



**FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA EN MEDIOAMBIENTE
INGENIERÍA AMBIENTAL**

**EXTRACCIÓN DE NUTRIENTES DESDE CENIZAS DE
MADERA PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS
FOTOSINTÉTICOS CON FINES DE RESTAURACIÓN DE
SUELOS**

**TRABAJO DE TÍTULACIÓN PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL**

Autor: Álvaro Felipe Armando Zúñiga Orozco

Profesor Guía: Daniel Undurraga Peralta

Valparaíso, Chile

2023

RESUMEN

Los incendios forestales significan un retroceso sustancial en la sucesión ecológica de un ecosistema, debido a que la destrucción de la cobertura vegetal implica una exposición del suelo a procesos erosivos que amenazan su permanencia. Por ello se hacen necesarias estrategias para la recuperación de suelos como lo es la inoculación de cianobacterias fijadoras de nitrógeno en suelos degradados, dado que han demostrado su eficacia a largo plazo. Por otro lado, las cenizas de madera constituyen un residuo que se genera a gran escala y es descartado en su gran mayoría. Sin embargo, considerando su composición química contienen cantidades interesantes de micronutrientes, lo que transforma a este residuo en un candidato idóneo para ser aprovechado en el cultivo de cianobacterias.

Con este trabajo se pretende evaluar estrategias de extracción de nutrientes desde cenizas de madera para la elaboración de medios de cultivo para cianobacterias fijadoras de nitrógeno. A tal efecto se ideó un procedimiento de extracción que constó de dos etapas: una acuosa (solo agua destilada) y otra ácida (usando una solución de HCl) donde se midieron los niveles de extracción de iones a distintas dosis de ácido/ceniza (meq H⁺/g ceniza) y tiempos de extracción. Posteriormente se diseñó un medio de cultivo considerando las concentraciones de nutrientes obtenidas en los extractos y la composición elemental de *Anabaena cylindrica*. Este medio de cultivo fue utilizado para el crecimiento de cianobacterias en un fotobiorreactor de placa angosta de 5 cm de recorrido de luz y una irradiancia de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (con ciclos de luz-oscuridad de 12:12) a temperatura promedio de 22°C. El cultivo de las cianobacterias se monitoreó midiendo su concentración, y rendimiento cuántico del fotosistema II (QY) en el tiempo como parámetro de su capacidad fotosintética.

(En la etapa de extracción) se lograron rendimientos máximos de extracción de ion fosfato de 3,5% a condiciones de 17,5 meq H⁺/g de ceniza y 1 minuto de reacción. Esto permitió diseñar un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de las cianobacterias (remarcar que se utilizó solo extracto). Ello se evidenció con el aumento sostenido de la biomasa en el tiempo, en donde se obtuvo una cinética de crecimiento lineal con una tasa de crecimiento de 0,336 g/día, el cual es comparable al crecimiento obtenido con medios de cultivo definidos, logrando un incremento en la biomasa de 7,07 gramos en 6 litros de cultivo a lo largo de 16 días. Además, el rendimiento cuántico del PS II se mantuvo estable, con valores de entre 0,40 y 0,47 muy similares a un cultivo con medio definido (y a obtenidos por otros autores con el mismo género de cianobacteria) (evidenciando un buen funcionamiento del aparato fotosintético con este medio de cultivo diseñado).

Lo anterior demostró que mediante el tratamiento de las cenizas de madera con extracciones sucesivas de fase ácida y acuosa en ciertas condiciones es posible extraer los nutrientes necesarios para el cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno a escala de laboratorio, lo cual entrega fundamentos para la producción en masa de cianobacterias a partir de este residuo.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Incendios forestales	7
1.1.1. Impactos asociados a los incendios forestales.....	8
1.2. Cianobacterias.....	8
1.2.1. <i>Anabaena cylindrica</i>	9
1.3. Cultivo de cianobacterias	9
1.3.1. Parámetros de diseño y construcción de fotobiorreactores.....	10
1.4. Cenizas de madera	11
2. PROBLEMA	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo General	14
3.2. Objetivos Específicos.....	14
4. METODOLOGÍA	15
4.1. Objetivo 1 - Etapa 1: Evaluar la extracción de nutrientes de interés desde las cenizas de madera mediante la solubilización acuosa y ácida	15
4.1.1. Actividad 1.1: Determinación de la relación líquido/sólido.....	15
4.1.2. Actividad 1.2: Ensayo de agitación mecánica por 24 horas (2,5 y 10 meq H+/g).	15
4.1.3. Actividad 1.3: Evaluación de la cinética de extracción ácida (2,5 y 17,5 meq H+/g).	17
4.1.4. Actividad 1.4: Ensayo de extracción ácida por 1 minuto (2,5 y 17,5 meq H+/g).	18
4.2. Objetivo 2 - Etapa 2: Diseñar medios de cultivo para cianobacterias a partir de los componentes solubles de las cenizas de madera.	18
4.2.1. Actividad 2.1: Diseño del medio de cultivo.....	18
4.3. Objetivo 3 - Etapa 3: Evaluar la efectividad de los medios de cultivo en el crecimiento de cianobacterias	20

