiados, ya que pueden producir metabolitos bioactivos y tóxicos, comúnmente conocidos como cianotoxinas o toxinas cianobacterianas, lo cual supone un riesgo tanto para la salud humana como animal, e incluso puede llegar a producir la muerte de los seres vivos. Las HAB se han convertido en un desafío continuo debido a su recurrencia y dificultad de control y manejo. En este trabajo se llevó a cabo la detección y cuantificación de diferentes tipos de cianotoxinas en un sistema léntico tropical (embalse Abreo-Malpasso, Antioquia, Colombia), en el cual se evidenció la existencia de cianotoxinas hepatóxicas, tales como microcistinas (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-ADRR), nodularina (NOD) y cilindrospermopsina (CYN), en concentraciones superiores al valor guía de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la Organización Mundial de la Salud como el máximo admisible. En este sentido, se hace necesaria la adopción de medidas preventivas y correctivas encaminadas a minimizar el riesgo al que nos enfrentamos asociado a la presencia de estas toxinas en las aguas.

Palabras clave— Cianobacterias, cianotoxinas, HAB, impacto antrópico, cambio climático, eutrofización, embalses, calidad del agua, riesgo a la salud.



Abstract— Cyanobacteria, also called blue-green algae, are widely distributed throughout the world. Among them, harmful algal blooms (HAB) are highlighted. These microorganisms have been extensively studied, as they can produce bioactive and toxic metabolites, commonly known as cyanotoxins or cyanobacterial toxins, resulting in a risk to both human and animal health, even leading to the death of living organisms. HAB have become a continuous challenge due to their recurrence and difficult control and management. This study was aiming at the detection and quantification of different types of cyanotoxins in a tropical lentic system (Abreo-Malpaso water reservoir), in which the existence of hepatotoxic cyanotoxins, such as microcystins (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-ADRR), nodularin (NOD) and cylindrospermopsin (CYN), was evidenced in concentrations higher than the guide value of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ established by the World Health Organization as the maximum allowable level. In this regard, the adoption of preventive and corrective actions is required so that the risks that we face associated with the presence of these toxins in water is minimized.

Keywords— Cyanobacteria, cyanotoxins, HAB, anthropogenic impact, climate change, eutrophication, reservoirs, water quality, health risk.



1. INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias, también denominadas algas verde-azuladas, son bacterias fotoautótrofas pertenecientes al dominio procariota con gran diversidad desde el punto de vista fisiológico y morfológico, que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo [1], [2]. Su sorprendente éxito en el proceso de adaptación a hábitats tan diversos y variados, como son los ambientes acuáticos y terrestres, además de su increíble capacidad para sobrevivir bajo condiciones extremas, se puede atribuir a su historia evolutiva, ya que las cianobacterias se constituyen como uno de los organismos más antiguos del planeta [3]. En la actualidad, las cianobacterias continúan siendo los principales organismos productores de oxígeno en la Tierra, lo que las convierte en componentes ecosistémicos extremadamente importantes; al mismo tiempo, muchas de ellas también son fijadoras eficientes de nitrógeno atmosférico, e incluso pueden llegar a formar una amplia gama de relaciones simbióticas [4].

En ambientes lénticos, como los embalses, lagos y lagunas, es muy común la presencia de cianobacterias; en especial, en zonas del trópico, en donde su crecimiento es promovido por las altas temperaturas y la abundancia de nutrientes [5], [6], [7]. Este aumento en las fuentes de fósforo (P) y nitrógeno (N), principalmente, induce a la eutrofización de los sistemas hídricos, trayendo como consecuencia el aumento desmedido de la cantidad de fitoplancton y la disminución conjunta de su diversidad, fenómeno conocido como *floramiento* [8], [9]. Cabe destacar que los efluentes domésticos e industriales, así como las malas prácticas agrícolas mediante el uso excesivo de pesticidas y fertilizantes, y en general, el manejo inadecuado de las cuencas hidrográficas, son algunos de los factores de mayor incidencia en la eutrofización de los cuerpos de agua.

Las floraciones algales son densas proliferaciones de cianobacterias en un sistema acuático, las cuales forman colonias lo suficientemente grandes como para verse a simple vista y cambiar la coloración del agua por medio del biofilm superficial; su distribución en los reservorios está sujeta a los flujos de agua, turbulencia o vientos, resultando en



concentraciones algales muy variables que dificulta su control [10]. Los géneros de cianobacterias más comunes en la formación de floraciones son *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* y *Lyngbya*; y, en menor proporción, *Gomphosphaeria*, *Coelosphaerium*, *Gloeotrichia* y *Nostoc* [11]. Aquellas que tienen potencial de causar efectos nocivos se denominan floraciones de algas nocivas (HAB, por sus siglas en inglés), cuyos tiempos de vida van desde unos pocos días hasta meses [12], [13].

Estos microorganismos han sido ampliamente estudiados, ya que pueden producir metabolitos bioactivos y tóxicos, comúnmente conocidos como cianotoxinas o toxinas cianobacterianas, lo cual supone un riesgo para la salud, e incluso puede llegar a producir la muerte de los seres vivos; especialmente, si estos habitan el mismo ambiente o si dichas aguas son utilizadas para riego, recreación o abastecimiento de la población sin llevar a cabo un tratamiento previo de remoción eficiente [14], [15], [16].

Químicamente, las cianotoxinas son moléculas tales como péptidos, aminoácidos, alcaloides y lipopolisacáridos, que actúan como endotoxinas responsables de su capacidad patógena [17]. El impacto de las cianotoxinas en los ecosistemas, además de su alta toxicidad, incluye la alelopatía y la bioacumulación y transferencia a través de la red trófica acuática [13], [18]. Estos metabolitos secundarios extracelulares, con efectos alelopáticos negativos, son una parte importante de la defensa de las algas contra la herbivoría, generando serias repercusiones en el equilibrio ecológico [17]. Los mecanismos fisiológicos de intoxicación son variados, principalmente causan reacciones hepatotóxicas, neurotóxicas, dermatotóxicas y citotóxicas, mediante la exposición a través de la ingesta directa o el contacto cutáneo [19]. Es importante mencionar que en humanos se han registrado pocos episodios de intoxicaciones letales o graves después de una exposición aguda o a corto plazo; sin embargo, la exposición prolongada, o crónica a niveles bajos, sigue siendo un problema crítico que puede generar efectos adversos en la salud [20]. Entre los diferentes tipos de cianotoxinas existentes, la microcistina-LR (MC-LR) representa la variante más tóxica y ampliamente distribuida [21], siendo considerada como un



promotor tumoral con potencial carcinógeno para animales y humanos. De hecho, esta cianotoxina ha sido clasificada como una sustancia con potencial carcinógeno de clase 2B para el ser humano [19].

Las microcistinas (MC) son capaces de inducir afectaciones en otros órganos además del hígado, incluidos los riñones, el intestino, el cerebro, los pulmones, el corazón y los sistemas reproductivo e inmunitario [22]. Si bien, los efectos adversos asociados a la presencia de MC-LR son potencialmente más peligrosos en comparación con otras MC [23]. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado un valor guía provisional de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ total de MC-LR en agua para consumo humano. No obstante, es preocupante que las concentraciones en los cuerpos de agua con cepas potencialmente tóxicas presenten con frecuencia valores superiores al valor guía referido [24]. Dicha problemática ha aumentado en extensión y frecuencia en todo el mundo [25]; en gran medida, debido al impacto del calentamiento global y a la falta de acciones preventivas encaminadas a la reducción de descargas a fuentes hídricas que favorecen condiciones óptimas para el crecimiento de estos microorganismos [26]. La síntesis de las toxinas es un proceso complejo influenciado por las condiciones ambientales, el cual varía de acuerdo a las cepas, por lo que el nivel de toxicidad de una mezcla de estas toxinas depende de la variante existente en la muestra [27]. Las cianotoxinas presentan una gran estabilidad a la degradación física y química. De todas las cianotoxinas, los péptidos cíclicos, como las microcistinas y nodularinas, además de ser las toxinas cianobacterianas que se encuentran con mayor frecuencia en floraciones algales, son las más estables y resistentes [28], y las que representan un mayor riesgo para la salud humana. En efecto, es relevante señalar que los procesos convencionales de potabilización muestran ser ineficientes para su eliminación y/o degradación [29], [30].

En este contexto, las HAB se han convertido en un desafío continuo para el ecosistema y la salud humana, debido a su recurrencia y dificultad en cuanto a su control y manejo; en esencia, a causa del efecto sinérgico del cambio climático, la descarga de nutrientes provenientes de la agricultura y la implementación de malas prácticas agrícolas, sumado a la presencia de



efluentes de aguas residuales no tratados correctamente o sin tratamiento alguno. El objetivo del presente estudio consiste en la detección y cuantificación de diferentes tipos de cianotoxinas en un sistema léntico tropical con el fin de evidenciar las relaciones existentes entre la presencia de estas toxinas y la calidad del agua, así como el posible riesgo asociado al que nos enfrentamos y la necesidad de implementar acciones preventivas y correctivas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta investigación, se llevó a cabo la detección y cuantificación de 8 tipos de cianotoxinas que se encuentran con mayor frecuencia en reservorios acuáticos, donde las condiciones ambientales propician su producción y permanencia. El sistema léntico seleccionado fue el embalse Abreo-Malpaso, ubicado en el municipio de Rionegro del Oriente Antioqueño, Colombia.

Las muestras de agua recolectadas fueron debidamente preservadas y almacenadas, con el fin de identificar la presencia de toxinas cianobacterianas y su concentración. Los resultados obtenidos fueron comparados con las concentraciones de cianotoxinas encontradas en el lago o complejo humedal del sector El Porvenir, también ubicado en el municipio de Rionegro, dada su cercanía con el embalse objeto de estudio.

A. Materiales

Se emplearon estándares analíticos de MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-ADRR, MC-LF, MC-LW, NOD y CYN grado bioreagent, de Cyano Biotech GmbH (Berlín, Germany); para el análisis cromatográfico. Se prepararon 10 mL de cada solución de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ en metanol grado LC/MS. Los solventes metanol y acetonitrilo empleados para la preparación de estándares fueron grado LC/MS, marca J.T. Baker.



B. Descripción de la zona de estudio

La cuenca Abreo-Malpaso está ubicada en la subregión Valle de San Nicolás, a una altura sobre el nivel del mar de 2.200 m; conformada por dos subcuencas, la quebrada Abreo y la quebrada Malpaso, que drenan la franja oriental y occidental, respectivamente, las cuales confluyen a 1 km aguas arriba de la desembocadura del sistema conjunto al río Negro. La región cuenta con dos períodos lluviosos (abril-mayo y octubre-noviembre) y dos períodos secos (diciembre-marzo y junio-septiembre), con una temperatura media de 17 °C y una precipitación media anual entre 1.400 y 2.600 mm. Toda el área de la cuenca se encuentra en la zona de vida de bosque húmedo montano bajo, con un área de drenaje aproximada de 8,5 km². El embalse retiene las aguas provenientes de las quebradas Abreo y Malpaso, represadas en su confluencia, tiene un volumen útil de 100.000 m³ y regula un caudal medio de 70 L s⁻¹. Esta cuenca es de gran importancia para garantizar el suministro de agua del municipio de Rionegro, ya que constituye una fuente complementaria del acueducto municipal para atender condiciones críticas o contingencias en el abastecimiento del área urbana y rural, siendo el de mayor cobertura de todo el Oriente Antioqueño. Adicionalmente, cerca de la captación del río Negro se cuenta con un lago o complejo humedal en el sector El Porvenir [31].

C. Método de muestreo y análisis fisicoquímico del agua

El muestreo se realizó por medio de un recorrido en lancha a través de tres estaciones estratégicamente seleccionadas al interior del embalse Abreo-Malpaso; correspondientes a la entrada de los afluentes de la quebrada Abreo y de la quebrada Malpaso, y al punto de captación de agua para consumo humano. En cada estación se recolectaron de forma puntual dos tipos de muestras; una muestra superficial de la zona fótica, empleando directamente un recipiente plástico; y una muestra integrada hasta el límite de la zona fótica, haciendo uso de una botella kemmerer. Para medir la transparencia del agua, se empleó un disco Secchi. En el lago o complejo humedal sector El Porvenir, se realizó un muestreo puntual superficial cercano a la orilla.



Adicionalmente, se recolectó una muestra de agua superficial en la zona de captación del embalse Abreo-Malpaso para el análisis en el laboratorio de parámetros fisicoquímicos de calidad del agua, al considerarse un punto crítico debido al riesgo inherente de ingesta directa. Con fines comparativos, también se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de la muestra de agua tomada del lago o complejo humedal. Para realizar la medición de las variables *in situ*, se empleó un equipo multiparamétrico con electrodos acoplados, así como un turbidímetro. Todas las mediciones se hicieron por triplicado. Las muestras fueron transportadas en neveras refrigeradas con geles a 4 °C.

Los análisis de los parámetros fisicoquímicos fueron realizados en el laboratorio GDCON, según los procedimientos establecidos internamente, basados en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [32], y siguiendo los protocolos del sistema de calidad del grupo de investigación, cuyo laboratorio se encuentra acreditado por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM) y el Organismo Nacional de Acreditación de Colombia (ONAC).

D. Procedimiento analítico UHPLC-MS/MS

Se realizó el seguimiento de la concentración de cianotoxinas mediante la técnica analítica cromatografía líquida de ultra-alto desempeño acoplada a espectrometría de masas tándem con triple cuadrupolo, UHPLC-MS/MS (Waters Acquity H-Class), (Xevo TQD). La muestra fue previamente preparada por medio de la extracción y concentración de cada cianotoxina a través de la técnica de extracción en fase sólida (SPE) [33].

E. Procedimiento de extracción SPE

Cada muestra fue tratada por medio de filtros mixtos de éster de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm. A continuación, estas fueron sometidas a SPE para su limpieza y concentración de las cianotoxinas, empleando un cartucho de extracción HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) de 200 mg/6 mL. El cartucho fue acondicionado con 10 mL de metanol grado HPLC,



seguido de 10 mL de solución de agua desionizada. A continuación, 100 mL de muestra de agua previamente filtrada fueron introducidos a través del cartucho acondicionado bajo vacío a una velocidad de flujo de 3 mL min⁻¹. Después, se enjuagó con 5 mL de agua desionizada, dejando secar el cartucho durante 30 min. Posteriormente, los analitos fueron eluidos con 10 mL de solución de metanol grado LC/MS 10% agua. Finalmente, la muestra se llevó a sequedad, utilizando un flujo suave de nitrógeno durante aproximadamente 3 h. Se reconstituyó con 1 mL de metanol grado LC/MS 10% agua. Por último, la solución fue filtrada a través de filtros de membrana de Nylon de 0,22 µm, y fue llevada a un vial certificado para LC-MS/MS. De esta forma, se obtuvo un factor de concentración de 100. Adicional al análisis de las muestras, se realizó una réplica, una muestra enriquecida, un control de 20 µg L⁻¹ y un blanco, como control analítico, siguiendo los requerimientos del Sistema de Gestión de Calidad del grupo GDICON [33].

F. Condiciones cromatográficas

En el equipo de cromatografía líquida acoplado a masas en tándem, se inyectaron 20 µL de muestra previamente preparada siguiendo el procedimiento detallado en la sección anterior. Para la separación se utilizó una columna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18, 1,7 µm de tamaño de partícula, 2,1 mm X 50 mm. Las condiciones de UPLC fueron: temperatura de la columna de 30 °C, flujo de 0,25 mL min⁻¹ y tiempo de corrido de 10,5 min. Se empleó en la fase móvil acuosa agua desionizada con 20 mM de formiato de amonio y en la fase móvil orgánica, metanol grado LC-MS/MS con 20 mM de formiato de amonio. Por otro lado, las condiciones para el espectrómetro de masas fueron: temperatura de la fuente de 150 °C, temperatura de desolvatación de 350 °C, flujo de gas de desolvatación de 650 L h⁻¹, flujo de gas del cono de 50 L h⁻¹, ionización ESI (+) y voltaje de capilaridad de 3,7 kV [33].



G. Cuantificación de cianotoxinas

Se realizó la curva de calibración, cuyo rango de trabajo fue de 5 a 80 $\mu\text{g L}^{-1}$. El límite de cuantificación (LC) se determinó como el menor valor al que se le calculó la precisión y exactitud, en este caso 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. El menor valor cuantificado en las muestras con un factor de concentración de 100, es 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los valores detectados en las muestras por debajo de este valor, fueron reportados como menor al LC ($< \text{LC}$). Las muestras fueron cuantificadas con las regresiones lineales obtenidas de cada curva de calibración [33].

3. RESULTADOS

A. Caracterización fisicoquímica del agua

En los análisis listados en las tablas 1 y 2, se detallan las características fisicoquímicas de las muestras de agua superficiales recolectadas en el punto de captación del embalse Abreo-Malpaso y a orillas del lago o complejo humedal sector El Porvenir; con el fin de observar el estado en el que se encuentra el punto de captación de agua del embalse Abreo-Malpaso para su posterior comparación con el lago o complejo humedal; y establecer, de este modo, una relación entre la calidad del agua y la presencia de cianotoxinas.

B. Detección y cuantificación de cianotoxinas

Durante el recorrido por el embalse Abreo-Malpaso no se observó coloración del agua que indicase la presencia de afloramiento de cianobacterias, lo cual quizás fue debido a las recurrentes lluvias en días anteriores al muestreo; no obstante, tras los análisis cromatográficos se lograron detectar concentraciones significativas de cianotoxinas peligrosas para la salud. Mientras tanto, en el lago o complejo humedal sector El Porvenir, se observó una coloración verde del agua.