4.3.1.	Actividad 3.1: Cultivo de cianobacterias.	20
4.3.1.1.	Arranque del cultivo de cianobacterias.....	20
4.3.1.2.	Medición de biomasa seca del inóculo	21
4.3.2.	Actividad 3.2: Monitoreo y seguimiento del fotobiorreactor.....	21
4.3.2.1.	Curva de calibrado de concentración del cultivo	21
4.3.2.2.	Seguimiento de la concentración y rendimiento cuántico (QY) del cultivo.....	22
5.	RESULTADOS	23
5.1.	Objetivo 1 - Etapa 1: Evaluar la extracción de nutrientes de interés desde las cenizas de madera mediante la solubilización acuosa y ácida	23
5.1.1.	Actividad 1.1: Determinación de la relación líquido/sólido.....	23
5.1.2.	Actividad 1.2: Ensayo de agitación mecánica de 24 horas.....	24
5.1.2.1.	Extracción acuosa a 50 L/kg.	24
5.1.2.2.	Extracción ácida a 2,5 y 10 meq H ⁺ /g.	25
5.1.3.	Actividad 1.3: Evaluación de la cinética de extracción ácida.	26
5.1.3.1.	Extracción acuosa de 1 hora.....	27
5.1.3.2.	Extracción ácida a 2,5 y 17,5 meq H ⁺ /g.	28
5.1.4.	Actividad 1.4: Ensayo de extracción por 1 minuto (2,5 y 17,5 meq H ⁺ /g).....	34
5.2.	Objetivo 2 - Etapa 2: Diseñar medios de cultivo para cianobacterias a partir de los componentes solubles de las cenizas de madera.	35
5.2.1.	Actividad 2.1: Diseño del medio de cultivo.....	35
5.2.1.1.	Seguimiento del extracto ácido.....	36
5.3.	Objetivo 3 - Etapa 3: Evaluar la efectividad de los medios de cultivo en el crecimiento de cianobacterias	37
5.3.1.	Actividad 3.1: Cultivo de cianobacterias.	37
5.3.2.	Actividad 3.2: Monitoreo y seguimiento del fotobiorreactor.....	38
5.3.2.1.	Biomasa y velocidad de crecimiento.....	38

5.3.2.2.	Parámetros fotosintéticos	43
6.	DISCUSIÓN.....	44
7.	CONCLUSIÓN.....	48
8.	ANEXO	49
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Número de incendios y superficie afectada por incendios forestales desde 1984 en Chile. (Datos obtenidos de https://www.conaf.cl).	7
Figura 5.1: Rendimiento de extracción de sólidos disueltos a distintas proporciones de líquido/sólido.	23
Figura 5.2: Rendimiento de extracción acuosa a 50 L/kg por 24 horas.	24
Figura 5.3: Cinética de extracción ácida de sólidos disueltos a 2,5 meq H ⁺ /g por 24 horas.	25
Figura 5.4: Cinética de extracción ácida de sólidos disueltos a 10 meq H ⁺ /g por 24 horas.	26
Figura 5.5: Rendimiento de extracción acuosa a 50 L/kg por 1 hora.	28
Figura 5.6: Variación del pH en el tiempo a 2,5 y 17,5 meq H ⁺ /g de ceniza por 60 minutos.	28
Figura 5.7: Cinética de extracción de ion potasio a 2,5 y 17,5 meq H ⁺ /g de ceniza por 60 minutos. ...	29
Figura 5.8: Cinética de extracción de ion magnesio a 2,5 y 17,5 meq H ⁺ /g de ceniza por 60 minutos. ...	30
Figura 5.9: Cinética de extracción de ion calcio a 2,5 y 17,5 meq H ⁺ /g de ceniza por 60 minutos.	31
Figura 5.10: Cinética de extracción de ion sulfato a 2,5 y 17,5 meq H ⁺ /g de ceniza por 60 minutos. ...	32
Figura 5.11: Cinética de extracción de ion fosfato a 2,5 y 17,5 meq H ⁺ /g de ceniza por 60 minutos. ...	33
Figura 5.12: Cinética de extracción de sólidos disueltos a 2,5 y 17,5 meq H ⁺ /g de ceniza por 60 minutos.	34
Figura 5.13: Curva de calibrado de concentración de cianobacterias.	37
Figura 5.14: Fotobiorreactor inoculado (Día 3 de cultivo).	38
Figura 5.15: Masa total de cianobacterias en cultivo realizado con extractos de ceniza en el tiempo. ...	39
Figura 5.16: Masa total de cianobacterias en cultivo realizado con extractos de ceniza desde el día 6 de cultivo.	40
Figura 5.17: Masa total de cianobacterias en cultivo realizado con medio Arnon en el tiempo.	41
Figura 5.18: Cinética de crecimiento de <i>Anabaena cylindrica</i> en fotobiorreactor operado en modalidad semicontinua realizado con extractos de ceniza.	42
Figura 5.19: Rendimiento cuántico (QY) de cultivo realizado con extractos de ceniza en el tiempo. ...	43
Figura 8.1: Curva de calibrado de concentración de ion calcio.	49
Figura 8.2: Curva de calibrado de concentración de ion magnesio.	49
Figura 8.3: Curva de calibrado de concentración de ion potasio.	50
Figura 8.4: Curva de calibrado de concentración de ion sulfato.	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Composición elemental de <i>Anabaena cylindrica</i> . (datos obtenidos de análisis de laboratorio solicitado a Universidad de Concepción)	9
Tabla 1.2: Composición de medio de cultivo estándar BG-11. (Adaptado de https://utex.org/).....	10
Tabla 1.3: Composición elemental de cenizas de madera en mg/kg. (Adaptado de Maresca et al., 2017)	12
Tabla 4.1: Equipos y métodos utilizados para la medición de parámetros.	16
Tabla 4.2: Descripción del cultivo de cianobacterias.	20
Tabla 5.1: Parámetros de extracto acuoso a 50 L/kg por 24 horas.....	24
Tabla 5.2: Parámetros de extracto acuoso a 50 L/kg por 1 hora.	27
Tabla 5.3: Parámetros de extracción ácida a 2,5 y 17,5 meq H ⁺ /g.....	34
Tabla 5.4: Composición de los extractos de ceniza.....	35
Tabla 5.5: Volumen de extracto necesario para la demanda de nutrientes.....	36
Tabla 5.6: Parámetros y concentración de iones del medio de cultivo diseñado.....	36
Tabla 5.7: Seguimiento de extracto ácido 17,5 meq H ⁺ /g.....	37
Tabla 5.8.: Condiciones iniciales y finales del cultivo.....	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Incendios forestales