TABLA 1 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE LA ZONA FÓTICA EN EL PUNTO DE CAPTACIÓN DEL EMBALSE ABREO-MALPASO

Parámetros	Valor
Temperatura (°C)	20,90
pH	6,35
Potencial Redox (mV)	263,00
Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	3,20
Conductividad (μs cm ⁻¹)	31,60
Turbiedad (UNT)	3,29
Fósforo soluble (mg P L ⁻¹)	0,06
Fósforo total (mg P L ⁻¹)	0,12
Alcalinidad total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	14,25
Dureza total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	14,16
Dureza cálcica (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	5,84
Hierro disuelto (mg Fe L ⁻¹)	1,38
Nitrógeno amoniacal (mg NH ₃ -N L ⁻¹)	0,25
Nitrógeno total Kjeldahl (mg N L ⁻¹)	1,02
Nitratos (mg NO ₃ L ⁻¹)	0,43
Carbono orgánico disuelto (mg C L ⁻¹)	1,48
Carbono orgánico total (mg C L ⁻¹)	2,01

TABLA 2 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE LA ZONA FÓTICA EN EL LAGO O COMPLEJO HUMEDAL SECTOR EL PORVENIR

Parámetros	Valor
Temperatura (°C)	25,70
pH	7,06
Potencial Redox (mV)	*
Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	7,43
Conductividad (μs cm ⁻¹)	118,10
Turbiedad (UNT)	686,60



Parámetros	Valor
Fósforo soluble (mg P L ⁻¹)	< 0,10
Fósforo total (mg P L ⁻¹)	5,40
Alcalinidad total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	42,90
Dureza total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	99,71
Dureza cálcica (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	*
Hierro disuelto (mg Fe L ⁻¹)	*
Nitrógeno amoniacal (mg NH ₃ -N L ⁻¹)	40,46
Nitrógeno total Kjeldahl (mg N L ⁻¹)	117,55
Nitratos (mg NO ₃ L ⁻¹)	1,32
Carbono orgánico disuelto (mg C L ⁻¹)	73,58
Carbono orgánico total (mg C L ⁻¹)	*

* No analizado

En total, se analizaron 8 cianotoxinas; 6 variantes de microcistinas (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-LW y MC-ADRR), nodularina (NOD) y cilindrospermopsina (CYN); todas ellas catalogadas como hepatotoxinas. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.

TABLA 3 RESULTADOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CIANOTOXINAS MEDIANTE LA TÉCNICA ANALÍTICA UPLC-MS/MS

Punto de muestreo	MC-LR	Cianotoxinas (µg L ⁻¹)							
		MC-RR	MC-YR	NOD	CYN	MC-ADRR	MC-LF	MC-LW	
Entrada quebrada Malpaso	ZF	2,0	0,5	1,8	6,6	0,4	0,1	0,2	< LC
	LZF	4,6	0,8	5,5	11,2	0,4	0,2	0,4	< LC
Entrada quebrada Abreo	ZF	1,1	0,5	1,0	4,0	0,5	0,1	0,2	< LC
	LZF	5,2	1,2	5,2	10,1	0,8	0,3	0,2	< LC



Punto de muestreo MC-LR	Cianotoxinas ($\mu\text{g L}^{-1}$)								
	MC-RR	MC-YR	NOD	CYN	MC-ADRR	MC-LF	MC-LW		
Punto de captación	ZF	6,7	0,8	7,4	12,8	0,1	0,2	0,3	< LC
	LZF	4,4	1,0	5,4	9,6	0,1	0,3	0,2	< LC

ZF: Zona fótica; LZF: Límite de la zona fótica; MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-ADRR, MC-LF, MC-LW: Variantes de microcistina; NOD: Nodularina; CYN: Cilindrospermopsina

Como se observa en la tabla, se detectó la presencia de 7 toxinas cianobacterianas. La variante MC-LW fue la única cianotoxina no detectada, ya que la concentración reportada fue < LC, teniendo en cuenta el valor del LC de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ para el método analítico empleado. En general, las concentraciones de MC-LR, MC-YR y NOD fueron notablemente mayores que las demás MC y CYN. Específicamente, y en orden de magnitud, las concentraciones encontradas de dichas toxinas en el punto de captación fueron de $12,8 \mu\text{g L}^{-1}$ para NOD, de $7,4 \mu\text{g L}^{-1}$ para MC-YR y de $6,7 \mu\text{g L}^{-1}$ para MC-LR, superando el valor guía provisional recomendado por la OMS de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para MC-LR en agua para consumo humano.

Por su parte, en el lago o complejo humedal, ubicado cerca del embalse, se encontraron concentraciones de cianotoxinas inferiores a $2,8 \mu\text{g L}^{-1}$.

4. DISCUSIÓN

En Colombia, la mayoría de los embalses cumplen con una función de generación energética. Sin embargo, pueden ser diseñados y construidos para cumplir otros propósitos, tales como el abastecimiento de agua para el acueducto y riego, uso industrial y como recurso recreativo o paisajístico [34], proporcionando servicios de gran importancia y beneficio en épocas de sequía.

De forma natural, los embalses tienden a acumular sedimentos, y a que sus aguas contengan cada vez concentraciones más elevadas de nutrientes.



Según la concentración de nutrientes en el agua, estos sistemas lénticos pueden ser oligotróficos, con escasez de nutrientes, los cuales acaban siendo eutróficos o ricos en nutrientes con el paso del tiempo. Si bien, perturbaciones humanas, incluyendo vertimientos urbanos e industriales y actividades agrícolas, ganaderas y forestales, aceleran estos procesos y, generalmente, añaden elementos contaminantes, ocasionando un incremento en la proliferación algal y, consecuentemente, en la producción de cianotoxinas bajo condiciones favorables [35].

A. Eutrofización y calidad del agua

La calidad ecológica de un embalse se mide a partir de la combinación de parámetros físicos, químicos y biológicos, integrando sus tres subsistemas interactuantes, las aguas aportadas por los ríos afluentes, las aguas embalsadas y los sedimentos del embalse [36]. En el caso en que se utilice para el abastecimiento de la población, las aguas deben ser oligotróficas y no contener sustancias nocivas para la salud humana, como metales pesados, pesticidas, toxinas u otros elementos contaminantes [37].

Según lo plantea Navarro y colaboradores [36], los períodos de sequía, y el consiguiente descenso de las reservas hídricas, solían ser las únicas situaciones de alerta para las centrales de abastecimiento: cuánta agua hay y cuánta se necesita [36]. Sin embargo, han sido precisamente dichas sequías las que han hecho aflorar la preocupación por la calidad de las aguas represadas y su debida gestión [38], [39]; más aún cuando desde los años sesenta, el uso extendido de detergentes con fosfatos y el aumento de la producción agrícola han venido provocando, cada vez con mayor frecuencia, episodios de eutrofización. Cabe destacar que la abundancia de P desequilibra los balances de nutrientes, lo que provoca la proliferación excesiva de fitoplancton y otros problemas asociados como anoxia, mortandad de peces, aparición de algas tóxicas y malos olores, entre otros [40].

Desafortunadamente, la cuenca abastecedora del embalse objeto de estudio está sometida a fuertes presiones antrópicas, que se evidencian



a raíz del avanzado incremento en la deforestación del territorio, la presencia de múltiples procesos erosivos y el uso inadecuado del suelo, lo que ha generado la reducción de los rendimientos hídricos de la reserva, así como de la vida útil del embalse por el incremento de sedimentos, y la contaminación de nacimientos y afluentes, debido al aumento de asentamientos humanos y al pastoreo. Las consecuencias de la eutrofización, generalmente, se asocian con un deterioro de la calidad del agua, el cual se ve reflejado en el fuerte desarrollo de macrófitas acuáticas (Figura 1) o en la producción de grandes floraciones de fitoplancton (Figura 2). Ambos fenómenos considerados como claras señales de esta crítica problemática [41].



Fig. 1. Proliferación de macrófitas debido a la eutrofización del embalse Abreo-Malpaso, Rionegro (Antioquia).

Factores ambientales, como la eutrofización, aumentan la formación de floraciones, incluyendo condiciones de baja turbulencia, estancamiento de agua, valores de pH altos y temperaturas elevadas [10], [42]. A pesar de ello, la aparición de un afloramiento de cianobacterias no indica necesariamente que haya producción de toxinas [43]. Pueden existir múltiples genotipos de cianobacterias, y algunas producir toxinas mientras



que otras no, o incluso su producción puede estar limitada por la influencia de ciertas condiciones ambientales [44]. Aún dentro de un afloramiento de una única especie, puede haber una mezcla de cepas tóxicas y no tóxicas, e incluso algunas cepas pueden ser mucho más tóxicas que otras [14], [45]. El crecimiento de las diferentes especies de cianobacterias y la producción de cianotoxinas están influenciados por muchos factores ambientales, como la temperatura, la intensidad de la luz, el pH, los nutrientes, la salinidad, la radiación ultravioleta (UV), el viento e incluso la presencia de metales traza y otros contaminantes ambientales [46]. Por otro lado, su distribución y riesgo de exposición se encuentran condicionados por los factores de mezcla en el cuerpo de agua [47]. Sin embargo, dichas condiciones que desencadenan o inhiben la producción de cianotoxinas siguen siendo un área activa de investigación [19], [48].



Fig. 2. Afloramiento de cianobacterias en el lago o complejo humedal sector El Porvenir, Rionegro (Antioquia).

La complejidad descrita anteriormente logra ser evidenciada en campo, donde a pesar de que no se observa una coloración visible del agua del embalse, se encontraron concentraciones significativas de cianotoxinas en todos los puntos de muestreo, incluido el sitio de captación; aunque para este punto en específico no se reportaron condiciones de eutrofización,



conforme a la información registrada en la Tabla 1. Lo contrario ocurrió en el caso del lago o complejo humedal, localizado cerca al embalse, en el cual se apreció una fuerte coloración verde y abundante biomasa (como se detalla en la Tabla 2, se evidenciaron valores relativamente altos tanto de nutrientes como de carbono orgánico); no obstante, aun así, luego de analizar los resultados de cianotoxinas de la toma de una muestra superficial, se hallaron concentraciones insignificantes (no superiores a los $2,8 \mu\text{g L}^{-1}$) en contraste con las muestras de agua recolectadas en el embalse, cuya apariencia y caracterización fisicoquímica insinuaba ser de mejor calidad.

Estos resultados son de vital importancia en cuanto a la comprensión de la ocurrencia de fenómenos de afloramientos algales, donde se evidencia que las características de calidad del agua influyen significativamente, más no determinan la ocurrencia o no de la proliferación de cianobacterias y la producción de toxinas, ya que dicha ocurrencia está asociada a la combinación de múltiples factores [49], incluyendo la época en la que se lleva a cabo la campaña de muestreo. Por otro lado, es de resaltar que incluso las concentraciones de toxinas liberadas al medio pueden ser mayores en las floraciones envejecidas o en declive [14], como se observó tras comparar los resultados de las concentraciones de cianotoxinas halladas en el embalse y en el lago. Puede darse, además, la acumulación y persistencia del material tóxico en los sedimentos por meses [50], estando retenidas dentro de células bacterianas que permanecen intactas. Estas células sedimentadas fácilmente pueden sufrir lisis por acción de otros microorganismos presentes en el sedimento, liberando rápidamente las toxinas [10].

Adicionalmente, es de destacar la considerable diferencia entre los valores de oxígeno disuelto en ambos espacios. Para el embalse Abreo-Malpaso, se obtuvo una baja concentración, alrededor de 3 mg L^{-1} ; mientras que para el lago o complejo humedal, se reportó una concentración bastante alta, alrededor de 7 mg L^{-1} , lo cual posiblemente pueda deberse a la actividad fotosintética de la floración algal presente en el lago, manteniendo altos niveles de oxígeno en la superficie de la



columna de agua. Por otro lado, la transparencia del agua fue casi nula y la turbiedad, mayor que 660 UNT. Cabe destacar que, según Chorus y Bartram [14], las cianobacterias tienen una ventaja competitiva en aguas con alta turbidez, manteniendo una tasa de crecimiento relativamente mayor que otros organismos del fitoplancton cuando las intensidades de luz son bajas debido al reducido requerimiento de energía de estos organismos para mantener su funcionamiento celular [14], [42].

Finalmente, en cuanto a las concentraciones de N y P, se tiene que la proporción óptima para las cianobacterias se encuentra entre 10-16N:1P [14]. Para el caso del lago, la proporción entre el N y el P es de aproximadamente 22N:1P, por lo que el P podría llegar a ser un elemento limitante [51]. Cabe destacar que cuando el contenido de P es mayor que $100 \mu\text{g L}^{-1}$, se puede clasificar un lago como hipereutrófico. En el complejo humedal, el contenido de P fue de $540 \mu\text{g L}^{-1}$, por lo que puede decirse que se encontraba en un nivel de productividad hipereutrófico y, precisamente, cuando los cuerpos de agua dulce se enriquecen en nutrientes, especialmente con P, a menudo hay un cambio en la comunidad fitoplanctónica hacia la dominancia por parte de las cianobacterias [52].

B. Presencia de cianotoxinas y riesgo asociado

En todos los puntos de muestreo del embalse Abreo-Malpaso, la concentración de toxinas en el agua superó el valor guía de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de MC-LR como concentración máxima admisible en el agua. Cabe resaltar que incluso la OMS ha propuesto un valor guía de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ en casos de exposición crónica. Además, diversos estudios toxicológicos han conducido al establecimiento de una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de $0,04 \mu\text{g/Kg/día}$ de MC-LR, alertando de la bioacumulación de MC en algunos tejidos de plantas, moluscos y peces, pudiéndose alcanzar valores muy próximos a la IDT tras la magnificación de sus efectos tóxicos a través de la red trófica [24].

Los resultados descritos anteriormente permiten generar un estado de alerta en cuanto a la necesidad de llevarse a cabo un constante seguimiento



y control de la presencia de estas perjudiciales toxinas en los cuerpos de agua [53]; teniendo en cuenta que, a pesar de que aún no se ha establecido un valor límite para las demás cianotoxinas, su presencia en cuerpos de agua representa igualmente un serio riesgo para la salud y el bienestar ambiental a pesar de encontrarse a bajas concentraciones. En este sentido, se hace necesaria la implementación de medidas preventivas y correctivas para paliar los efectos negativos asociados a la presencia de estas toxinas en las aguas.

C. Medidas preventivas y correctivas

A nivel internacional, se han desarrollado una serie de normas y regulaciones referentes a la calidad microbiológica en las que se sugieren valores guías y valores de carácter obligatorio. En Colombia, existen niveles guía de calidad de aguas que contemplan aspectos bacteriológicos; si bien, en estos niveles guía no se incluyen a las cianobacterias y a sus toxinas. La presencia de cianobacterias y el grado de toxicidad de sus floraciones no son incluidos en los estándares locales y tampoco en los índices de calidad de agua (ICA), comúnmente utilizados, siendo un aspecto primordial a ser considerado [37], [54].

Debe mencionarse que el estudio de las cianotoxinas ha estado fuertemente limitado por la falta de métodos adecuados y accesibles, para su detección y vigilancia. Sin embargo, hoy en día existen métodos efectivos de análisis químico para las toxinas conocidas, y ensayos inmunológicos y enzimáticos sumamente sensibles; brindando nuevas posibilidades para programas de sondeo orientados hacia la evaluación del riesgo asociado a la presencia de estas sustancias en los cuerpos acuáticos y la vigilancia frecuente. Varios de los ensayos disponibles para su detección en muestras ambientales son: ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas), PPIA (proteína fosfatasa ensayo de inhibición), PSI (inhibición de la síntesis de proteínas), secuencias de genes PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y análisis químico por cromatografía (HPLC, LC-MS), siendo este último uno de los más precisos, pero costosos [55], [56].



Así mismo, es necesario destacar que la combinación de planes de saneamiento en la cuenca y la correcta gestión ecológica del agua dentro de los embalses permiten una mejora sensible de la calidad y disponibilidad del agua que se suministra, y el impacto ecológico que genera. Por otra parte, la reducción de la exposición humana a cianotoxinas a través de la prevención en la ocurrencia de HAB y la implementación de restricciones se contemplan como medidas significativas encaminadas a la reducción del riesgo [57].

Evitar la ocupación o alteración de los cauces y riberas, restringir y controlar las zonas de acceso, reforestar las cuencas, evitar vertimientos, controlar la calidad del agua aportada, reducir al máximo los aportes de sedimentos, delimitar zonas de uso y regular las actividades perturbadoras, definiendo usos del suelo deseables, aceptables y no aceptables, se convierten en medidas que permiten establecer un control real sobre posibles focos de contaminación, tales como los núcleos urbanos, industrias y explotaciones agrícolas y ganaderas, llevando a cabo la evaluación de riesgos y adopción de medidas de prevención y control, especialmente por el peligro que todo ello supone para la calidad de las aguas que son destinadas preferentemente al consumo humano [36].

Particularmente, debido a la falta de eficiencia de los procesos convencionales de potabilización para la eliminación y/o degradación de toxinas cianobacterianas [58]-[61], se han explorado recientemente diferentes tratamientos alternativos como los procesos de oxidación avanzada (POA), que favorecen la formación de radicales libres hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), en mayor medida, los cuales son poderosos agentes oxidantes [62], [63], [64]. Entre estas alternativas, destaca la combinación de radiación UV con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), otorgando una solución viable y eficiente para el tratamiento de aguas contaminadas con cianotoxinas [65], dando lugar a la producción de agua potable en cumplimiento con todos los parámetros legalmente estipulados para su consumo público.



5. CONCLUSIONES

Aun cuando la eutrofización de las aguas es uno de los mayores detonantes en la presencia y recurrencia de floraciones algales en los cuerpos de agua, la producción de toxinas cianobacterianas es un proceso complejo y variable, el cual depende del efecto sinérgico de múltiples factores.

Como se observa en el presente estudio, en el embalse Abreo-Malpasso existe presencia de las cianotoxinas MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-ADRR, NOD y CYN, en concentraciones superiores al valor guía de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la OMS como el máximo admisible. Es de señalar que todas estas cianotoxinas están catalogadas como hepatotoxinas, las cuales presentan diferentes efectos adversos para la salud, adicionales al riesgo hepático.

En este sentido, se hace necesaria la aplicación de medidas preventivas y correctivas, como puede ser la implementación de buenas prácticas agrícolas y el tratamiento de aguas contaminadas con estas cianotoxinas utilizando alternativas de tratamiento eficientes, especialmente cuando se trata de la producción de aguas aptas para consumo humano, respectivamente.

REFERENCIAS

- [1] F. M. Buratti, M. Manganelli, S. Vichi, M. Stefanelli, S. Scardala, E. Testai, and E. Funari, "Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation," *Archives of Toxicology*, vol. 91, pp. 1049–1130, 2017.
- [2] G. Kaur, "Freshwater Cyanotoxins," In *Biomarkers in Toxicology*, pp. 601–613, 2019.
- [3] B. A. Whitton, and M. Potts, "*The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*," Springer Science & Business Media, 2007.



- [4] L. A. Gaysina, A. Saraf, and P. Singh, “Cyanobacteria in diverse habitats,” In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*, pp. 1–28, 2019.
- [5] J. M. O’Neil, T. W. Davis, M. A. Burford, and C.J. Gobler, “The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change,” *Harmful Algae*, vol. 14, pp. 313–334, 2012.
- [6] K. Shan, X. Wang, H. Yang, B. Zhou, L. Song, and M. Shang, “Use statistical machine learning to detect nutrient thresholds in *Microcystis* blooms and microcystin management,” *Harmful Algae*, vol. 94, pp. 101807, 2020.
- [7] J. T. Walls, K. H. Wyatt, J. C. Doll, E. M. Rubenstein, and A. R. Rober, “Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria,” *Science of the Total Environment*, vol. 610, pp. 786–795, 2018.
- [8] H. W. Paerl, and T. G. Otten, “Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls,” *Microbial Ecology*, vol. 65, pp. 995–1010, 2013.
- [9] M. L. Wells, V. L. Trainer, T. J. Smayda, B. S. O. Karlson, C. G. Trick, R. M. Kudela, A. Ishikawa, S. Bernard, A. Wulff, D. Anderson, and W. P. Cochlan, “Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future,” *Harmful Algae*, vol. 49, pp. 68–93, 2015.
- [10] L. Bláha, P. Babica, and B. Maršálek, “Toxins produced in cyanobacterial water blooms - toxicity and risks,” *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 2, nº 2, pp. 36–41, 2009.
- [11] J. Huisman, G. A. Codd, H. W. Paerl, B. W. Ibelings, J. M. Verspagen, and P. M. Visser, “Cyanobacterial blooms,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 16, nº 8, pp. 471–483, 2018.



- [12] W. W. Carmichael, “Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: The CyanoHABs,” *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, vol. 7, n° 5, pp. 1393–1407, 2001.
- [13] I. Stewart, A. A. Seawright, and G. R. Shaw, “Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview,” In H. K. Hudnell (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* Vol. 619, pp. 613–637, 2008.
- [14] I. Chorus, and J. Bartram, “*Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*,” Vol. 73; E & FN Spon, ed., London, 1999.
- [15] H. W. Paerl, T. G. Otten, and R. Kudela, “Mitigating the Expansion of Harmful Algal Blooms Across the Freshwater-to-Marine Continuum [News],” *Environmental Science and Technology*, vol. 52, n° 10, pp. 5519–5529, 2018.
- [16] D. Sedan, y D. Andrinolo, “Cianobacterias y cianotoxinas: Efectos en la salud humana. Casos informados y primeros acercamientos al estudio epidemiológico,” In *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud*, pp. 67–78, 2011. [Online]. Available: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/91471>
- [17] J. S. Yunes, “Cyanobacterial toxins2, In *Cyanobacteria: From Basic Science to Applications*,” pp. 443–458, 2018.
- [18] M. Crettaz-Minaglia, D. Sedan, y L. Giannuzzi, “Bioacumulación y biomagnificación de cianotoxinas en organismos acuáticos de agua dulce,” In *Cianobacterias como determinantes ambientales de la salud*, pp. 171–186, 2017. [Online]. Available: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/72653/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [19] J. K. Malik, V. K. Bharti, A. Rahal, D. Kumar, and R. C. Gupta, “Cyanobacterial (blue-green algae) toxins,” In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, pp. 467–478, 2020.



- [20] L. M. Grattan, S. Holobaugh, and J. G. Morris, “Harmful algal blooms and public health,” *Harmful Algae*, vol. 57, pp. 2–8, 2016.
- [21] D. M. M. Caramés, “Tecnologías de control de floraciones de cianobacterias y algas nocivas en cuerpos de agua, con énfasis en el uso de irradiación por ultrasonido,” *Innotec*, vol. 12, nº 12, pp. 54–61, 2016. [Online]. Available: <http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/article/view/367>
- [22] I. Y. Massey, F. Yang, Z. Ding, S. Yang, J. Guo, C. Tezi, H. Al-Osman, R.B. Kamegni, and W. Zeng, “Exposure routes and health effects of microcystins on animals and humans: A mini-review,” *Toxicon*, vol. 151, july, pp. 156–162, 2018.
- [23] L. Chen, J. P. Giesy, and P. Xie, “The dose makes the poison,” *Science of the Total Environment*, vol. 621, pp. 649–653, 2018.
- [24] OMS. “*Guías para la calidad del agua potable (Tercera)*,” Organización Mundial de la Salud, 2006. [Online]. Available: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_fulll_lowres.pdf
- [25] B. W. Brooks, J. M. Lazorchak, M. D. A. Howard, M. V. V. Johnson, S. L. Morton, D. A. K. Perkins, E. D. Reavie, G. I. Scott, S. A. Smith, and J. A. Steevens, “Are harmful algal blooms becoming the greatest inland water quality threat to public health and aquatic ecosystems?,” *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 35, nº 1, pp. 6–13, 2016.
- [26] H. W. Paerl, W. S. Gardner, K. E. Havens, A. R. Joyner, M. J. McCarthy, S. E. Newell, B. Qin, and J. T. Scott, “Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients,” *Harmful Algae*, vol. 54, pp. 213–222, 2016.
- [27] S. Merel, M. Clément, and O. Thomas, “State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine,” *Toxicon*, vol. 55, nº 4, pp. 677–691, 2010.



- [28] S. Merel, M. C. Villarín, K. Chung, and S. Snyder, “Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins,” *Toxicon*, vol. 76, pp. 118–131, 2013.
- [29] X. He, Y. L. Liu, A. Conklin, J. Westrick, L. K. Weavers, D. D. Dionysiou, J. J. Lenhart, P. J. Mouser, D. Szlag, and H. W. Walker, “Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment,” *Harmful Algae*, vol. 54, pp. 174–193, 2016.
- [30] S. Merel, D. Walker, R. Chicana, S. Snyder, E. Baurès, and O. Thomas, “State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins,” *Environment International*, vol. 59, pp. 303–327, 2013.
- [31] CORNARE, “Plan de ordenación y manejo de la cuenca Abreo-Malpaso, municipio de Rionegro,” *Corporación Autónoma Regional de las Cuencas de los ríos Negro y Nare*, 2006. [Online]. Available: <https://www.cornare.gov.co/POMCAS/Documentos/AbreoMalpaso.pdf>
- [32] APHA, “Standard methods for examination of water and wastewater,” *American Public Health Association*, 2012.
- [33] C. León, and G. A. Peñuela, “Detected cyanotoxins by UHPLC MS/MS technique in tropical reservoirs of northeastern Colombia,” *Toxicon*, vol. 167, march 2018, pp. 38–48, 2019.
- [34] A. D. Steinman, B. J. Cardinale, W. R. Munns Jr., M. E. Ogdahl, J. D. Allan, T. Angadi, and E. Washburn, “Ecosystem services in the Great Lakes,” *Journal of Great Lakes Research*, vol. 43, nº 3, pp. 161-168, 2017.
- [35] A. C. Rietzler, C. R. Botta, M. M. Ribeiro, O. Rocha y A. L. Fonseca, “Accelerated eutrophication and toxicity in tropical reservoir water and sediments: an ecotoxicological approach,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, nº 14, pp. 13292-13311, 2018.
- [36] E. Navarro, E. Garcia-Berthou, y J. Armengol, “La calidad ecológica de los embalses”, *Investigación y Ciencia*, pp. 80–88, 2010.



- [37] C. Acuña-Alonso, X. Álvarez, O. Lorenzo, A. Cancela, E. Valero, and A. Sánchez, "Assessment of water quality in eutrophized water bodies through the application of indexes and toxicity," *Science of The Total Environment*, vol. 728, pp. 138775, 2020.
- [38] J. Brasil, J. L. Attayde, F. R. Vasconcelos, D. D. Dantas y V. L. Huszar, "Drought-induced water-level reduction favors cyanobacteria blooms in tropical shallow lakes," *Hydrobiologia*, vol. 770, nº 1, pp. 145-164, 2016.
- [39] I. Sunesen, S. M. Méndez, J. E. Mancera-Pineda, M. Y. D. Bottein, and H. Enevoldsen, "The Latin America and Caribbean HAB status report based on OBIS and HAEDAT maps and databases," *Harmful Algae*, pp. 101920, 2021.
- [40] X. Liu, L. Chen, G. Zhang, J. Zhang, Y. Wu, and H. Ju, "Spatiotemporal Dynamics of Succession and Growth Limitation of Phytoplankton for Nutrients and Light in a Large Shallow Lake," *Water Research*, pp. 116910, 2021.
- [41] V. Vasconcelos, "Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: When ecosystems cry for help," *Limnetica*, vol. 25, nº 1-2), pp. 425-432, 2006.
- [42] T. Dalu y R.J. Wasserman, "Cyanobacteria dynamics in a small tropical reservoir: Understanding spatio-temporal variability and influence of environmental variables," *Science of the Total Environment*, vol. 643, pp. 835-841, 2018.
- [43] F. R. Jacinavicius, A.B.F. Pacheco, F. Chow, G. C. V. da Costa, D. E. Kalume, J. Rigonato, E. C. Schmidt, and C. L. Sant'Anna, "Different ecophysiological and structural strategies of toxic and non-toxic *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) strains assessed under culture conditions," *Algal Research*, vol. 41, pp. 101548, 2019.
- [44] S. Jähnichen, B. M. Long, and T. Petzoldt, "Microcystin production by *Microcystis aeruginosa*: Direct regulation by multiple environmental factors," *Harmful Algae*, vol. 12, pp. 95-104, 2011.



- [45] T. W. Davis, D. L. Berry, G. L. Boyer, and C. J. Gobler, "The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms," *Harmful Algae*, vol. 8, n° 5, pp. 715-725, 2009.
- [46] M. Wang, W. Shi, Q. Chen, J. Zhang, Q. Yi, and L. Hu, "Effects of nutrient temporal variations on toxic genotype and microcystin concentration in two eutrophic lakes," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 166, pp. 192-199, 2018.
- [47] J. Zhou, B. Qin, X. Han, and L. Zhu, "Turbulence increases the risk of microcystin exposure in a eutrophic lake (Lake Taihu) during cyanobacterial bloom periods," *Harmful Algae*, vol. 55, pp. 213-220, 2016.
- [48] B. A. Neilan, L. A. Pearson, J. Muenchhoff, M. C. Moffitt, and E. Dittmann, "Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria," *Environmental Microbiology*, vol. 15, n° 5, pp. 1239-1253, 2012.
- [49] L. Hu, K. Shan, L. Huang, Y. Li, L. Zhao, Q. Zhou, and L. Song, "Environmental factors associated with cyanobacterial assemblages in a mesotrophic subtropical plateau lake: a focus on bloom toxicity," *Science of The Total Environment*, pp. 146052, 2021.
- [50] X. Wu, B. Xiao, R. Li, C. Wang, J. Huang y Z. Wang, "Mechanisms and factors affecting sorption of microcystins onto natural sediments," *Environmental Science & Technology*, vol. 45, n° 7, pp. 2641-2647, 2011.
- [51] C. J. Gobler, J. M. Burkholder, T. W. Davis, M. J. Harke, T. Johengen, C. A. Stow, and D. B. Van de Waal, "The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms," *Harmful Algae*, vol. 54, pp. 87-97, 2016.
- [52] E. Xie, Y. Su, S. Deng, M. Kontopyrgou, and D. Zhang, "Significant influence of phosphorus resources on the growth and alkaline phosphatase activities of *Microcystis aeruginosa*," *Environmental Pollution*, vol. 268, pp. 115807, 2021.



- [53] M. A. Burford, C. C. Carey, D. P. Hamilton, J. Huisman, H. W. Paerl, S. A. Wood, and A. Wulff, “Perspective: Advancing the research agenda for improving understanding of cyanobacteria in a future of global change,” *Harmful Algae*, vol. 91, pp. 101601, 2020.
- [54] M. V. Brandalise, F. Nadal, M. I. Rodríguez, N. Larrosa, M. Ruíz, S. Halac, P. Olivera, y C. Licera, *Índice de calidad de agua para uso recreativo en ambientes con cianobacterias*, 2012. [Online]. Available: https://www.ina.gov.ar/pdf/ifrrhh/02_007_Brandalise.pdf
- [55] V. Gaget, M. Lau, B. Sendall, S. Froschio, and A.R. Humpage, “Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment?,” *Water Research*, vol. 118, pp. 227–238, 2017.
- [56] M. Picardo, D. Filatova, O. Nuñez, and M. Farré, “Recent advances in the detection of natural toxins in freshwater environments,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 112, pp. 75–86, 2019.
- [57] H. W. Paerl, and M. A. Barnard, “Mitigating the global expansion of harmful cyanobacterial blooms: Moving targets in a human-and climatically-altered world,” *Harmful Algae*, vol. 96, pp. 101845, 2020.
- [58] J. L. Acero, E. Rodríguez, M. E. Majado, A. Sordo, and J. Meriluoto, “Oxidation of microcystin-LR with chlorine and permanganate during drinking water treatment,” *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA*, vol. 57, nº 6, pp. 371–380, 2008.
- [59] T. Hall, J. Hart, B. Croll, and R. Gregory, “Laboratory-scale investigations of algal toxin removal by water treatment,” *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management*, vol. 14, nº 2, pp. 143–149, 2000.
- [60] B. C. Hitzfeld, S. J. Höger, and D.R. Dietrich, “Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment, and human risk assessment,” *Environmental Health Perspectives*, vol. 108, nº 1, pp. 113–122, 2000.



- [61] V. K. Sharma, T. M. Triantis, M. G. Antoniou, X. He, M. Pelaez, C. Han, W. Song, K. E. O'Shea, A. A. de la Cruz, T. Kaloudis, A. Hiskia, and D. D. Dionysiou, "Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: A review," *Separation and Purification Technology*, vol. 91, pp. 3–17, 2012.
- [62] X. He, M. Pelaez, J. A. Westrick, K.E. O'Shea, A. Hiskia, T. Triantis, T. Kaloudis, M. I. Stefan, A. A. de la Cruz, and D. D. Dionysiou, "Efficient removal of microcystin-LR by UV-C/H₂O₂ in synthetic and natural water samples," *Water Research*, vol. 46, n° 5, pp. 1501–1510, 2012.
- [63] L. Li, N. Y. Gao, Y. Deng, J. J. Yao, K. J. Zhang, H. J. Li, D. D. Yin, H. S. Qu, and J. W. Guo, "Experimental and model comparisons of H₂O₂ assisted UV photodegradation of Microcystin-LR in simulated drinking water," *Journal of Zhejiang University: Science A*, vol. 10, n° 11, pp. 1660–1669, 2009.
- [64] R. P. Qiao, N. Li, X. H. Qi, Q. S. Wang, and Y. Y. Zhuang, "Degradation of microcystin-RR by UV radiation in the presence of hydrogen peroxide," *Toxicon*, vol. 45, n° 6, pp. 745–752, 2005.
- [65] J. M. Loaiza-González, M. C. León-Salazar, A. Rubio-Clemente, D. C. Rodríguez, and G. A. Peñuela-Mesa, "Efficiency of the removal of microcystin-lr by uv-radiation and hydrogen peroxide," *Revista Facultad de Ingenieria*, vol. 95, pp. 9–19, 2020.





Comparativo del número de propágulos de hongos micorrízico arbusculares entre un inóculo crudo multiespórico y el suelo de un monocultivo de *Allium fistulosum*

1. INTRODUCCIÓN

Carolina García Ávila.

INTEGRA, Facultad de Ingeniería,
Tecnológico de Antioquia,
Institución Universitaria,
Medellín – Colombia,
cavilaga@tdea.edu.co

Kellys Nallith Salcedo Hurtado.

GITIMA, Facultad de Ingeniería,
Tecnológico de Antioquia,
Institución Universitaria,
Medellín – Colombia,

INTEGRA, Facultad de Ingeniería,
Tecnológico de Antioquia,
Institución Universitaria,
Medellín – Colombia,
kellys.salcedo@tdea.edu.co

Laura Arroyave Acevedo.