Los incendios forestales son un tipo de fuego que se propaga sin control en terrenos generalmente rurales con abundante vegetación leñosa, pastizales y matorral (Corporación Nacional Forestal CONAF, 2022). La causa de estos incendios es en gran mayoría de origen humano (99,7%) predominando el carácter accidental por sobre el intencional (González et al., 2020). El resto es provocado de forma natural mediante rayos.

Los incendios forestales en Chile han ido aumentando desde que se tiene registro (Ver Figura 1.1), habiendo para el año 1984 un promedio de 5.300 eventos de incendio al año, cifra que ha llegado hasta aproximadamente 7.400 eventos anuales en el período 2015-2019, llegando a afectar más de 160 mil hectáreas al año (más del doble que en el año 1984). Esta tendencia se ve respaldada por el gradual aumento de temperaturas y la reducción de las precipitaciones.

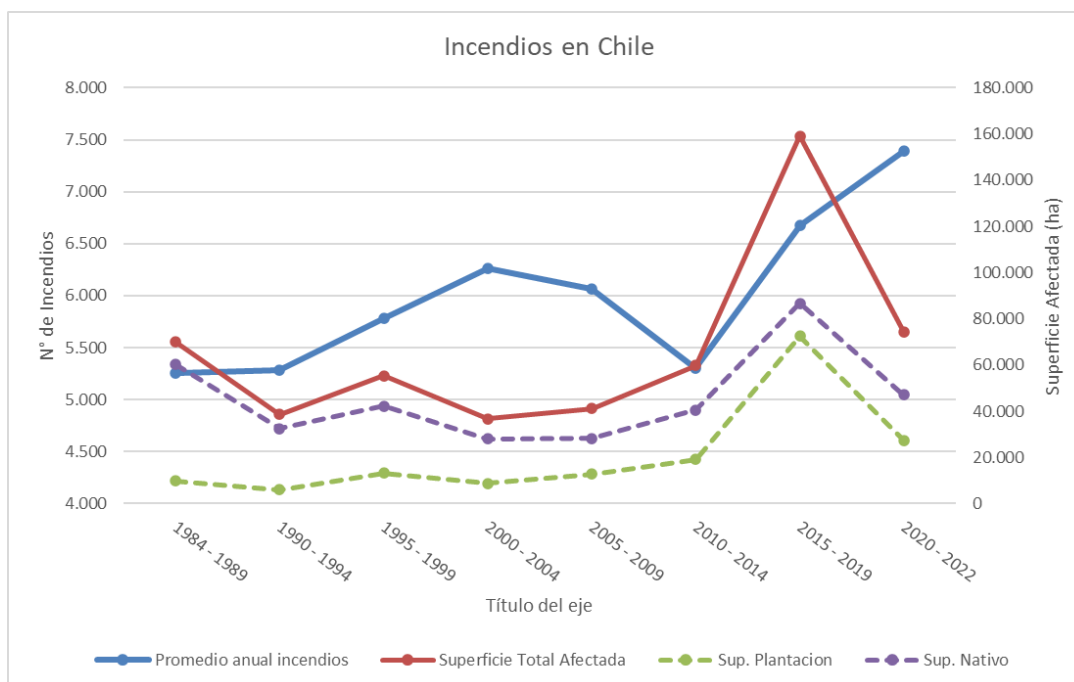


Figura 1.1: Número de incendios y superficie afectada por incendios forestales desde 1984 en Chile. (Datos obtenidos de <https://www.conaf.cl>).

1.1.1. Impactos asociados a los incendios forestales

Según el informe “Incendios en Chile: causas, impactos y resiliencia” elaborado por González et al. (2020), los incendios forestales involucran una serie de impactos, como lo son:

- **Emisiones:** Provocan la emisión de gases de efecto invernadero que no son despreciables, por ejemplo, los mega incendios del año 2017 generaron más de 100 millones de toneladas de CO₂ equivalente, lo que representa el 90% de las emisiones de CO₂ del año 2016 (transporte, energía, agricultura y residuos).
- **Impacto Económico:** Involucran costos de madera perdida, combate del incendio, pérdida de propiedades, reconstrucción de viviendas y apoyo a sectores productivos. Así como también la pérdida de bienestar de las personas producto del cambio en la provisión de servicios ecosistémicos.
- **Impacto en la Biodiversidad y suelos:** También producen impactos en la biodiversidad, destruyendo la cobertura vegetal lo que da paso a la fragmentación de ecosistemas amenazando la permanencia de especies, así como también la permanencia del suelo.