Facultad de Ingeniería, Tecnológico
de Antioquia, Institución
Universitaria, Medellín – Colombia,
larroy13@tdea.edu.co

Yuliana Bermúdez Moreno.

Consorcio MAG2,
Medellín – Colombia,
ybm260801@gmail.com

La colonización de los hongos *Glomeromycota* en las plantas terrestres ha posibilitado la generación de asociaciones íntimas entre estos microorganismos, el suelo y las plantas, a tal punto que puede decirse que son de los organismos esenciales en el planeta [1]. El desarrollo de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), pertenecientes al filum *Glomeromycota*, se promueve con la preinfección edáfica, que da lugar a la penetración en la raíz de la planta, lo que permite el desarrollo de la colonización y del micelio externo, la esporulación del hongo y la reinfección [2]. Plantas herbáceas y leguminosas arbustivas pueden presentar una alta dependencia de los HMA; aspecto que les ha permitido tener un rápido crecimiento una vez aquella asociación



se haya establecido con éxito y, por tanto, una amplia distribución en los suelos del trópico.

El modelo agrícola utilizado en Colombia, el cual se enfoca en la utilización de herramientas mecánicas de labranza y la alta dependencia de fertilizantes sintéticos, ha provocado debilitamiento de la estructura y contenido nutricional del suelo. Una consecuencia de estas prácticas es la baja fertilidad, rangos de pH muy ácidos, el alto contenido de aluminio intercambiable, el bajo contenido de macronutrientes como carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio y azufre [3].

Las prácticas agrícolas y el establecimiento de monocultivos se pueden considerar como los mayores responsables de las alteraciones de la estructura del suelo (composición de espacios porosos, tipo de material y concentración de elementos nutricionales) y de la disminución de la población microbiana fundamental para llevar a cabo procesos de transformación de la materia orgánica, disponibilidad de nutrientes y transporte de estos desde el suelo hasta la raíz. En los suelos, puede encontrarse de manera natural poblaciones microbianas pertenecientes a los HMA, las cuales son esenciales para llevar a cabo los procesos de estructuración del suelo, el mejoramiento de la supervivencia de las plantas en condiciones extremas y el enlace entre estas, las raíces y el suelo [4].

Algunas de las estrategias usadas para corregir estas deficiencias en el suelo, y garantizar la productividad, es incorporar fertilizantes químicos o la adición de inóculos microbianos combinados con técnicas de labranza manuales [5]. Se ha evidenciado que la inoculación con HMA es beneficiosa, porque no solo promueve la adaptación de las plantas a condiciones de estrés biótico, químico y físico del suelo (condiciones del trópico), sino que también propicia que se incremente y mejore la porosidad, la disponibilidad de nutrientes y las interacciones entre el agua, los microorganismos y la estructura sólida del suelo. La incorporación de los HMA en los suelos hace que las plantas presenten mayores posibilidades de supervivencia, buen crecimiento, reproducción y generación de frutos, lo que se asocia a una buena nutrición y balance



hormonal de la planta. Los siguientes son aspectos claves para analizar en las relaciones que se presentan en las raíces de las plantas y los HMA: el morfotipo y biodiversidad del hongo [1], [6].

La aplicación de HMA generados de manera natural o artificial, como lo es el inóculo crudo (biofertilizante), contribuye al desarrollo de los cultivos, al mejoramiento de las propiedades físicas y químicas del suelo. Además, de no ocasionar problemas de contaminación que se generan con el uso de los insumos sintéticos y que a largo plazo deterioran el suelo, haciendo poco rentable la producción en condiciones adversas.

Los hongos formadores de micorrizas tienen interacción simbiótica con la raíz de las plantas, para mejorar la relación entre factores bióticos y abióticos del ambiente, lo que aumenta la colonización micorrizal, con la finalidad de restaurar la diversidad y cantidad de estructuras infectivas en suelos con pocos componentes biológicos.

Una de las maneras que detalla la literatura para evaluar el efecto de las actividades antrópicas, como la aplicación de fertilizantes químicos y la agricultura intensiva o monocultivos sin prácticas de conservación en las poblaciones de hongos simbióticos del suelo (ejemplo, los HMA), es la valoración de los suelos analizando las raíces y la rizosfera a través de parámetros: el porcentaje de colonización de raíces, la biomasa, la longitud de hifas y la densidad de propágulos de HMA [7].

Al determinar la capacidad de los microorganismos para formar micorriza arbuscular, es posible evaluar la calidad de un inóculo o suelo, porque se tienen en cuenta todos los propágulos infectivos de los HMA, y se proporciona una estimación realista global de la condición de los HMA [6]. En este capítulo, se evaluó la biodiversidad de HMA en un suelo de monocultivo de *Allium fistulosum* y un inóculo micorrízico crudo multiespórico, con el objetivo de comparar la cantidad de propágulos de hongos formadores de micorriza. Para determinar dicha biodiversidad, se utilizó como planta indicadora *Leucaena leucocephala*, ya que presenta alta asociación con este hongo, fácil germinación, rápido crecimiento y amplia distribución en los suelos del trópico.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Área de estudio y toma de muestra

El experimento se realizó en el laboratorio de investigación ambiental del Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria, sede Robledo, la cual se encuentra ubicada en la ciudad de Medellín, en las coordenadas 6° 16' 46" N, 75° 35' 01" O, a una altitud de 1.495 msnm. La temperatura promedio anual oscila entre 18,0 a 21,5°C y presenta una humedad relativa entre 63% - 73% [8].

En el experimento se utilizó una muestra compuesta de suelo de un monocultivo de *Allium fistulosum* establecido en la vereda La Mata del municipio de Girardota (Antioquia), el cual se encuentra a una altitud de 1.800 msnm y a una temperatura promedio anual de 23 °C, para compararla con un inóculo micorrizal crudo. En el predio del monocultivo, se ubicaron 17 puntos al azar donde se extrajeron 200 g de suelo a una profundidad entre 0 – 20 cm utilizando un barreno. Lo extraído se almacenó en bolsas plásticas ziploc: se sellaron, se etiquetaron y se trasladaron al laboratorio del TdeA, en donde posteriormente se mezclaron y se homogenizaron en un recipiente para realizar su tratamiento y análisis [9].

B. Montaje de la técnica microbiológica NMP en invernadero y diseño experimental utilizado

Para el montaje de las unidades experimentales en el laboratorio de cuencas se adecuó el espacio físico, instalando cintas LED que emitían una incidencia de luz artificial, en un promedio de 376 lx, con la finalidad de proporcionar la luz necesaria para el crecimiento de la planta indicadora y acelerar su crecimiento al inducirlas a realizar fotosíntesis las 24 horas. Se instaló una cámara húmeda en la parte inferior de cada unidad experimental, la cual no tenía contacto directo con las mismas, con el fin de regular la humedad relativa. Una vez ya establecido el experimento, se monitorearon las variables ambientales: temperatura del aire (TEM-A), iluminación (I) y humedad relativa (HR), a través del higrómetro SPER-



SCIENTIFIC 850070, con el objetivo que se tuviese información del valor de las variables ambientales de interés.

Como unidades experimentales se emplearon macetas plásticas cuadradas de 15,5 cm de alto x 10,0 cm de diámetro, las cuales se lavaron y esterilizaron para de evitar la contaminación cruzada (Figura 1).

El diseño experimental utilizado consistió en dos tratamientos: T1 y T2. T1 corresponde a una combinación de suelo colectado en el cultivo de cebolla mezclado con suelo estéril, como sustrato; y T2 es la combinación de un inóculo micorrizal crudo multiespóricico más suelo estéril como sustrato. Por cada tratamiento, se realizaron cinco repeticiones (R1, R2, R3, R4, R5), y a cada repetición se le efectuaron cinco diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) que representan la concentración de la inoculación, para un total de 50 unidades experimentales.

El sustrato de crecimiento se preparó a partir de suelo estéril, el cual fue llevado a autoclave, en 2 rondas, a una temperatura de 121°C y a 15 psi durante 15 minutos. Una vez finalizada esta etapa se monitoreó el pH del suelo esterilizado, usando el equipo Thermo Scientific Orion 5 Star para verificar que estaba en 6.0 unidades, se revisó y ajustó la concentración de fósforo soluble para que fuera 0,02 mg/L utilizando el método de azul de molibdeno, con la finalidad de establecer el nivel óptimo para que exista asociación micorrizal [7].

La técnica microbiológica utilizada para determinar la presencia o ausencia de propágulos infectivos de HMA en las raíces de una planta altamente micótrifa como la *Leucaena leucocephala* (planta indicadora utilizada), sembrada en dos tratamientos (T1 – T2), fue el método del número más probable (NMP) [10], [11], [12].

Para este propósito, se procedió a realizar las diluciones a partir 270 g del sustrato de crecimiento al cual se le adicionaron 30 g del suelo del monocultivo de cebolla para preparar el T1, seguido se mezcló homogéneamente para componer la primera dilución, se le extrajo a la



muestra nuevamente 30 g de suelo para componer la dilución 10^{-2} y así sucesivamente, hasta llegar a 10^{-5} . A partir de la última dilución (10^{-5}), se tomaron 30 g y se descartó el suelo restante. Este procedimiento se repitió con el T2 [12]. En ambos casos, se validó que la máxima capacidad de retención de humedad (MCRH) del sustrato fuera del 40%, para facilitar el desarrollo de los hongos al garantizar el contenido apropiado de agua y que al realizar la mezcla entre el sustrato y suelo estéril, la MCRH fuera del 50% [13].

Como planta indicadora se utilizó la *Leucaena leucocephala*, la cual es una especie de reconocida respuesta a la condición micorrizal. El proveedor de las semillas *Leucaena leucocephala* fue Agrosemillas, el cual certifica porcentaje de germinación. Se realizó inicialmente la prueba de germinación de las semillas de acuerdo con las reglas de análisis del International Seed Testing Association [14]. Posteriormente, se sembraron tres semillas germinadas con presencia de radícula por unidad experimental para poder cuantificar los propágulos infectivos de HMA. Transcurridas seis semanas de crecimiento de las plantas, se procedió a cosechar cada unidad experimental, extrayendo toda la biomasa aérea y subterránea de la planta indicadora. Luego se separó la biomasa aérea de las raíces, se pesaron en fresco, se realizó un lavado cuidadoso de las mismas usando agua destilada y se ubicaron en cajas Petri [7].

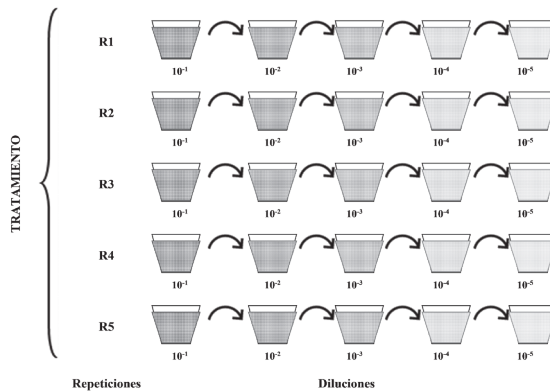


Fig. 1. Esquema del diseño experimental utilizado – número más probable (NMP).



C. Cuantificación de propágulos de hongos endomicorrízicos por la técnica del número más probable (NPM)

Inicialmente, se realizó la evaluación de la colonización micorrizal por el método de clareado y tinción de raíces, se llevó a cabo la cuantificación de la infección de HMA en las raíces de las plantas indicadoras establecidas en las 25 unidades experimentales. Primero, se llevó a cabo el lavado por triplicado de las raíces, utilizando agua destilada y posteriormente se secaron con papel absorbente. Las raíces se cortaron en segmentos de 1 cm, se depositaron 0,6 g de raíces frescas en tubos de ensayo previamente rotulados. Se les adicionó hidróxido de potasio (KOH) al 10% hasta cubrir todas las raíces. Los tubos de ensayo, se introdujeron en un *Beaker* al baño maría a una temperatura de 100°C durante veinte minutos para garantizar la decoloración de todas las raíces y evitar interferencia con el colorante. Una vez terminada esta etapa, se realizó el proceso de tinción, para lo que se preparó una solución de ácido acético con 1% de tinta Parker. En dicha solución, se sumergieron por 50 segundos las raíces y posteriormente se observaron en el microscopio estereoscópico Zeiss Stemi SV6 usando un objetivo 10X [15]. Para la lectura de la colonización micorrizal, se implementó el método del intercepto de la cuadrícula, el cual consistía en extender las raíces teñidas en una caja de Petri, que tenía en la base de la caja una cuadrícula marcada. Luego, se revisaron las intercepciones de las raíces con las líneas de las cuadrículas en forma vertical y horizontal bajo el microscopio. Después se procedió a registrar la ausencia (-) o la presencia (+) de las estructuras de los hongos micorrizales en cada punto donde la raíz intercepte una línea [7].

En cada una de las repeticiones correspondientes a las diluciones se registraron las repeticiones que exhibían raíces infectadas (+) y no infectadas (-). Para determinar el NMP se tomaron las tres últimas diluciones con al menos una repetición positiva (infección); de ahí, se utilizaron estos datos de forma descendente como p1, p2 y p3. Dichos valores se situaron en la tabla propuesta por Cochran [10]. A continuación, el valor numérico obtenido se dividió por 30 y este correspondió al número de propágulos con capacidad infectiva en un gramo (1g) de suelo, metodología acorde a la técnica del número más probable (NPM) propuesta por Porter [12].



D. Extracción y cuantificación de esporas de hongos endomicorrízicos por la técnica de tamizaje, centrifugación y observación en estereoscopio

En la extracción y cuantificación de las esporas de HMA del suelo del monocultivo de cebolla y del inóculo micorrizal crudo, se tomaron 100 gramos de cada uno, se homogenizaron; y aplicando el método del cuarteo, se sacó una primera submuestra de 20 gramos; se repitió el procedimiento y finalmente se procedió con una muestra de gramo.

En un *Beaker* de 1.000 ml se adicionó el gramo de suelo y 500 ml de agua. Con la finalidad de separar los agregados del suelo, se le realizó agitación magnética a 1.000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, la suspensión se filtró por tamices estándar de malla en acero inoxidable con aperturas de 150 y 45 μm . No se implementaron aperturas más grandes de tamiz, ya que generalmente no se procesa el material que es retenido, por la cantidad de raíces y detritos orgánicos [7]. La muestra tamizada en húmedo por el tamiz de 45 μm se transfirió a un tubo Falcón de 15 ml, y se agregó una solución de sacarosa a una concentración de 50% v/v. Seguidamente, los tubos se centrifugaron en el equipo Thermos Scientific IEC Medilite a 2.500 rpm por un periodo de 10 minutos. El sobrenadante obtenido se tamizó por una apertura de 45 μm , se realizó lavado con agua destilada para retirar la sacarosa y evitar un daño al propágulo, el cual se genera por encontrarse en un medio hipertónico, lo que conlleva a un choque osmótico.

La muestra depositada en el tamiz de 45 μm se removió con agua destilada y una espátula a un papel filtro de 30 micras, el cual se marcó con líneas espaciadas a 1 cm, esto para facilitar y orientar el conteo de esporas. Por medio de dos pinzas, se tomó el papel filtro y se ubicó en una caja de Petri para proceder a cuantificar las esporas y realizar descripción de los morfotipos encontrados, dicho proceso se realizó en un estereoscopio Carl Zeiss™ Stemi 305 [16].



E. Análisis de la viabilidad de esporas y descripción de morfotipos

Para analizar la viabilidad de esporas de HMA, se tomaron muestras seleccionando los morfotipos cuando se llevó a cabo el proceso de extracción y cuantificación de esporas para ambos tratamientos. Posteriormente, en dos cajas de Petri, se adicionaron 10 g de suelo estéril preparado anteriormente como sustrato, se humedecieron con agua destilada hasta alcanzar la máxima capacidad de retención de agua del suelo. En la superficie se ubicó un papel filtro marcado con cinco círculos, donde se hallaban las esporas aisladas por morfotipos en el procedimiento de extracción y cuantificación para cada uno de los tratamientos (T1- T2). Las cajas de Petri se incubaron en oscuridad por diez días, observando las esporas regularmente. Una vez se observó que la longitud del tubo germinal era mayor al diámetro de la espora, se consideró germinada la espora, por lo que se procedió a contar en el estereoscopio Carl Zeiss™ Stemi 305, donde se fotografió para clasificar los morfotipos utilizando la Colección internacional de hongos micorrízicos arbusculares y vesículo arbusculares [17]. Se agruparon los diferentes morfotipos encontrados en las muestras, tomando como criterio de comparación la forma, el color y el tamaño de las estructuras. En la clasificación de morfotipos se realizaron sugerencias de compatibilidad.

F. Análisis de datos

La variable cualitativa monitoreada en el experimento fue: la germinación de la semilla de *Leucaena leucocephala* (si – no); mientras que a nivel cuantitativo se determinó el NMP, se contó el número de esporas y el porcentaje de colonización para cada uno de los tratamientos T1 - T2 y por las diluciones efectuadas.

Usando el software IBM SPSS V. 25 se llevó a cabo el análisis estadístico básicos como: mínimo, máximo, promedio y coeficiente de variación. Además de aplicar las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis, las cuales no requieren verificación del supuesto de normalidad, para establecer si existían diferencias significativas entre el número de



esporas contadas y el porcentaje de colonización entre los tratamientos evaluados (T1 Suelo cultivo de cebolla – T2 inóculo micorrizal crudo multiespórico) y entre las diluciones.

Para el NMP, el análisis de los resultados se realizó de manera cualitativa y cuantitativa. Para la primera parte se verificó que en las raíces existía colonización e infección micorrizal, a través del método de la cuadrícula, con lo que se indicaba si la respuesta fue positiva o negativa. A nivel cuantitativo, se analizaron los datos descendentes indicados como p1, p2 y p3 y se compararon con la tabla propuesta por Cochran, la cual permitía obtener el número de propágulos con capacidad infectiva en un gramo (1 g) de suelo, metodología acorde a la técnica del número más probable (NMP) propuesta por Porter [12].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Condiciones controladas en el montaje de la técnica microbiológica NMP en invernadero

El monitoreo de las variables ambientales durante la etapa experimental mostró que la temperatura del aire (TEM-A) se mantuvo entre 24,2 - 28,0°C, lo cual es el rango óptimo para el crecimiento de la planta indicadora *Leucaena leucocephala*. El valor promedio registrado de temperatura del aire en las seis semanas fue de 26,1°C. Por otra parte, la humedad relativa (HR) osciló entre 47,7 y 68,1%, registrando un valor promedio de 58,9%. Estos valores posibilitaron mantener una buena humedad en el suelo y, por tanto, no sometieron a las semillas germinadas una vez se establecieron las unidades experimentales ni a la plántula a estrés hídrico, debido a la adecuación de luminarias LED en el experimento para forzar la fotosíntesis durante las 24 horas, la intensidad lumínica (I) se mantuvo en el rango de 145 a 675 Lx, con un valor promedio de 376 Lx. El coeficiente de variación (CV) de las variables ambientales monitoreadas TEM-A, I y HR (CV TEM-A:0,053, CV (I):0,273: CV(HR):0,098) calculados infieren que las mediciones presentaron poca variabilidad y que el valor promedio es representativo



para compararlo con las condiciones ideales del crecimiento de la planta indicadora utilizada.

La estabilización de las condiciones ambientales en el experimento favoreció no solo el desarrollo de la semilla germinada y la plántula, sino también las condiciones adecuadas para la viabilidad de las esporas de los HMA y en consecuencia a la infección de las raíces.

A nivel de laboratorio, el monitoreo de estos parámetros garantizó mantener condiciones de igualdad entre las unidades experimentales, disminuyendo así los efectos en las variables respuestas cualitativas, presencia o ausencia de HMA, y en la cualitativa, NMP, lo que hizo posible las comparaciones y la evaluación del máximo potencial de los hongos.

B. Cuantificación de esporas de HMA y determinación de la colonización micorrizal

Al comparar en las 50 unidades experimentales (25 para el T1 y 25 para T2) la cantidad de esporas cuantificadas que se obtuvieron en el suelo proveniente del cultivo de cebolla (T1) contra el del inóculo micorrizal crudo (T2), se encontró que el valor mínimo de esporas contadas para T1 fue 4, mientras el máximo observado 17. En el T2, los valores oscilaron entre 8 y 26.

Los resultados muestran que el número de esporas en ambos tratamientos es diferenciado; esto se explica dada las condiciones propias para cada tratamiento. El suelo del monocultivo al usarse de manera intensiva, sin descanso y sin prácticas de sostenibilidad agrícolas amigables con el ecosistema, agota significativamente la capacidad de recuperación del mismo, disminuyendo la cantidad de elementos nutritivos disponibles para la microbiota y, por ende, se reduce el número de esporas de HMA. En el caso del T2, se encuentra un número mayor de esporas, lo cual es lógico teniendo en cuenta que se garantizan mejores condiciones para su viabilidad; sin embargo, se evidenció que el número de las esporas no tenían una distribución homogénea, lo que incidió en el total de ellas.



Para verificar si se encontraban diferencias significativas en la densidad de esporas entre los dos tratamientos, se aplicó una prueba no paramétrica, la cual indicó a partir del valor de $P < 0,05$ ($P = 0,007$) que estadísticamente si existen diferencias significativas en el número de esporas contadas en ambos tratamientos. Es coherente que el inóculo micorrizal crudo contuviese mayor cantidad de esporas, ya que se produce bajo condiciones controladas y aplicando los protocolos de calidad, lo que garantiza obtener mayor número de esporas, mientras que, en el T1, suelo del monocultivo de cebolla, la cantidad de esporas se pudo afectar por la aplicación continua de fertilizantes químicos que modifican el pH del suelo que directamente pueden disminuir la cantidad de esporas. Las labores culturales, como la eliminación de arvenses y la labranza realizadas para preparar el suelo cada vez que se va a realizar la siembra, es una de las causas que reduce la infección micorrízica; además de varios factores que están correlacionados, como la textura, el porcentaje de humedad, la temperatura, el pH y la disponibilidad de elementos necesarios para la nutrición vegetal [18], [19], [20].

Por otra parte, al promediar los resultados obtenidos en cada tratamiento por diluciones, se encontró que la colonización micorrizal fue del 36% para los dos tratamientos. Los hongos provenientes del cultivo de cebolla tuvieron un rango de colonización entre 20-60% y el inóculo micorrizal crudo alcanzó un rango de colonización entre 20-80%. Estos resultados establecen en consecuencia que el número de esporas y el porcentaje de infección micorrizal de los HMA, en ambos inóculos, corresponde a una concentración promedio para este tipo de propágulos al compararse con la Norma Técnica Colombiana 5842, la cual indica que los inoculantes sólidos elaborados con hongos micorrizógenos deben tener como concentración mínima 10 esporas viables por gramo y 40% de micorrización en raíces [11]. Sin embargo, es de anotar que el inóculo micorrizal crudo tuvo mayor NMP de HMA y capacidad infectiva comparado con la muestra de suelo del monocultivo de cebolla [21], lo que incidió además en la cantidad de raíces cosechadas de cada una de las unidades experimentales, donde se evidenció mayor efectividad en el inóculo micorrízico crudo [22].



A partir de la correlación de Spearman efectuada entre el número de esporas versus la colonización micorrizal se pudo identificar inicialmente una correlación positiva entre ambas variables (Figura 2.), lo que sugiere que estas tienen una alta dependencia teniendo en cuenta que se trata de organismos vivos. La concentración de esporas está proporcionalmente correlacionada con el grado de infección radicular, a mayor número de raíces infectadas mayor será el número de esporas y, por ende, mayor porcentaje de colonización durante el crecimiento vegetal [23]. No obstante, dicha proporcionalidad no siempre se mantiene. En algunos estudios realizados en árboles perennes de una selva tropical, la relación es inversamente proporcional entre la concentración de esporas y la infección micorrizal. La relación concentración de esporas e infección micorrizal, también puede variar conforme a las características específicas del suelo [23], [24].

El coeficiente de variación (CV) calculado con relación a la cantidad de esporas obtenido fue del 53%, mientras que para la infección micorrizal del 55%, lo que sugiere que ambos parámetros presentaron similar variación, y que en este caso la infección micorrizal se relacionó con la viabilidad y cantidad de esporas (Figura 2). Es de aclarar que una vez se dio la germinación de la espora, las hifas colonizan las raíces, al explorar el sustrato utilizado [25]. Este resultado hallado concuerda con lo evidenciado en otras investigaciones, donde una alta cantidad de esporas refleja un alto porcentaje de infección micorrizal en las raíces [26].



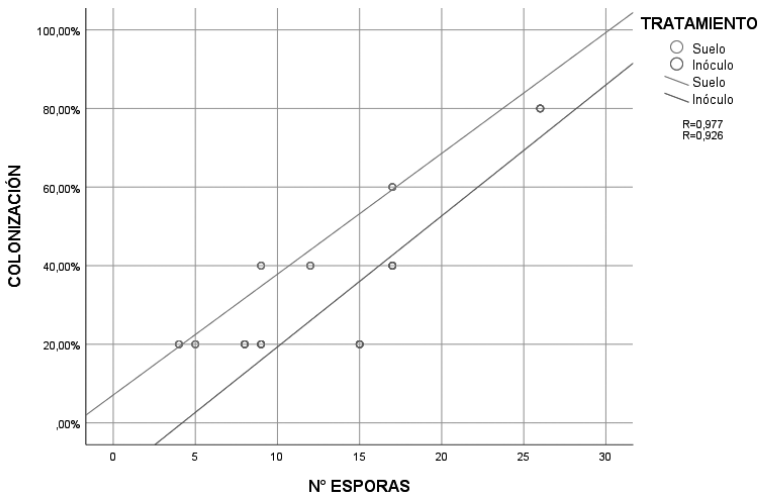


Fig. 2. Correlación de número de esporas versus la colonización micorrizal.

C. Cuantificación de propágulos infectivos de hongos endomicorrízicos

La técnica del número más probable (NMP) determinó la presencia o ausencia en réplicas consecutivas de los hongos contenidos en un inóculo micorrizal crudo y un suelo proveniente del monocultivo de cebolla, los cuales son capaces de infectar las raíces de la planta indicadora *Leucaena leucocephala*, todo esto con la finalidad de conseguir valores en un amplio intervalo de concentraciones [27].

En T1 se encontraron 40 propágulos infectivos/g de suelo y en el T2 se cuantificaron 76 propágulos infectivos/g (Tabla 1). La cantidad de propágulos estuvieron relacionados con las características del cada uno de los tratamientos. El hecho que el inóculo micorrizal crudo se prepare siguiendo estándares de calidad contemplados en la NTC 5842 puede indicar mayor diversidad a nivel morfológico, fisiológico y funcional, porque se estandarizan las condiciones para que las comunidades de organismos cuenten con todos los requerimientos nutricionales que posibiliten su presencia, nivel de infección y colonización cuando es aplicado. No obstante,



el número más probable de los HMA, en ambos inóculos, no tuvo una concentración óptima, ya que de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana 5842 se debe contar con 350, lo que representa esporas viables, micelio intrarradical y micelio extrarradical con capacidad de infectar las raíces de una planta indicadora como la *Leucaena leucocephala*. Sin embargo, al comparar el número de esporas establecidos en esa misma norma para los inoculantes sólidos elaborados con hongos micorrizógenos, la cual indica que deben tener como mínimo 10 esporas viables por gramo, se encuentra en ambos casos que el valor está por encima de ese parámetro [11],

La concentración de estructuras infectivas en el suelo del cultivo de cebolla y en el inóculo micorrizal crudo, se distribuyen aleatoriamente a través del sustrato y cada uno representa un potencial para producir una micorriza arbuscular.

TABLA 1 DETERMINACIÓN DE PROPÁGULOS MICORRÍZICO ARBUSCULARES EN LOS TRATAMIENTOS EVALUADOS

Variables	Suelo cultivo cebolla	Inóculo micorrizal crudo
Propágulos micorrizales		
Esporas (esporas/g)	4-17	8-26
Colonización Micorrizal (%)	20-60	20-80
NMP (propágulos/g)	40	76
Viabilidad esporas (esporas viables/g)	20	40



D. Determinación de la viabilidad de esporas y descripción de morfotipos

A partir de la prueba de viabilidad de esporas efectuados para cada uno de los tratamientos T1 y T2, se pudo identificar que el suelo del cultivo (T1) tenía un 20% de esporas viables/g y el inóculo micorrizal crudo (T2) un 40% de viabilidad. La diferencia encontrada en el porcentaje de viabilidad se asoció a que el inóculo al ser elaborado en laboratorio, puede tener una mayor ventaja metabólica en los procesos de germinación e infección. Asimismo, se encuentra concordancia entre la determinación de la viabilidad de las esporas y la cantidad de propágulos, puesto que en el T1 se encontraron 40 propágulos infectivos/g en relación a 20% de esporas viables y en el T2 se cuantificaron 76 propágulos infectivos/g en relación a 40% de esporas con capacidad de germinación. A mayor nivel de viabilidad, mayor es la cantidad de propágulos infectivos/g que pudieron encontrarse en cada uno de los tratamientos.

En ambos tratamientos, T1 y T2, se clasificaron morfotipos compatibles con los géneros *Acaulospora* spp. y *Glomus* spp. (Tabla 2), de los cuales predominó *Glomus* spp. En investigaciones realizadas en el trópico se han reportado estos géneros en concentraciones equivalentes, como es el caso, de los experimentos realizados en Brasil, donde indicaron que los morfotipos compatibles con géneros de *Glomus* spp. y *Acaulospora* spp. prevalecían en la simbiosis micorrízico arbuscular [28], resultados acordes con otros hallazgos para los bosques tropicales [23].



TABLA 2 DESCRIPCIÓN DE MORFOTIPOS ENCONTRADOS EN EL SUELO DEL CULTIVO DE CEBOLLA E INÓCULO MICORRIZAL CRUDO

Tratamiento	Morfotipo	Color INVAM	Forma	Tamaño (micras)	Pared	Compatibilidad
T1 Suelo	1	Naranja-marrón (0/20/60/0) a naranja-marrón oscuro (0/10/60/0), predominando en la parte central (0/40/100/0)	Globosa	60-150	Gruesa	<i>Acaulospora</i> spp
	2	Verde-marrón pálido (0/10/70/10)	Subglobosa	45-60	Delgada	<i>Glomus</i> spp
	3	Marrón (40/60/100/0)	Globosa	45-60	Delgada	<i>Glomus</i> spp
	4	Marrón pálido (20/40/80/0)	Subglobosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	5	Verde-marrón oscuro (20/20/70/10)	Subglobosa	45-60	Delgada	<i>Glomus</i> spp
	6	Verde-marrón pálido (0/10/70/10)	Subglobosa	45-60	Gruesa	<i>Acaulospora</i> spp
T2 Inóculo	7	Verde-marrón oscuro (20/20/70/10)	Globosa	60-150	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	8	Naranja-marrón pálido (0/20/40/0) a naranja-marrón oscuro (0/40/100/10)	Subglobosa	60-120	Delgada	<i>Acaulospora</i> spp
	9	Naranja-marrón pálido (0/20/80/0) a naranja-marrón oscuro (0/50/100/0)	Globosa	60-150	Gruesa	<i>Acaulospora</i> spp
	10	Naranja-marrón (0/20/60/0) a naranja-marrón oscuro (0/10/60/0), predominando en la parte central (0/40/100/0)	Globosa a subglobosa	60-150	Gruesa	<i>Acaulospora</i> spp



Tratamiento	Morfotipo	Color INVAM	Forma	Tamaño (micras)	Pared	Compatibilidad
T2 Inóculo	11	Rojo-naranja (0/60/60/0) a marrón rojo-oscura (40/60/70/10)	Globosa a subglobosa	60-150	Gruesa	<i>Acaulospora</i> spp
	12	Marrón (40/60/100/0)	Globosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	13	Naranja-rojo pálido (0/40/100/0)	Globosa a subglobosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	14	Marrón oscuro (40/60/100/10)	Globosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	15	Amarillo-marrón (0/20/100/10)	Subglobosa	45-60	Delgada	<i>Glomus</i> spp
	16	Marrón-naranja (20/60/100/0)	Subglobosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	17	Verde-amarillo pálido (0/10/50/10)	Parcialmente globosa	45-60	Delgada	<i>Glomus</i> spp
	18	Verde-marrón oscuro (20/20/70/10)	Subglobosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	19	Amarillo-naranja (0/30/80/0)	Globosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	20	Naranja-marrón pálido (0/40/80/0)	Subglobosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	21	Amarillo-pálido (0/0/40/0)	Globosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	22	Verde-gris (30/0/30/10)	Globosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	23	Marrón pálida (20/40/70/10)	Globosa	45-60	Delgada	<i>Glomus</i> spp
	24	Naranja pálido (0/30/60/0)	Subglobosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	25	Verde-marrón pálido (0/10/70/10)	Subglobosa	45-60	Gruesa	<i>Glomus</i> spp
	26	Marrón (40/60/100/0)	Globosa	45-60	Delgada	<i>Glomus</i> spp



5. CONCLUSIONES

La realización de esta investigación permitió concluir que los suelos en donde se cultiva cebolla tienen potencial para permitir el desarrollo de los HMA, lo que se evidenció a partir de la comparación que se efectuó con el inóculo micorrizal crudo multiespórico.

Fue evidente que la cantidad de esporas y el nivel de infección son diferentes, y esto es debido a que en el suelo del monocultivo de cebolla generalmente se desarrollan actividades como el desmalezado, la labranza y la aplicación de fertilizantes, los cuales inciden directamente en las propiedades del suelo y en consecuencia en las condiciones para el desarrollo de los HMA. En la valoración de la variabilidad del número de esporas y el grado de infección es importante a la hora de realizar la prueba, considerar plantas indicadoras con alta eficacia para el establecimiento de relaciones micorrizales, ya que de esta manera se puede garantizar mayor afinidad de los HMA con la planta, lo que de cierta manera influye en el grado de infección, en el tamaño de las raíces y en la cantidad de propágulos.

El haber usado semilla certificada, pudo garantizar un 66,6% de la germinación, lo que incidió en el establecimiento de semillas ya germinadas en las unidades experimentales y en la cantidad de biomasa cosechada por unidad, generando así una relación hongo-planta exitosa.

Por otra parte, en la valoración los resultados analizados, se encontró que el suelo del monocultivo de cebolla tuvo menor número y diversidad de propágulos infectivos, respecto a la cantidad de estructuras determinadas en el inóculo micorrizal crudo multiespórico.

En el suelo del cultivo de cebolla se encontraron 40 propágulos infectivos/g, mientras que en el del inóculo micorrizal crudo se cuantificaron 76 propágulos infectivos/g; las diferencias entre ambos tratamientos, T1 y T2, se asocian esencialmente al origen de las muestras, ya que la valoración se realizó bajo condiciones *in vitro* y variables ambientales controladas como la humedad relativa, la temperatura del aire, la iluminación y la preparación del sustrato.