1.2. Cianobacterias

Las cianofíceas (Ciano, sufijo procedente del griego “kyanos” el cual significa “azul oscuro” dado su color verdeazulado) son un filo de organismos procariontes fotoautótrofos que, a diferencia de otras bacterias, presentan membranas internas que alojan ciertas estructuras como tilacoides que le permiten captar la luz solar y carboxisomas que le permiten fijar el dióxido de carbono de la atmósfera como fuente de carbono. Marcaron un antes y un después en la evolución de la vida transformando una atmósfera ausente de oxígeno en una atmósfera con oxígeno, siendo responsables actualmente junto a las microalgas de más del 50% del oxígeno liberado a la atmósfera (Rodríguez, 2023).

Estos microorganismos son capaces de establecerse en casi todo tipo de ecosistemas dado que sus necesidades metabólicas son sencillas, es decir, solo necesitan de cinco componentes para desarrollarse: Luz solar, agua, dióxido de carbono, nitrógeno atmosférico y algunos micronutrientes como el magnesio y fósforo. Asimismo, la inoculación de las cianobacterias en suelos degradados ha

demostrado mejorar sus propiedades en varios aspectos; mediante la secreción de polisacáridos que forman biopelículas que afectan la infiltración, la retención y la evaporación del agua a través de la agregación de partículas de suelo (Rossi et al., 2017), además de que se ha demostrado que incrementa la materia orgánica, nitrógeno y fósforo (Wang et al., 2009).

1.2.1. *Anabaena cylindrica*.

Es una especie de cianobacteria heterocística filamentosa, se agrupa en filamentos de células vegetativas (encargadas de la captación de CO₂) intercaladas de células diferenciadas denominadas “heterocistos” especializadas en la captación de nitrógeno molecular atmosférico o disuelto en agua dada la presencia de la enzima nitrogenasa. Se desarrollan en agua dulce y en suelos formando tapetes microbianos.

Tabla 1.1: Composición elemental de *Anabaena cylindrica*. (datos obtenidos de análisis de laboratorio solicitado a Universidad de Concepción)

Elemento	% p/p
C	40,86
H	6,6
O	38,7602
N	8,5
K	0,72
Ca	1,3949
Mg	0,5131
Na	0,2042
P	2,4476

1.3. Cultivo de cianobacterias

Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno, dentro de los cuatro elementos para su crecimiento se incluyen los micronutrientes, los cuales deben estar presentes en los medios de cultivo en distintas proporciones. Existen muchas preparaciones de medios de cultivos para crecimiento y mantenimiento

de cianobacterias y microalgas en laboratorio. Las consideraciones más importantes para formularlas son:

- La concentración total de sales
- Composición y concentración de componentes iónicos mayoritarios como el potasio, magnesio, sodio, calcio, sulfato y fosfato.
- La fuente de carbono, la cual puede ser a través de dióxido de carbono gaseoso o bicarbonatos.
- Elementos traza.

Según las investigaciones de Cahuasquí et al. (2013) y Martigani (2012), la producción de biomasa de cianobacterias fijadoras de nitrógeno se da muy bien en medios de cultivo estándar BG-11, cuya composición sirve de referencia para el diseño de medios de cultivo dado que ofrece los elementos necesarios y en proporción adecuada para su crecimiento.

Tabla 1.2: Composición de medio de cultivo estándar BG-11. (Adaptado de <https://utex.org/>).

Componente	Concentración mg/L
NaNO ₃	1495,9
K ₂ HPO ₄	40,1
MgSO ₄ •7H ₂ O	74,0
CaCl ₂ •2H ₂ O	35,3
Ácido cítrico•H ₂ O	6,5
Citrato férrico de amonio	5,5
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	1,0
Na ₂ CO ₃	20,1
Elementos Traza	1 mL/L

1.3.1. Parámetros de diseño y construcción de fotobiorreactores

Para cultivar cianobacterias se debe tener en cuenta ciertos elementos como:

- **Modalidad de operación:** Si se va a realizar por lotes, de forma continua o semicontinua.

- **Diseño adecuado del reactor:** Debe ser transparente, con una geometría tal que permita la llegada de luz a todo el reactor, ya que de lo contrario podría generar muerte de las células y descomposición.
- **Control de Irradiancia solar:** Es una necesidad básica de las células fotosintéticas, si la cantidad de luz es insuficiente, disminuye la velocidad de crecimiento, sin embargo, una sobreexposición con alta intensidad y por largos períodos de luz puede provocar una fotoinhibición, donde los fotosistemas del microorganismo sufren daños. Por lo mismo se debe respetar el fotoperíodo de las cianobacterias ya que la fotosíntesis conlleva reacciones en fase luminosa y oscura.
- **Temperatura:** Por lo general se cultiva a temperatura ambiente, aunque los óptimos se encuentran entre los 25°C y 35°C.
- **Tasa de actualización del medio de cultivo:** Referido a la actualización constante de los niveles de dióxido de carbono y oxígeno del medio de cultivo mediante la incorporación de dióxido de carbono y la extracción del oxígeno producido, lo cual se puede realizar de forma continua mediante la inyección de aire o de forma intermitente.

1.4. Cenizas de madera

Las cenizas son producto de la combustión de biomasa y existen de dos tipos, ceniza de fondo y ceniza volante. Las cenizas de fondo son partículas de gran tamaño formadas por una combustión incompleta mientras que las cenizas volantes son aquellas partículas finas que fácilmente se suspenden en el aire. Estas son las que se producen en las termoeléctricas en grandes cantidades. Por otro lado, las cenizas de madera son clasificadas como cenizas mixtas dado que presenta cenizas de ambos tipos.

Dentro de la composición general de las cenizas, los elementos más abundantes son el Ca, K y Si seguido de Mg, P, Na, Fe, Mn y S. Como se indica a continuación (

Tabla 1.3), según literatura revisada por Maresca et al. (2017), algunos de los elementos presentes en las cenizas generadas en hornos de combustión tipo parrilla varían en su composición dependiendo del tipo de ceniza, además se puede observar presencia de contaminantes como el As, Cd, Cr y Ni.

Tabla 1.3: Composición elemental de cenizas de madera en mg/kg. (Adaptado de Maresca et al., 2017)

Elemento	Composición según cenizas (mg/kg)		
	Cenizas de fondo	Cenizas volantes	Cenizas mixtas
Ca	130.000 - 300.000	120.000 – 280.000	24.000 - 340.000
Cu	69 - 200	140 - 1.100	78 - 440
Fe	6.000 - 26.000	1.500 - 59.000	1.600 - 25.000
K	40,000 - 47.000	50.000 - 160.000	25.000 - 250.000
Mg	12.000 - 44.000	20.000 - 50.000	16.000 - 80.000
N	150	2.500–2.500	600 - 5.000
Na	4.800 - 12.000	3.100 - 8.300	500 - 37.000
P	7.200 - 22.000	4.300 - 20.000	3.200 - 21.000
S	270 - 2.400	5.800 - 25.000	1.300 - 52.000
Si	120.000 - 250.000	11.000 - 82.000	17.000 - 260.000
Metales traza			
As	1.4	1.5 - 24	0.09 - 74
Cd	<0.2 - 5.7	5.1 - 34	<2 - 31
Cr	64 - 320	32 - 290	14 - 260
Ni	22 - 200	19 - 74	12 - 500
Pb	4 - 40	25 - 470	13 - 130

Los niveles de nitrógeno en la ceniza de madera son muy bajos, esto constituye una ventaja para ser utilizados en el cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, al no ser un elemento limitante en su crecimiento, es decir, la generación de medios de cultivo sin nitrógeno impediría la contaminación con cianobacterias no fijadoras de nitrógeno.

Respecto a los usos que se les da a las cenizas volantes se encuentra la industria de la construcción para la elaboración de hormigón, así como también se aplica en agricultura para mejorar los niveles de nutrientes en los suelos agrícolas.

2. PROBLEMA

La generación de cenizas de madera en nuestro país es producida principalmente por las plantas de producción de energía por combustión de biomasa pertenecientes a empresas celulósicas, las cuales aprovechan los residuos de madera de sus procesos para generar energía. Al año, las dos empresas de celulosa más grandes del país producen alrededor de 250 mil toneladas de ceniza de biomasa, de las cuales menos del 16% es valorizada y el resto es enviado a depósitos de residuos sólidos (Pinto, 2019), situación que insta a buscar alternativas de aprovechamiento de cenizas.

Por otro lado, se ha visto que dentro de la composición de las cenizas de madera se encuentran elementos que constituyen nutrientes esenciales para los microorganismos, tales como magnesio, fosfato, potasio, calcio, sulfato, entre otros. Por lo que el aprovechamiento de sus nutrientes puede ser una alternativa en cultivos de cianobacterias fijadoras de nitrógeno que, a su vez, se caracterizan por sus necesidades metabólicas sencillas y sus propiedades mejoradoras de suelo

Este escenario constituye una oportunidad para evaluar estrategias de extracción de nutrientes a partir de las cenizas de madera con el fin de ser utilizados para generar biomasa de cianobacterias, las cuales dentro de sus usos se encuentra la biofertilización de suelos degradados por incendios. De esta forma se les daría un nuevo uso a las cenizas de madera, favoreciendo la economía circular y, por otro lado, contribuyendo a la restauración de suelos degradados por incendios que, cada vez se hacen más abundantes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Evaluar estrategias de extracción de nutrientes a partir de cenizas de madera para la elaboración de medios de cultivo para cianobacterias fijadoras de nitrógeno

3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la extracción de nutrientes de interés desde las cenizas de madera mediante la solubilización acuosa y ácida
- Elaborar medios de cultivo para cianobacterias a partir de los componentes solubles de las cenizas de madera
- Evaluar la efectividad de los medios de cultivo elaborados en el crecimiento de cianobacterias

4. METODOLOGÍA

4.1. Objetivo 1 - Etapa 1: Evaluar la extracción de nutrientes de interés desde las cenizas de madera mediante la solubilización acuosa y ácida

Esta etapa consistió en someter las cenizas de madera a un proceso de extracción de iones mediante la solubilización en dos fases; una acuosa con agua destilada seguida por una solubilización ácida con una solución de ácido clorhídrico, para cumplir con esto se realizaron las siguientes actividades.