Para ambas muestras, el conteo de esporas por gramo y el porcentaje de colonización micorrizal están correlacionados ($P \leq 0,05$). A partir de estos resultados se puede inferir que la técnica del número más probable (NMP) de propágulos micorrizales se constituye en una herramienta para evaluar la calidad micorrizal de un cultivo o un inóculo crudo. Finalmente, se puede deducir que la cuantificación de propágulos micorrizales es una herramienta para estimar la simbiosis micorrizal, en sistemas de producción de inóculos comerciales o a nivel de campo.

REFERENCIAS

- [1] T. Taylor, M. Krings, and E. Taylor, *Fossil Fungi*, USA, Academic Press, 2014.
- [2] T. Cavagnaro, F. Bender, H. Asghari, and M. Heijden, «The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss,» *Trends Plant Sci*, vol. 20, nº 5, pp. 283-290, 2015.
- [3] D. Douds, D. Wilson, R. Seidel, and C. Ulsh, «A method to minimize the time needed for formation of mycorrhizas in sweet corn seedlings for outplanting using AM fungus inoculum produced on-farm,» *Scientia Horticulturae*, vol. 203, pp. 62-68, 2016.
- [4] S. Ferrazano, and P. Williamson, «Benefits of mycorrhizal inoculation in reintroduction of endangered plant species under drought conditions,» *Journal of Arid Environments*, vol. 98, pp. 123-125, 2013.
- [5] J. Munroe, G. Soto, E. Virginio Filho, and M. Isaac, «Soil microbial and nutrient properties in the rhizosphere of coffee under agroforestry management,» *Applied Soil Ecology*, vol. 93, pp. 40-46, 2015.
- [6] S. Nadeem, M. Ahmad, Z. Zahir, A. Javaid, and M. Ashraf, «The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments,» *Biotechnology Advances*, vol. 32, nº 2, pp. 429-448, 2014.
- [7] W. Osorio, *Biología y fertilidad del suelo - manual para el estudio de propiedades físicas, químicas y biológicas de la fertilidad del suelo*, Medellín, Universidad Nacional de Colombia, 2020.



- [8] Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria, *Programa de uso eficiente y racional del agua (PUEYRA) del Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria*, Medellín, 2019.
- [9] American Public Health Association (APHA), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington D. C., 21 th, 2012.
- [10] W. Cochran, «Estimation of Bacterial Densities by Means of the “Most Probable Number”,» *Biometrics*, vol. 6, nº 2, pp. 105-116, 1950.
- [11] NTC 5842, *Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Requisitos*, Primera ed., 2018.
- [12] W. Porter, «The ‘most probable number’ method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil,» *Australian Journal of Soil Research*, vol. 17, nº 3, pp. 515-519, 1979.
- [13] NTC 5167, *Productos para la industria agrícola. Productos orgánicos usados como abonos o fertilizantes y enmiendas o acondicionadores de suelo*, Bogotá, 2011.
- [14] International Seed Testing Association, *Handbook of vigor test methods*, Segunda ed., 1995.
- [15] P. Kormanik, W. Bryan, and R. Shultz, «Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay,» *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 26, nº 4, pp. 536-538, 1980.
- [16] E. Sieverding, *Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio*, Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, 1993.
- [17] INVAM, *International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal. The Fungi-Classification*, 2020.
- [18] D. Trejo, I. Barois, and W. Sangabriel-Conde, «Disturbance and land use effect on functional diversity of the arbuscular mycorrhizal fungi,» *Agroforestry Systems*, vol. 90, nº 2, pp. 265-279, 2016.



- [19] G. Bai, Y. Bao, G. Du, and Y. Qi, «Arbuscular mycorrhizal fungi associated with vegetation and soil parameters under rest grazing management in a desert steppe ecosystem,» *Mycorrhiza*, vol. 23, nº 4, pp. 289-301, 2013.
- [20] H. Schnyder, F. Locher, and K. Auerswald, «Nutrient redistribution by grazing cattle drives patterns of topsoil N and P stocks in a low-input pasture ecosystem,» *Nutr Cycl Agroecosyst*, vol. 88, pp. 183-195, 2010.
- [21] R. Borie, R. Rubio, J. Rouanet, A. Morales, G. Borie, and C. Rojas, «Effects of tillage systems on soil characteristics, glomalin and mycorrhizal propagules in a Chilean Ultisol,» *Soil and Tillage Research*, vol. 88, nº 1-2, pp. 253-261, 2006.
- [22] W. Yang, Y. Zheng, C. Gao, X. He, Q. Ding, Y. Kim, Y. Rui, S. Wang, and L. Guo, «The Arbuscular Mycorrhizal Fungal Community Response to Warming and Grazing Differs between Soil and Roots on the Qinghai-Tibetan Plateau,» *PloS ONE*, vol. 8, nº 9, 2013.
- [23] N. Sivakumar, «Effect of edaphic factors and seasonal variation on spore density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane fields,» *Ann Microbiol*, vol. 63, nº 1, pp. 151-160, 2013.
- [24] I. Louis, and G. Lim, «Spore density and root colonization of vesicular-arbuscular mycorrhizas in tropical soil,» *Transactions of the British Mycological Society*, vol. 88, nº 2, pp. 207-212, 1987.
- [25] I. de la Provincia, M. Nadimi, D. Beudet, G. Rodriguez, and M. Hijri, «Detection of a transient mitochondrial DNA heteroplasmy in the progeny of crossed genetically divergent isolates of arbuscular mycorrhizal fungi,» *New Phytol*, vol. 200, nº 1, pp. 211-221, 2013.
- [26] K. Birhane, K. Aregawi, and K. Giday, «Changes in arbuscular mycorrhiza fungi spore density and root colonization of woody plants in response to exclosure age and slope position in the highlands of Tigray, Northern Ethiopia,» *Journal of Arid Environments*, vol. 142, pp. 1-10, 2017.
- [27] R. Blodgett, Appendix 2. Most Probable Number Determination from Serial Dilutions. *FDA Bacteriological Analytical Manual*, 2010.



- [28] W. Zangaro, L. Rostirola, P. de Souza, R. de Almeida Alves, L. Lescano, A. Rondina, M. Nogueira, and R. Carrenho, «Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil,» *Mycorrhiza*, vol. 23, nº 3, pp. 221-233, 2013.
- [29] M. Cely, A. Oliveira, V. Freitas, M. Luca, A. Barazetti, I. Santos, B. Gionco, G. Garcia, C. Prete, and G. Andrade, «Inoculant of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (*Rhizophagus clarus*) Increase Yield of Soybean and Cotton under Field Conditions,» *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, 2016.





Potencial biotecnológico de la miel de café como sustrato en bioprocesos usando gránulos de kéfir de agua

Resumen- El gránulo de kéfir de agua es consumido a nivel local debido a su potencial probiótico asociado a su contenido de bacterias ácido lácticas (BAL). Con el fin de explorar su potencial antioxidante, se propuso el uso de concentrado de mucílago de café (CMC) y la panela como sustratos en el proceso de fermentación de un consorcio de gránulos de kéfir de agua, cuya identificación metataxonómica indicó como predominantes los géneros: *Lactobacillus* sp y *Saccharomyces* sp. La concentración máxima de CMC que puede ser empleada sin alterar la viabilidad del gránulo y su metabolismo fue 10%, y combinada con panela en una concentración de 100 g/L produjo 45,17 g/L de masa seca y una productividad volumétrica de 0,15 g secos /L*día. Por otro lado, mediante un diseño multifactorial, donde se evaluaron las variables de concentración de panela (C_{panela}), porcentaje de CMC y pH inicial, se observó que el crecimiento del kéfir de agua en presencia de CMC al 10% a pH 7,0 es similar a la concentración de CMC de 0% (P_{vol} : 0,91±0,11; X_f : 27,3±3,2 y P_{vol} : 1,01±0,13; X_f : 30,7±3,8, respectivamente) y de panela de 100g/L. Sin embargo, la mayor concentración de polifenoles totales fue obtenida en presencia de panela 100g/L y CMC al 10% a un pH de 7,0, con un valor de 187,0±6,0 mgGAE/100g, siendo esta la mejor combinación de factores. Estos hallazgos sugieren que el CMC puede ser utilizado junto con la panela como sustratos promisorios, con potencial antioxidante, en el proceso de fermentación usando el gránulo de kéfir de agua.

Palabras clave- Mucílago de café, panela, gránulos de kéfir, polifenoles totales, antioxidantes.

Lisett V. Wilches L.

Universidad de Antioquia, Grupo de Biotransformación - Escuela de Microbiología, Calle 70 No 52-21. Medellín, 050010, Colombia, lisett.wilches@udea.edu.co;

Nathalia Marín Pareja.

Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), Tecnoparque nodo Medellín, Regional Antioquia - Centro de Servicios y Gestión Empresarial, Carrera 46 # 56 - 11, Medellín, Colombia, nathalia.marinp@gmail.com

Ezequiel Pérez Monterroza.

Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) - Câmpus de São José do Rio Preto. Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brasil, eperez494@gmail.com

Luisa F. Rojas.

Universidad de Antioquia, Grupo de Biotransformación - Escuela de Microbiología, Calle 70 No 52-21. Medellín, 050010, Colombia, lisett.wilches@udea.edu.co; lfernanda.rojas@udea.edu.com



1. INTRODUCCIÓN

El mucílago es un subproducto del beneficio húmedo del café, que se obtiene a partir de la remoción mecánica de la pulpa o mesocarpio que recubre la semilla [1]; dentro de su composición está el agua (concentración superior al 90%), azúcares reductores (especialmente fructosa (5%), proteínas, pectina [2] y es rico en ácidos clorogénicos y polifenoles, con un pH de 4,6 y 65 grados Brix, aproximadamente. El mucílago del café es atractivo para el sector biotecnológico ya que se encuentra disponible con relativa facilidad, además su potencial se incrementa, ya que es un subproducto contaminante, especialmente para los ecosistemas acuáticos [3], debido a que genera una capa en la superficie del agua, agotando el oxígeno disuelto[4], afectando de esta manera la fauna y flora del entorno; incrementando tanto la materia orgánica (DQO: 50.000 mg/ L y DBO: 6.000 a 20.000 mg /L) como los sólidos totales, los cuales pueden oscilar entre 1.000 y 7.500 mg/L [5]. Cuando es eliminado inadecuadamente, el mucílago de café puede causar malos olores y favorecer al crecimiento de insectos en las plantas cafeteras. Su disposición o uso industrial se realiza actualmente de cinco formas: (a) Compostaje (b); se usa en la producción de enzimas pectinolíticas; (c) se puede eliminar mediante acidificación; (d) se pueden hidrolizar totalmente de los carbohidratos presente en su matriz [6]; (e) se puede emplear en la obtención de concentrado de mucílago de café (CMC), una matriz concentrada en carbohidratos, minerales y compuestos fenólicos de alta capacidad antioxidante [7].

No obstante, algunos autores han sugerido el uso del mucílago de café como sustrato en procesos fermentativos, aprovechando su contenido de azúcares; por ejemplo, en el 2020, De Melo sugirió que las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) presentes durante la fermentación del café, tienen la capacidad de generar productos derivados, porque cuentan con un metabolismo homofermentativo y/o de ácido mixto, permitiéndoles producir diversos metabolitos, a pesar de las condiciones de estrés relacionadas con el café o sus componentes, en especial el bajo pH de esta matriz, lo que permitiría mitigar el impacto medio ambiental de este residuo [8].



El gránulo de kéfir de agua es un consorcio microbiano compuesto por bacterias de ácidos lácticos y acéticas, y levaduras embebidas en una matriz de exopolisacárido, que coexisten en un sistema simbiótico [9]. Esta sinergia microbiana genera metabolitos tales como etanol, dióxido de carbono, dextranos, y ácidos lácticos y acético [10] a metagenomic study of a water kefir fermentation ecosystem enabled the reconstruction of a metagenome-assembled genome (MAG). El cultivo del gránulo de kéfir de agua se lleva a cabo tradicionalmente con una solución de sacarosa a 100 g/L [11]; sin embargo, otros estudios han reportado a la panela [14] como fuente de carbono; esta resulta de la extracción y evaporación de los jugos de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L); es una melaza natural, no centrifugada y sin refinar, la cual es muy consumida en América Latina por su poder edulcorante, capacidad antioxidante y su alto contenido en compuestos fenólicos [13] [15].

Por esta razón, se hace necesario el desarrollo de estudios que empleen el mucílago de café como insumo para el desarrollo de productos de alto valor agregado y que puedan impactar positivamente el manejo de los residuos agroindustriales, nosotros consideramos que el mucílago de café es una alternativa viable para la producción de ingredientes bioactivos. Siguiendo estos argumentos, este trabajo pretende utilizar este subproducto de la agroindustria como suplemento para el crecimiento de biomasa en la fermentación con gránulos de kéfir de agua, en proporciones que no causen alteraciones al crecimiento microbiano. Además, determinar el efecto de la concentración de la panela y del pH del medio sobre el proceso de fermentación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

A. *Material biológico*

Los gránulos de kéfir de agua empleados en este estudio fueron adquiridos de un cultivador artesanal de la ciudad de Cali (KC), Colombia (3°26'13"N, 76°31'20"O). El consorcio se mantuvo activo mediante subcultivos



sucesivos en un medio de crecimiento compuesto por: 1l de agua, 100 g de panela y 100 g de KC.

B. Sustratos

La Panela fue proporcionada por un distribuidor local; El concentrado de mucílago de café (CMC al 5%) fue donado por la empresa Sanadores Ambientales (Sanam Company), ubicada en Medellín, Antioquia.

C. Identificación molecular

La identificación molecular de KC se realizó a partir de la extracción del ADN comunitario, utilizando el kit PureLink Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y la cantidad de material genético extraído se cuantificó por el método fluorométrico (Picogreen). Para la identificación molecular de los microorganismos presentes en el consorcio, se amplificó y secuenció masivamente el ADN, mediante marcadores moleculares ribosomales, tales como: la región hipervariable 16S/V4, para bacterias; y la región intergénica ribosomal ITS1, para levaduras. Posteriormente, se prepararon y secuenciaron librerías pareadas de 300bp en la plataforma Illumina (Macrogen Inc, Seoul, República de Corea). Se utilizaron los siguientes cebadores para bacterias: Bakt_341F (5'- CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y Bakt_805R (5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'), de acuerdo con Herlemann et al. [16]; para las levaduras se emplearon: ITS3F (5'- GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') y ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

El secuenciamiento se llevó a cabo usando el programa Mothur V1.39, siguiendo el protocolo estándar para librerías de Illumina Miseq (SOP) [17]". Las secuencias pareadas se ensamblaron usando la herramienta "make.contigs" del Mothur y, a continuación, se alinearon en Silva (base de datos de referencia para la secuenciación de genes del RNA ribosómico).

Con el algoritmo VSEARCH se removieron las secuencias quiméricas; mientras que las de linajes no bacterianos, bien sea de origen mitocondrial, cloroplasto, de arqueas y de eucariotas, fueron removidas



con el fin de depurar la base de datos. Luego, para agrupar las secuencias moleculares en unidades taxonómicas operacionales, conocidas por sus siglas en inglés OTU, se utilizó la estrategia “dist.seqs”, considerando una distancia límite entre secuencias del 0,03; normalizando los datos con el método “totalgroup”.

La clasificación filogenética de los OTU fue realizada con la herramienta “Clasiffier” de la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project-RDP), con un umbral de arranque de 80. Finalmente, se calcularon los índices de diversidad alfa: Incluyendo Chao1; especies observadas; Simpson y Shannon, utilizando el paquete Phyloseq del programa R (V3.6.3)

D. Efecto del concentrado de mucílago de café (CMC) como suplemento para la fermentación del gránulo de kéfir

Una solución de panela de 100 g/L fue suplementada con CMC en diferentes concentraciones (0, 2, 5, 10, 30, 50 y 100%) e inoculada con 5 g de KC lavados con agua, se incubó por 72 horas a 25°C. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las variables de respuesta medidas fueron: (Y_1) masa seca (g/l) y (Y_2) productividad volumétrica (*g secos/L* día*), para observar el efecto del CMC sobre el crecimiento del gránulo.

E. Efecto de la concentración de panela, CMC y el pH sobre el cultivo del KC

Para analizar el desempeño del CMC como posible sustrato para KC, se llevó a cabo un diseño experimental tipo central compuesto (2^3), usando como factores la concentración de panela (C_{panela}): 0 - 100 g/L (X_1); concentración de CMC 0 - 10 % (X_2) y pH 3,5 - 7,0 (X_3), que arrojó una matriz de 24 experimentos. Los experimentos se realizaron en erlenmeyer de 250 ml, con un volumen de 100 ml del medio de cultivo e inoculados con 5 g de KC lavados. El tiempo de fermentación fue de 72 horas a 25°C. Las variables de respuesta fueron masa seca (X_f), productividad volumétrica (P_{vol}), pH final (pH_f) y polifenoles totales (PT).



F. Técnicas analíticas

Masa seca y productividad volumétrica. La masa seca se determinó separando asepticamente el KC con un tamiz, eliminando el exceso de agua con papel absorbente. Los gránulos fueron pesados antes y después de ser sometidos a un proceso de secado a 90°C durante 24 horas. La masa seca se determinó por medio de la expresión 1:

$$X_f = \square(W_f/V) \quad (1)$$

Donde: W_f es la masa final seca (g); V es el volumen de la suspensión (L).

Para la productividad volumétrica (g secos/L*día), se determinó usando la expresión 2:

$$p_{vol} = (X_f - X_i)/t \quad (2)$$

Donde: X_i : es la masa inicial seca (g/L); X_f : es la masa final seca (g/L); t es tiempo (d).