4.1.1. Actividad 1.1: Determinación de la relación líquido/sólido.

Con el fin de determinar una relación líquido/sólido óptima para la extracción de componentes solubles de las cenizas, se probaron distintas proporciones de agua destilada y masa de ceniza. Para lo cual, se mezclaron 500 mL de agua destilada con una cierta masa de ceniza en un vaso precipitado de 1000 mL. Se mezcló con un agitador mecánico por 24 horas para posteriormente filtrar la mezcla y someter la solución resultante a una medición de los sólidos disueltos mediante peso seco. Este procedimiento se repitió para distintas cantidades de ceniza con el propósito de evaluar diferentes relaciones líquido/sólido de 50, 25, 10 y 2 L/kg, para lo cual se utilizaron 10, 20, 50 y 250 gramos de ceniza respectivamente.

Posteriormente se calculó el rendimiento de extracción de sólidos disueltos utilizando la ecuación n°1.

4.1.2. Actividad 1.2: Ensayo de agitación mecánica por 24 horas (2,5 y 10 meq H⁺/g).

Con base en los ensayos preliminares, y en evidencia obtenida por Maresca (2017), se determinó una relación líquido/sólido de 50 L/kg y una relación ácido/ceniza de 10 meq H⁺/g con el fin de disminuir el pH resultante hasta un valor inferior a 5,5.

Se preparó la extracción acuosa del ensayo vertiendo una muestra de 20 gramos de cenizas a 1 litro de agua destilada en un vaso precipitado de 1 litro para ser agitado utilizando un agitador magnético por 24 horas, una vez terminado el tiempo de agitación se dejó decantar los sólidos y se procedió a filtrar el sobrenadante utilizando una bomba de vacío para luego reservar el filtrado en botellas de plástico. El sobrenadante obtenido fue sometido a una medición por triplicado de pH, concentración de iones (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , SO_4^{2-} y PO_4^{3-}) y sólidos totales disueltos por peso seco. La extracción acuosa se realizó en duplicado para someter las cenizas remanentes a dos soluciones ácidas distintas que se detallan a continuación.

Luego, se prepararon dos soluciones ácidas; 1 litro de HCl 0,05 M y 1 litro de HCl 0,2 M (las cuales representan la relación de 2,5 y 10 meq H+/g, respectivamente) y se vertieron en vasos separados con las cenizas remanentes de la extracción acuosa para ser agitados por 24 horas. Para cada vaso se retiraron muestras de 15 mL en tres instantes: a los 30 minutos, 60 minutos y 24 horas cada una de las cuales se centrifugó y se retiró el sobrenadante para ser sometido a mediciones por triplicado de pH, concentración de iones (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , SO_4^{2-} y PO_4^{3-}) y sólidos totales disueltos por peso seco. Se calculó el rendimiento de extracción (en porcentaje) para cada ion con la siguiente ecuación.

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = \frac{\text{masa de compuesto (g)}}{\text{masa de ceniza inicial (g)}} * 100 \quad (1)$$

Tabla 4.1: Equipos y métodos utilizados para la medición de parámetros.

Parámetro	Método	Equipo (Nombre/Marca/Modelo)
pH	Medición directa	Oakton pH 510 Series
Conductividad Eléctrica	Medición directa	Tester de pH / TDS / Conductividad (Rango Alto) / Hanna / HI98130
Ca^{2+}	Titulación con EDTA	N/A
Mg^{2+}	Manual Hanna - HI801 / Absorbancia a 530 nm	Espectrofotómetro UV-Vis / JENWAY / 6705
SO_4^{2-}	Manual Hanna - HI801 / Absorbancia a 466 nm	Espectrofotómetro UV-Vis / JENWAY / 6705
K^+	Manual Hanna - HI801 / Absorbancia a 466 nm	Espectrofotómetro UV-Vis / JENWAY / 6705
PO_4^{3-}	Manual Hanna - HI801 / Absorbancia a 466 nm	Fotómetro Multiparámetro / Hanna / HI 83209
Sólidos disueltos totales	Peso seco	Estufa a 105°C

Una vez terminado el ensayo se filtró la mezcla y se reservaron los extractos ácidos en botellas de plástico.

4.1.3. Actividad 1.3: Evaluación de la cinética de extracción ácida (2,5 y 17,5 meq H⁺/g).

Se procedió a realizar otro ensayo de extracción guardando la misma relación L/S de 50 L/kg y aumentando la cantidad de ácido utilizada a 17,5 meq H⁺/g. Esta vez para evaluar la cinética de extracción durante 1 hora.

Se preparó la extracción acuosa vertiendo una muestra de 20 gramos de cenizas a 1 litro de agua destilada en un vaso precipitado de 1 litro para ser agitado utilizando un agitador magnético por 1 hora, una vez terminado el tiempo de agitación se dejó decantar los sólidos y se procedió a filtrar el sobrenadante utilizando una bomba de vacío para luego reservar el filtrado en botellas de plástico. El sobrenadante obtenido fue sometido a una medición de parámetros, procedimiento realizado por duplicado.

Luego, se prepararon dos soluciones ácidas; 1 litro de HCl 0,05 M y 1 litro de HCl 0,35 M (las cuales representan la relación de 2,5 y 17,5 meq H⁺/g, respectivamente) y se vertieron en vasos separados con las cenizas remanentes de la extracción acuosa para ser agitados por 1 hora. Para cada vaso se retiraron muestras de 30 mL en cinco instantes: 1, 5, 15, 30 y 60 minutos. Cada una de las muestras se centrifugó y se retiró el sobrenadante para ser sometido a mediciones de pH, concentración de iones (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, SO₄²⁻ y PO₄³⁻) y sólidos disueltos por peso seco. Todas las muestras se midieron por triplicado.