Polifenoles totales. La determinación de los polifenoles totales (PT) se llevó cabo según la metodología propuesta por Singleton & Rossi, en 1965 [18]. Se pesaron dos gramos de KC en polvo (secos a 45°C durante 48 horas) y se mezclaron con una solución de agua-isopropanol en relación 40:60 v/v. De ahí, la muestra fue sometida a ultrasonido (Fisherbrand™ Elmasonic) durante 1 hora y se agitó en vórtex (Velp Scientifica) por 1 minuto a 30.000 rpm. Por último, fue obtenido un extracto por centrifugación a 700×g a 4°C durante 20 min.; estese incubó durante una 1 hora a 25±2°C con el reactivo de Folin-Ciocalteu 2N. Los polifenoles fueron determinados por lectura espectrofotométrica a 760 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC). El ácido gálico se usó como patrón para la curva de calibración; y el agua destilada con carbonato de sodio al 20%, como blanco. Las cuantificaciones se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico equivalente por 100 g de muestra de KC seco (mgGAE/100g) [19].



Determinación del pH. Este parámetro fue monitoreado empleando un medidor de pH portátil Hach HQ11D; para las corridas experimentales, este pH fue ajustado con hidróxido de sodio (NaOH) 5M o ácido clorhídrico (HCL) 5M.

G. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue definido para un nivel de significancia de $\alpha = 5\%$. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos fueron determinadas por ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples (Bonferroni) con el programa estadístico Statgraphics Centurion® Versión XV.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Identificación molecular del gránulo de kéfir de agua proveniente de Cali (KC)

La metataxonómica del KC fue realizada mediante la plataforma Illumina, la cual permitió identificar 71.269 OTU; de los cuales el género *Lactobacillus* sp fue el dominante con 58.916 OTU, lo que corresponde al 82,67% de la abundancia relativa; seguido por dos géneros pertenecientes al grupo de las bacterias ácido-acéticas: *Komagataeibacter* sp con el 8,73% (6.223 OTU) y *Acetobacter* sp con el 8,48% (6043 OTU). El resto de los géneros bacterianos contaron con menos de 39 OTU (Figura 1).



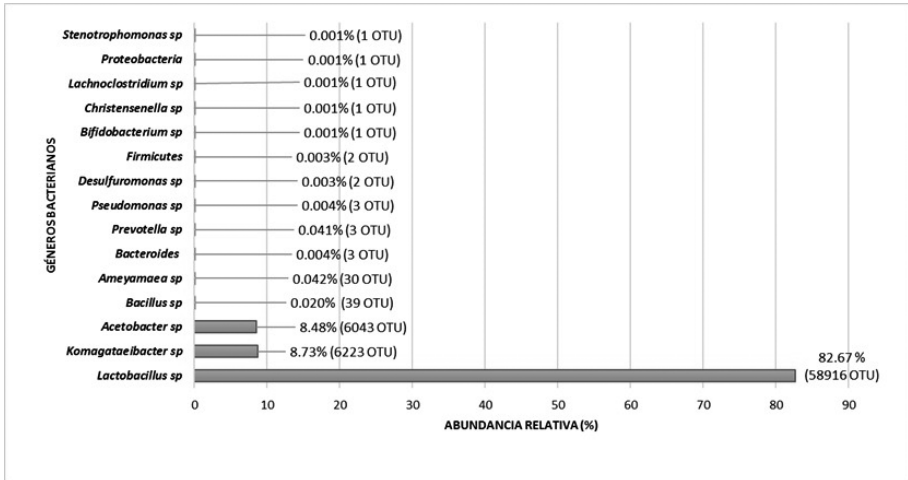


Fig. 1. Identificación metataxonómica de los géneros bacterianos para el Gen 16S/V4 de KC, junto con su abundancia relativa y el número de OTU.

Lactobacillus spes es el encargado de la formación de exopolisacáridos granulares, y posee una mayor afinidad por la sacarosa [20]water, kefir granules, dried or fresh fruits. In our water kefir granules, *Lactobacillus* (L. presente en el medio del cultivo, en comparación con las ácido acéticas *Komagataeibacter sp* o *Acetobacter sp*; este comportamiento metabólico del *Lactobacillus sp* favorece su dominio dentro del consorcio.

El análisis metataxonómico permitió identificar las levaduras presentes precisamente en medio de cultivo. El análisis molecular mostró un total de 128.246 OTU, siendo *Saccharomyces sp* el género predominante, con una abundancia relativa del 99,36%, correspondiente a 127.428 OTU. Cabe destacar que en el consorcio no existen solamente levaduras, también microorganismos pertenecientes al filo *Basidiomycota*, tales como el *Penicillium sp*, con 13 OTU. No obstante, esto representa una abundancia relativa muy baja, la cual es cercana al 0,01% (Figura 2).



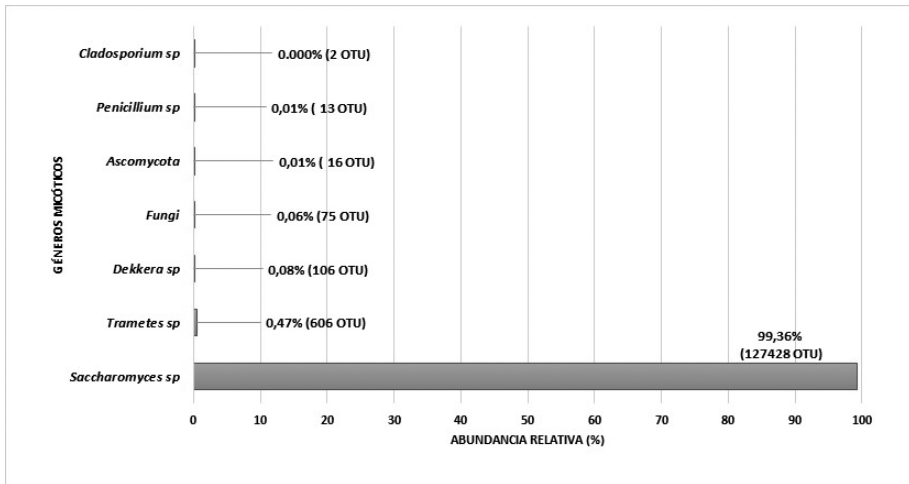


Fig. 2. Identificación de géneros micóticos de la región intergénica ITS1 de KC, junto con su abundancia relativa y el número de OTU.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por García et al. [21] conferring upon them their characteristic organoleptic, physical and nutritional properties. Moreover, the search for novel products that satisfy the needs of consumers, especially foods with health-giving properties, means that new combinations of microorganisms are tested on a wide variety of substrates. In these microbial consortia, lactic acid bacteria (LAB y Marsh et al. [22], los cuales indicaron que los géneros predominantes en cuatro gránulos de kéfir de diferente procedencia, fueron *Saccharomyces sp* y *Lactobacillus sp*.



Mientras que Nalbantoglu et al.[23] reportaron que el género mapeado por secuenciación metagenómica, en dos consorcios de kéfir turcos, fue el *Lactobacillus* con una abundancia relativa al 99%, siendo mayor que la encontrada en KC, que tuvo una abundancia relativa de 82,67%. Cabe destacar que el número de OTU observadas fue mayor en 16S/V4 que, en las ITS1, con valores de 128 y 82, respectivamente (Tabla 1).

Este método de estimación de abundancia reveló que existe un mayor número de géneros bacterianos que de levaduriformes en el KC:

Con relación a la biodiversidad de las especies en el KC, se calcularon los índices de diversidad Shannon y Simpson, incluyendo el índice Chao1, el cual estima la diversidad de especies de la muestra utilizando el número de especies raras y la probabilidad de que estén presentes en la muestra. Mediante el gen bacteriano 16S/V4 se determinó un menor número de géneros, con un valor para Chao1 de 75, en comparación con las ITS1 que alcanzó un Chao1 de 540 (Tabla 1). Esto indica que las levaduras cuentan con un mayor número de especies raras y/o por diferenciar, en comparación con los géneros bacterianos.

TABLA 1 ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y RIQUEZA DE LA SECUENCIACIÓN PARA KC

Muestra	OTU observadas	Chao1	Shannon	Simpson
16S/V4				
KC	128	75	1,54	0,29
ITS1				
KC	82	540	0,05	0,98

El índice de alfa diversidad Shannon, el cual permite establecer la probabilidad de encontrar un individuo en un ecosistema, y confirmar si existe una mayor biodiversidad, fue mayor en el gen bacteriano 16S/V4 que en la ITS1. Esto indica una mayor secuenciación de bacterias que de levaduras, mientras que el índice de Simpson, con un valor de 0,986, confirmó



que las ITS1 muestran una menor diversidad de especies, es decir, existe mayor dominación de una especie, específicamente de *Saccharomyces* sp como se había mencionado anteriormente. Tu et al. [24] evaluó una bebida a base de suero de soja fermentada con gránulos de kéfir de agua, los cuales fueron secuenciados molecularmente, los autores reportaron valores en el *índice de Chao1* de 10888,42 para levaduras y 5531,22 para bacterias, resaltando la alta riqueza de especies en comparación con las levaduras. Tu et al. [24], también reportaron valores bajos para el índice de Shannon (1,19) y Simpson (0,65). Estos resultados son comparables con el análisis de biodiversidad para el KC, el cual tuvo valores de 1,54 y 0,29, para cada uno de los índices, respectivamente. Cabe resaltar que la microbiota en los granos de kéfir está fuertemente influenciada por el origen geográfico y el entorno donde se subcultiva [25].

B Efecto del concentrado de mucílago de café (CMC) como suplemento para la fermentación de KC

Con el fin de determinar la mayor concentración de CMC que pudiera ser usada sin afectar el proceso de fermentación del KC, se llevó a cabo un ensayo que permitiría identificar la mayor productividad volumétrica, empleando la mayor cantidad de residuo. La Tabla 2 muestra la masa seca (g/L) (Y_1) y la productividad volumétrica (Y_2) (g secos/L*día), como producto de la fermentación del KC usando como sustratos la panela y CMC.

TABLA 2 PRODUCCIÓN DE MASA SECA Y PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CMC

Porcentaje CMC	Y_1 : Masa seca (g/L) \pm DS	Y_2 : Productividad volumétrica (g secos/L*día) \pm DS
0%	51,23 \pm 2,3	0,17 \pm 0,0
2%	46,80 \pm 4,6	0,15 \pm 0,0
5%	45,59 \pm 5,6	0,15 \pm 0,0
10%	45,17 \pm 1,5	0,15 \pm 0,0



Porcentaje CMC	Y_1 : Masa seca (g/L) \pm DS	Y_2 : Productividad volumétrica (g secos/L*día) \pm DS
30%	16,17 \pm 2,1	0,05 \pm 0,0
50%	13,47 \pm 2,2	0,04 \pm 0,0
100%	681 \pm 2,6	0,02 \pm 0,0

En ausencia de CMC (solo panela como sustrato), la producción de masa seca estuvo alrededor de 51,23 g/L después de 72 horas de fermentación; en contraste con la obtenida, usando un 100% de CMC, la cual produjo solo 6,81 g/L de masa seca; mientras que la productividad volumétrica varió entre 0,02 y 0,17 g/L. Se seleccionó la concentración de 10% de CMC, considerando que es necesario obtener la mayor productividad volumétrica, usando la mayor cantidad de posible del contaminante (CMC), de tal forma que se pueda potencializar el uso de este residuo, sin que se disminuya la producción de biomasa o se afecte la integridad de los microorganismos inmersos en el consorcio. CMC por encima del 30% tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de biomasa de kéfir, esto puede ser causado por:

- a. El estrés oxidativo generado por el contaminante (Tabla 2). Las células microbianas requieren un entorno redox equilibrado y cuando se perturba esta regulación, debido a altas concentraciones de antioxidantes en el medio, se interrumpe la homeostasis celular [26], especialmente al formarse especies de oxígeno reactivo (ROS) intracelular, las cuales someten al consorcio a diversos estadios de tensión, resultando en fallas de sus sistemas de desintoxicación, alterando la funcionalidad de las proteínas y enzimas responsables de la eliminación de ROS [27].
- b. Compuestos orgánicos, tipo fenoles, presentes en el CMC, afectan los microorganismos dado que inducen la formación de radicales libres; el carácter hidrofóbico de esta molécula no favorece el ingreso a las células, aunque proteínas transmembranales permiten este proceso.



Ya en el citoplasma, los fenoles sufren modificaciones en su estructura química generadas por enzimas tipo oxidasas del citocromo P450 [28] no obstante, genera muchos subproductos los cuales atentan contra la salud del ambiente. Las aguas de producción, por ejemplo, pueden contener trazas de metales pesados e hidrocarburos, razón por la cual deben ser reincorporadas de forma adecuada al ambiente. En este trabajo, se aislaron, caracterizaron e identificaron molecularmente ocho bacterias en base a su capacidad para degradar fenol. Primero, se evaluó el crecimiento y la degradación de fenol bajo diferentes concentraciones (500, 800 y 1200 mg/L. Estas alteraciones estructurales generan metabolitos que pueden facilitar la toxicidad celular, afectando el ADN o modificando tanto enzimas como proteínas; de igual forma, alteran la modulación energética, la estabilidad lipídica especialmente de la membrana, siendo contraproducentes para la propagación de la biomasa y otros bioprocesos microbianos.

C. Efecto de la concentración de panela, CMC y el pH sobre el cultivo del KC

Los resultados del diseño experimental se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3 MATRIZ DE RESULTADOS EXPERIMENTALES CON LOS FACTORES PANELA, CMC y pH JUNTO CON LAS VARIABLES DE RESPUESTA

Corrida No.	Factores			Variables de respuesta			
	X_1 C_{Panela} (g/L)	X_2 CMC (g/L)	X_3 pH	Y_1 X_f (g/L) ± DS	Y_2 PVol (g secos/L* día) ± DS	Y_3 pH_f ± DS	Y_4 PT (mgGAE/100g KC ± DS)
1	0	0	3,5	0,50±3,4	0,02±0,1	3,42±0,0	23±7,0
2	100	10	7	31,34±3,4	1,04±0,1	3,71±0,0	193±3,4
3	100	10	3,5	3,54±2,0	0,12±0,1	3,15±0,0	149±7,0
4	100	10	7	24,87±3,4	0,83±0,1	3,76±0,0	187±3,4



Corri- da No.	Factores			Variables de respuesta			
	X_1 C_{panela} (g/L)	X_2 CMC (g/L)	X_3 pH	Y_1 X_f (g/L) \pm DS	Y_2 Pvol (g secos /L ² día) \pm DS	Y_3 t_f \pm DS pH	Y_4 PT (mgGAE/100g KC \pm DS)
5	100	10	3,5	0,22 \pm 2,0	0,01 \pm 0,1	3,10 \pm 0,0	142 \pm 7,0
6	100	10	7	26,16 \pm 3,4	0,87 \pm 0,1	3,75 \pm 0,0	181 \pm 3,4
7	0	0	3,5	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,1	3,41 \pm 0,0	37 \pm 7,0
8	0	10	3,5	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0	3,37 \pm 0,0	169 \pm 9,5
9	0	0	7	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0	3,76 \pm 0,0	43 \pm 4,5
10	100	0	3,5	6,21 \pm 4,7	0,21 \pm 0,2	3,00 \pm 0,0	175 \pm 8,0
11	0	10	7	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0	4,05 \pm 0,0	167 \pm 2,0
12	100	10	3,5	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0	3,17 \pm 0,0	156 \pm 7,0
13	100	0	7	34,75 \pm 3,6	1,16 \pm 0,1	3,60 \pm 0,0	170 \pm 2,5
14	100	0	7	29,20 \pm 3,6	0,97 \pm 0,1	3,61 \pm 0,0	173 \pm 2,5
15	100	0	3,5	8,51 \pm 4,7	0,28 \pm 0,2	3,00 \pm 0,0	159 \pm 8,0
16	100	0	3,5	15,26 \pm 4,7	0,51 \pm 0,2	2,96 \pm 0,0	167 \pm 8,0
17	0	0	7	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0	3,72 \pm 0,0	34 \pm 4,5
18	100	0	7	27,74 \pm 3,6	0,92 \pm 0,1	3,59 \pm 0,0	175 \pm 2,5
19	0	10	3,5	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0	3,30 \pm 0,0	160 \pm 9,5
20	0	0	7	1,72 \pm 1,7	0,06 \pm 0,1	3,79 \pm 0,0	38 \pm 4,5
21	0	0	3,5	1,30 \pm 3,4	0,04 \pm 0,1	3,43 \pm 0,0	30 \pm 7,0
22	0	10	3,5	1,15 \pm 2,0	0,04 \pm 0,1	3,36 \pm 0,0	179 \pm 9,5
23	0	10	7	1,21 \pm 1,5	0,04 \pm 0,1	4,07 \pm 0,0	169 \pm 2,0
24	0	10	7	0,00 \pm 0,0	0,00 \pm 0,0	3,89 \pm 0,0	165 \pm 2,0



TABLA 4 VALOR p DE LOS FACTORES Y SUS INTERACCIONES

Factor	X_f	Pvol	pH_f	PT
A: CMC	0,105	0,012*	0,000*	0,000*
B: Panela	0,470	0,000*	0,000*	0,000*
C: pH	0,173	0.000*	0,000*	0,003*
Interacciones				
AB	0,088	0,017*	0,264	0,000*
AC	0,929	0,213	0,009*	0,152
BC	0,745	0,000*	0,058	0,018*

*Valor p < de 0,05

Ninguno de los siguientes factores: concentración de CMC, panela o pH tuvieron un efecto significativo sobre la masa seca final; no obstante, si hubo un efecto importante ($p < 0,05$) sobre la productividad volumétrica (Tabla 4). Las interacciones entre CMC-panela y el pH-panela también mostraron un efecto significativo sobre la productividad volumétrica (Tabla 4). Se pudo observar que el crecimiento del kéfir de agua en presencia de CMC al 10% a pH 7,0 es similar que cuando la concentración de CMC es 0% (Pvol: $1,04 \pm 0,1$; X_f: $31,34 \pm 3,4$ y Pvol: $1,16 \pm 0,1$; X_f: $34,75 \pm 3,6$) respectivamente para una concentración de panela de 100g/L. Sin embargo, en ausencia de panela, la productividad volumétrica es muy baja en presencia de CMC al 10% (Pvol: $0,04 \pm 0,1$; X_f: $1,21 \pm 1,5$). La panela es un factor importante en la fermentación usando KC; de hecho, este proceso se ve favorecido cuando el pH inicial del medio es de 7, lo que lleva a un incremento de la productividad volumétrica (Tabla 4), debido a la actividad de las glucansacarasas (enzimas extracelulares) producidas por las bacterias ácido lácticas, lo que se refleja en un incremento del exopolisacarido extracelular. [29]

Es de resaltar, que en todas las corridas experimentales, sin importar el valor inicial del pH, la acidificación llega a valores entre $2,96 \pm 0,0$ y $4,07 \pm 0,0$ (Tabla 3); esto se debe a la producción de iones hidronios como consecuencia de los ácidos orgánicos (láctico y acético) producidos por el consorcio [30], existe una relación general: el pH disminuye a medida que aumenta los ácidos presentes [31].



Con relación a los polifenoles totales, se pudo determinar que los tres factores evaluados tuvieron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre los polifenoles totales (Tabla 4); estos variaron entre 23 y 193 mgGAE/100g KC (Tabla 3). La mayor concentración es obtenida en presencia de panela 100g/L y CMC al 10% a un pH de 7,0, con un valor de $193 \pm 3,4$ mgGAE/100g, mientras que en ausencia de CMC a las mismas condiciones, el valor fue menor ($170 \pm 2,5$ mgGAE/100g).

En la Figura 3, se presentan los gráficos de superficie de respuesta para el diseño experimental realizado, dejando como variable fija el pH inicial en un valor de 7,0, para el cual se obtuvo los mayores valores de masa seca, productividad volumétrica y PT.

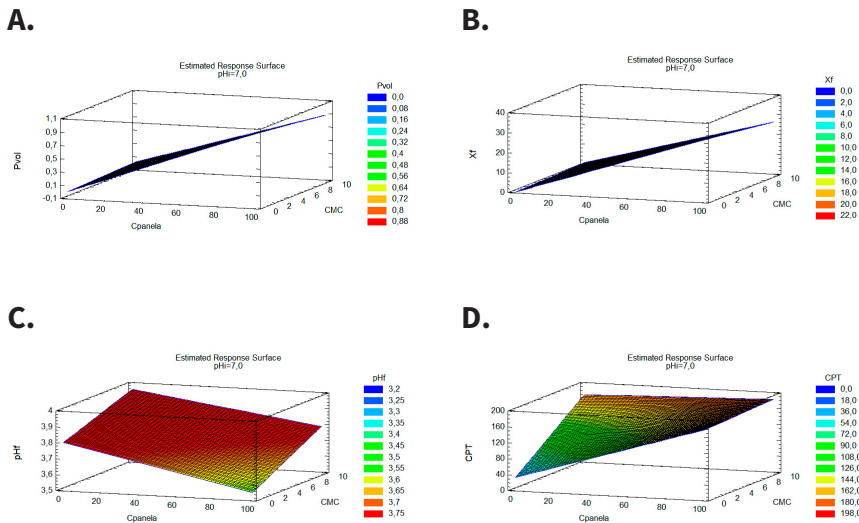


Fig. 3. Superficie de respuesta en función de las variables C_{panela} y CMC para un valor constante de pH_i (7.0). A. Efecto sobre la productividad volumétrica. B. Efecto sobre la biomasa final. C. Efecto sobre el pH final. D. Efecto sobre el contenido de polifenoles totales



El pH final del medio varió entre 3,55 y 3,95 cuando el pH inicial del medio se fijó en 7,0. El menor valor de pH se registró en $3,60 \pm 0,0$, cuando el cultivo estuvo conformado exclusivamente por panela (Figura 3C). Valores de pH alrededor de $3,71 \pm 0,0$, fueron encontrados en presencia de mucílago de café al 10%, debido a los metabolitos secundarios (láctico y acético), producidos durante el proceso de fermentación como resultado de la conversión metabólica de los azúcares (glucosa y fructosa) aportados por la panela y el CMC.

Finalmente, todos estos hallazgos sugieren que la mejor combinación de factores para obtener $187,0 \pm 6,0$ mgGAE/100g de polifenoles totales fue con panela 100g/L y CMC al 10% a un pH de 7,0.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos con otras investigaciones, se puede citar a Gunenc et al. [19] quienes realizaron ensayos empleando kéfir de leche con lentejas germinadas durante 14 días, con el fin de evidenciar su capacidad antioxidante, cuantificando diferentes metabolitos, especialmente contenido fenólico; los autores reportaron que los gránulos de kéfir por sí solos, contaban con $52,2 \pm 2,3$ mgGAE/100g de polifenoles totales; este resultado fue menor al obtenido para el KC en 72 h. De igual manera, los mismos autores reportaron un contenido fenólico de $142,9 \pm 1,0$ mgGAE/100g con lentejas germinadas, el cual también es menor que lo obtenido en nuestro estudio bajo las condiciones de 100 g/L de panela, 10 % de CMC y pH de 7,0.

Villa et al. [32] realizaron un diseño compuesto central rotacional y superficie de respuesta con un consorcio nativo compuesto por hongos y bacterias para fermentar residuos de café y generar hidrógeno, siendo las mejores condiciones operacionales un espacio de cabeza 30%, 7 g/L de residuos y un pH de 7,0, estos resultados son similares a los obtenidos en este estudio con 10 g/L de CMC y un pH de 7,0. Villa et al. también reportó la presencia de microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* sp y *Saccharomyces* sp. Carvalho et al. [6] fermentaron mucílago del café, utilizando un cultivo iniciador de *Lactobacillus plantarum*, los autores encontraron que un pH de 4.0 es la mejor condición para incrementar la



eficiencia del proceso, este valor está dentro del rango de pH encontrado en la fermentación del KC después de tres días de incubación.

4. CONCLUSIONES

El KC es un consorcio conformado por diversos grupos microbianos especialmente, BAL (*Lactobacillus* sp), BAA (*Acetobacter* sp y *Komagataeibacter* sp) y levaduras tipo *Saccharomyces* sp, capaces de metabolizar CMC, subproducto contaminante del beneficio del café, bajo condiciones específicas de operación: 10 g/L de CMC, pH de 7,0, y 100 g/L de Panela.

Los mejores resultados, especialmente de productividad volumétrica se obtuvieron durante el uso de la panela sin CMC (1,16 g secos /L*día), aunque esta no es tan diferente cuando se usa el contaminante (1,04 g secos /L*día). El pH en 3,5 ejerce un marcado efecto negativo sobre el comportamiento de la masa seca de kéfir debido a la alta concentración de iones hidronio en el medio que no permite su viabilidad.

EL CMC no es una fuente de sustrato apropiada para el granulo de kéfir de agua.

El CMC es fermentado por KC; no obstante, la panela como única fuente de carbono tiene una productividad volumétrica más alta que cuando está acompañada del contaminante, aunque el valor biotecnológico de este proyecto es utilizar el CMC en diversos productos aplicables a la agroindustria, ya que posee una cantidad considerable de polifenoles totales que otorgan potencial antioxidante; reduciendo a su vez el impacto negativo en el medio ambiente.

La combinación entre esta metodología biotecnológica junto con otras técnicas podría colaborar con disminuir el impacto negativo que genera el mucilago en el medio ambiente, otorgándole un valor agregado al residuo agroindustrial.



La futura investigación en esta área debe centrarse en la aplicación de CMC como sustitutos de ingredientes alimenticios (emulsionante/estabilizador/antioxidante u otro) para diseñar nutraceúticos con propiedades funcionales.

De igual manera, se propone diseñar una estrategia de adaptación del consorcio kéfir de agua para permitir la selección de poblaciones con alta tolerancia al CMC y así aumentar la concentración de uso de este contaminante. Así mismo, realizar visualizaciones por microscopia SEM para evidenciar el daño celular y monitorear los metabolitos de interés, generados durante la fermentación.

REFERENCIAS

- [1] B. Janissen, and T. Huynh, “Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review,” *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 128, pp. 110–117, 2017, doi: 10.1016/j.resconrec.2017.10.001.
- [2] F. G. Gemechu, “Embracing nutritional qualities, biological activities and technological properties of coffee byproducts in functional food formulation,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 104, pp. 235–261, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.005>.
- [3] N. S. M. Said, S. B. Kurniawan, S. R. S. Abdullah, H. A. Hasan, A. R. Othman, and N. 'Izzati Ismail, “Competence of *Lepironia articulata* in eradicating chemical oxygen demand and ammoniacal nitrogen in coffee processing mill effluent and its potential as green straw,” *The Science of the Total Environment.*, vol. 799, p. 149315, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149315>.
- [4] A. J. A, V. M., T. selvi C., B. Ravindran, W. J. Chung, and S. W. Chang, “Treatment of coffee cherry pulping wastewater by using lectin protein isolated from *Ricinus communis* L. seed,” *Journal of Water Process Engineering*, vol. 39, p. 101742, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101742>.



- [5] J. F. Pires, D. C. Viana, R. A. Braga JR, R. F. Schwan, and C. F. Silva, "Protocol to select efficient microorganisms to treat coffee wastewater," *Journal of Environmental Management*, vol. 278, p. 111541, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111541>.
- [6] D. P. de Carvalho Neto, G. Melo, A. M. Finco, L. Letti, B. J. da Silva, L. P. Vandenberghe, and C. R. Soccol, "Efficient coffee beans mucilage layer removal using lactic acid fermentation in a stirred-tank bioreactor: Kinetic, metabolic and sensorial studies," *Food Bioscience*, vol. 26, pp. 80–87, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.005>.
- [7] J. Ramírez, A; López, "Method for Obtaining Coffee Honey from the Pulp or Husks and The Mucilage of the Coffee Bean," EP 2792245 B1, 2018.
- [8] G. V de Melo Pereira, A. da Silva Vale, D. P. de Carvalho Neto, E. S. M. Muynarsk, V. T. Soccol, and C. R. Soccol, "Lactic acid bacteria: what coffee industry should know?," *Current Opinion in Food Science*, vol. 31, pp. 1–8, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.004>.
- [9] J. Stadie, A. Gulitz, M. A. Ehrmann, and R. F. Vogel, "Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir," *Food Microbiology*, vol. 35, n°. 2, pp. 92–98, 2013, doi: [10.1016/j.fm.2013.03.009](https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.009).
- [10] M. Verce, L. De Vuyst, and S. Weckx, "The metagenome-assembled genome of *Candidatus Oenococcus aquikefiri* from water kefir represents the species *Oenococcus siceræ*," *Food Microbiology*, vol. 88, p. 103402, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103402>.
- [11] L. Fels, F. Jakob, R. F. Vogel, and D. Wefers, "Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir," *Carbohydrate Polymers*, vol. 189, pp. 296–303, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>.



- [12] C. A. Caro Vélez, and Á. M. León Pelaéz, “Fungal growth inhibition of *Aspergillus ochraceus* with ‘Panela’ fermented with water kefir grains,” *Vitae*, vol. 21, n°. 3, pp. 191–200, 2014, [Online]. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_art-text&pid=S0121-40042014000300004&lang=pt.
- [13] S. R. Abbas, S. M. Sabir, S. D. Ahmad, A. A. Boligon, and M. L. Athayde, “Phenolic profile, antioxidant potential and DNA damage protecting activity of sugarcane (*Saccharum officinarum*),” *Food Chemistry*, vol. 147, pp. 10–16, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.113>.
- [14] Z. Zhao, H. Yan, R. Zhen, M. Saeed, X. Fu, Z. Tao, and Z. Zhang, “Anthocyanins characterization and antioxidant activities of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rind extracts,” *Industrial Crops and Products*, vol. 113, pp. 38–45, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.015>.
- [15] N. P. Rodrigues, B. Brochier, J. K. de Medeiros, L. D. F. Marczak, and G. D. Mercali, “Phenolic profile of sugarcane juice: Effects of harvest season and processing by ohmic heating and ultrasound,” *Food Chemistry*, vol. 347, p. 129058, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129058>
- [16] D. P. Herlemann, M. Labrenz, K. Jürgens, S. Bertilsson, J. J. Waniek, and A. F. Andersson, “Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea,” *The ISME Journal*, vol. 5, n°. 10, pp. 1571–1579, 2011, doi: [10.1038/ismej.2011.41](https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41).
- [17] P. D. Schloss, S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. van Horn, and C. F. Weber, “Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, n°. 23, pp. 7537 LP – 7541, 2009, doi: [10.1128/AEM.01541-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09).



- [18] V. Singleton, and J. Rossi, "Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents," *American Journal of Enology Viticulture*, vol. 16, pp. 144–158, 1965.
- [19] A. Gunenc, M. H. Yeung, C. Lavergne, J. Bertinato, and F. Hosseinian, "Enhancements of antioxidant activity and mineral solubility of germinated wrinkled lentils during fermentation in kefir," *Journal of Functional Foods*, vol. 32, pp. 72–79, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.016>.
- [20] D. Xu, J. Bechtner, J. Behr, L. Eisenbach, A. J. Geißler, and R. F. Vogel, "Lifestyle of *Lactobacillus hordei* isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization," *International Journal Food Microbiology*, vol. 290, pp. 141–149, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.004>.
- [21] C. García, M. Rendueles, and M. Díaz, "Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review," *Food Research International*, vol. 119, pp. 207–220, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.043>.
- [22] A. J. Marsh, O. O'Sullivan, C. Hill, R. P. Ross, and P. D. Cotter, "Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 348, n° 1, pp. 79–85, 2013, doi: [10.1111/1574-6968.12248](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12248).
- [23] U. Nalbantoglu, A. Cakar, H. Dogan, N. Abaci, D. Ustek, K. Sayood, and H. Can, "Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains," *Food Microbiology*, vol. 41, pp. 42–51, 2014, doi: [10.1016/j.fm.2014.01.014](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.014).
- [24] C. Tu, F. Azi, J. Huang, X. Xu, G. Xing, and M. Dong, "Quality and metagenomic evaluation of a novel functional beverage produced from soy whey using water kefir grains," *LWT*, vol. 113, p. 108258, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108258>.
- [25] H. Wang, C. Wang, and M. Guo, "Autogenic successions of bacteria and fungi in kefir grains from different origins when sub-cultured in goat milk," *Food Research International*, vol. 138, p. 109784, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109784>.



- [26] S. Chakraborty, S. Ganguli, A. Chowdhury, M. Ibba, and R. Banerjee, "Reversible inactivation of yeast mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase under oxidative stress," *Biochimica Biophysica et Acta (BBA) - General Subjects.*, vol. 1862, n°. 8, pp. 1801–1809, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.023>.
- [27] A. de A. Câmara, P.-A. Maréchal, R. Tourdot-Maréchal, and F. Husson, "Oxidative stress resistance during dehydration of three non-Saccharomyces wine yeast strains," *Food Research International*, vol. 123, pp. 364–372, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.059>.
- [28] S. Pardo-Díaz, D. Rojas-Tapias, F. Roldan, P. Brandão, y E. Almansa-Manrique, "Biodegradación de fenol en aguas tratadas de la industria petrolera para re-uso en cultivos agrícolas," *Revista de Biología Tropical*, vol. 65, n°. 2, pp. 685–699, Oct. 2017, [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44950834021>.
- [29] D. Laureys, M. Aerts, P. Vandamme, and L. De Vuyst, "The Buffer Capacity and Calcium Concentration of Water Influence the Microbial Species Diversity, Grain Growth, and Metabolite Production During Water Kefir Fermentation.," *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, p. 2876, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.02876.
- [30] Z. B. Guzel-Seydim, Ç. Gökırmaklı, and A. K. Greene, "A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 113, pp. 42–53, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>.
- [31] A. L. Ntsame Affane, G. P. Fox, G. O. Sigge, M. Manley, and T. J. Britz, "Simultaneous prediction of acidity parameters (pH and titratable acidity) in Kefir using near infrared reflectance spectroscopy," *International Dairy Journal*, vol. 21, n°. 11, pp. 896–900, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.04.016>.
- [32] A. C. Villa Montoya, R. Mazareli, T. Delforno, V. B. Centurion, V. de Oliveira, E. Silva, and M. Varesche, "Optimization of key factors affecting hydrogen production from coffee waste using factorial design and metagenomic analysis of the microbial community," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 45, n°. 7, pp. 4205–4222, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.062>.



Este libro se terminó de imprimir en los talleres
de Divegráficas S. A. S.
Cra. 50 # 35-62 Medellín, Antioquia
Tel: 322 50 96

La Facultad de Ingeniería y los grupos de investigación GITIMA e INTEGRA del Tecnológico de Antioquia – Institución Universitaria, conscientes de las múltiples herramientas y prácticas implementadas por diferentes investigadores en torno a la sostenibilidad, y trabajadas desde las ciencias ambientales y agrícolas, compilan resultados de investigaciones de la comunidad académica del país, exponiendo diferentes enfoques y metodologías, a través de la edición del libro denominado: *Prácticas y herramientas para la sostenibilidad como aportes a las ciencias ambientales y agrícolas*.