Una vez terminado el ensayo se filtró la mezcla y se reservaron los extractos ácidos en botellas de plástico.

4.1.4. Actividad 1.4: Ensayo de extracción ácida por 1 minuto (2,5 y 17,5 meq H⁺/g).

Con base en los resultados de la actividad anterior se procedió a realizar otro ensayo de agitación mecánica guardando la misma relación líquido/sólido de 50 L/kg y la relación ácido/ceniza, para esta vez ser utilizados en el diseño del medio de cultivo.

Se preparó la extracción acuosa vertiendo una muestra de 20 gramos de cenizas a 1 litro de agua destilada en un vaso precipitado de 1 litro para ser agitado en un agitador magnético por 1 hora, una vez terminado el tiempo de agitación se dejó decantar los sólidos y se procedió a filtrar el sobrenadante utilizando una bomba de vacío y se reservó el filtrado en botellas de plástico para posterior medición de pH, conductividad eléctrica y concentración de ion potasio, procedimiento realizado por duplicado.

Luego, se prepararon dos soluciones ácidas; 1 litro de HCl 0,05 M y 1 litro de HCl 0,35 M (las cuales representan la relación de 2,5 y 17,5 meq H⁺/g, respectivamente) y se vertieron en vasos separados con las cenizas remanentes de la extracción acuosa para ser agitados por 1 minuto.

Las mezclas fueron filtradas inmediatamente terminado el tiempo de agitación y se reservaron los extractos para la medición de pH, conductividad eléctrica y concentración de ion fosfato.

4.2. Objetivo 2 - Etapa 2: Diseñar medios de cultivo para cianobacterias a partir de los componentes solubles de las cenizas de madera.

4.2.1. Actividad 2.1: Diseño del medio de cultivo.

Para el diseño del medio de cultivo a partir de los extractos de ceniza obtenidos en la etapa 1 (actividad 1.4), se estimó el rendimiento máximo de cada nutriente en las células ($Y_{x/s}$) utilizando como base de cálculo la composición elemental de las cianobacterias a cultivar (Ver Tabla 1.1).

$$Y_{x/s} = \frac{\% \text{ del elemento en la fuente}}{\% \text{ del elemento en la cianobacteria}} \quad (2)$$

Luego, se calculó la concentración mínima necesaria de cada compuesto (C_m) para satisfacer la demanda de nutrientes usando como base de cálculo el incremento en la concentración de cianobacterias deseada del cultivo (Δx).

$$C_m (g/L) = \frac{\Delta x (g/L)}{Y_{x/s}} \quad (3)$$

Se calculó el volumen necesario de extracto para satisfacer la demanda de cada nutriente usando los datos de concentración de los extractos acuoso y ácido (C_e) de la actividad 1.3 y aplicando un 20% de exceso con el fin de asegurar la disponibilidad de nutrientes en un litro de medio de cultivo.

$$V (L) = \frac{C_m (g/L) * 1L}{C_e (g/L)} * 1,2 \quad (4)$$

Se seleccionó aquel elemento que mayor cantidad de volumen mínimo muestre para determinar el volumen de cada extracto a utilizar.

Una vez mezclados los extractos se aforó a 1 litro en un matraz de aforo y se midió el pH y conductividad eléctrica con el fin de revisar que no se encuentren en condiciones desfavorables para el cultivo. Este procedimiento se replicó cada vez que se agregó medio de cultivo al fotobiorreactor (cada 3 días) hasta alcanzar un volumen de cultivo de 6 litros (16 días).

4.3. Objetivo 3 - Etapa 3: Evaluar la efectividad de los medios de cultivo en el crecimiento de cianobacterias

4.3.1. Actividad 3.1: Cultivo de cianobacterias.

4.3.1.1. Arranque del cultivo de cianobacterias

En el laboratorio de biotecnología de microalgas de la Escuela de Ingeniería en Medioambiente se dio inicio al cultivo de la cianobacteria *Anabaena cylindrica* mezclando 1 litro del medio de cultivo diseñado en la etapa anterior y 1 litro de inóculo en un fotobiorreactor de placa angosta de vidrio transparente. Los detalles del cultivo se describen en la siguiente Tabla 4.2 .

Se agregó 1 litro de medio de cultivo cada 3 días hasta alcanzar un tiempo de crecimiento de 16 días, esto con el fin de evitar una dilución excesiva del cultivo que exponga a las células a una inhibición por exceso de luz.

Tabla 4.2: Descripción del cultivo de cianobacterias.

Elemento	Descripción
Especie de microorganismo	<i>Anabaena cylindrica</i>
Modalidad de operación	Semicontinuo, lote alimentado.
Material del fotobiorreactor	Vidrio transparente de 5 mm
Capacidad volumétrica del fotobiorreactor	10 litros aprox.
Dimensiones del fotobiorreactor	50 x 6 x 35 cm
Recorrido de luz	5 cm
Iluminación	Foco de 50 W
Irradiancia	25 W/m ² (200 μmol*m ⁻² *s ⁻¹)
Fotoperíodo (luz/oscuridad)	12:12
Temperatura	Ambiente

4.3.1.2. Medición de biomasa seca del inóculo

Para la evaluación del éxito de los cultivos se procedió a medir de la biomasa por peso seco en el inicio del cultivo (biomasa inicial) y la biomasa al final del tiempo de cultivo (16 días) mediante el siguiente procedimiento, el cual se realizó por cuadruplicado:

- a. Preparación de capachos de aluminio.
- b. Peso de capachos de aluminio en balanza analítica.
- c. Extracción de muestras de 10 mL de cultivo en tubos falcon de 15 mL.
- d. Centrifugado de tubos de 15 mL por 5 minutos.
- e. Desecho del sobrenadante
- f. Lavado de la biomasa centrifugada con agua destilada y con ayuda de un agitador Vortex.
- g. Repetir d, e y f.
- h. Una vez lavada la muestra, verter a los capachos de aluminio.
- i. Secado de los capachos con muestra en la estufa de secado por 24 horas.
- j. Extracción de los capachos de la estufa posterior reposo en desecadora por 2 horas.
- k. Peso de los capachos con la muestra, obteniendo por diferencia la biomasa de cianobacterias en base seca.

4.3.2. Actividad 3.2: Monitoreo y seguimiento del fotobiorreactor.

4.3.2.1. Curva de calibrado de concentración del cultivo

Se realizó una curva de calibrado entre la concentración del cultivo y la absorbancia del cultivo a una longitud de onda de 550 nm. Para esto, se tomó una muestra del cultivo de *Anabaena cylindrica* que se utilizará como inóculo, cuya concentración es conocida (0,443 g/L) y se procedió a preparar un conjunto de muestras de 10 mL diluidas con agua destilada a distinto factor de dilución (15, 10, 5 y 2,5). Cada muestra se realizó por duplicado.

Luego, se midió la absorbancia de cada muestra a 550 nm utilizando el espectrofotómetro mencionado en la Tabla 4.1 y se calculó la absorbancia promedio para cada concentración.

4.3.2.2. Seguimiento de la concentración y rendimiento cuántico (QY) del cultivo.

Se realizó un seguimiento diario al cultivo mediante la toma de muestras de 12 mL para la medición de la concentración de cianobacterias por absorbancia y medición de parámetros fotosintéticos.

Cada muestra se dejó 10 minutos en condiciones de oscuridad para luego ser sometida a la medición del rendimiento cuántico (QY) utilizando el equipo AquaPen AP110/C. Posteriormente, mediante la curva de calibrado previamente realizada se estimó la concentración de cianobacterias utilizando un espectrofotómetro.

5. RESULTADOS

5.1. Objetivo 1 - Etapa 1: Evaluar la extracción de nutrientes de interés desde las cenizas de madera mediante la solubilización acuosa y ácida

5.1.1. Actividad 1.1: Determinación de la relación líquido/sólido.

Los valores de rendimiento másico total para cada proporción líquido/sólido se muestran en la siguiente Figura 5.1. Se puede observar claramente que el rendimiento de extracción es directamente proporcional a la proporción líquido/sólido que se utilizó.

Con este resultado se determinó una relación de ácido ceniza de 50 L/kg dado que consigue mayores niveles de extracción de sólidos, y, por ende, de los iones.

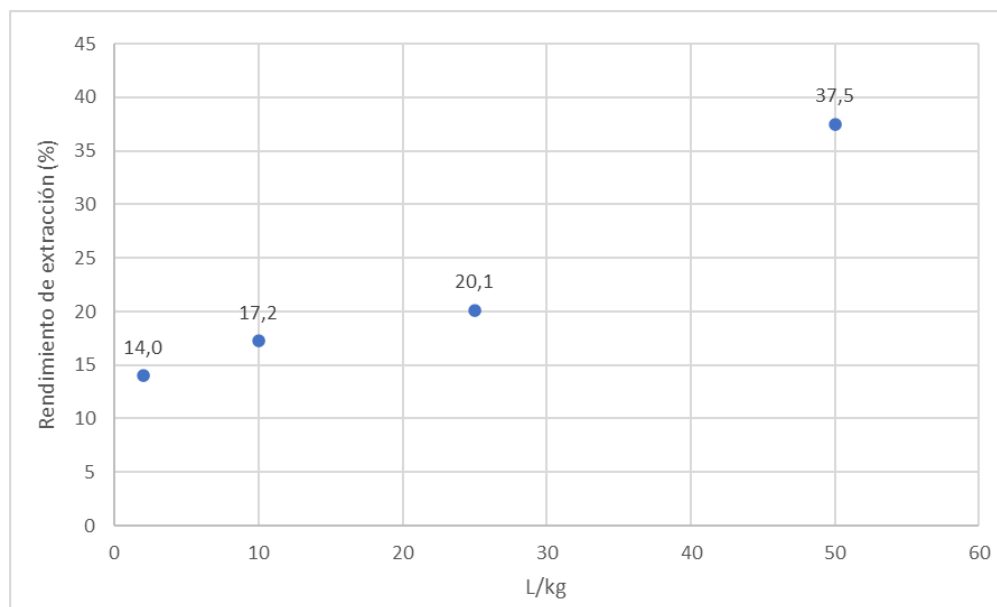


Figura 5.1: Rendimiento de extracción de sólidos disueltos a distintas proporciones de líquido/sólido.

5.1.2. Actividad 1.2: Ensayo de agitación mecánica de 24 horas.

5.1.2.1. Extracción acuosa a 50 L/kg.

Los niveles de los nutrientes de interés, así como el pH del extracto obtenido en esta fase del ensayo se muestran a continuación en la Tabla 5.1, por otro lado, el porcentaje de rendimiento másico total (en sólidos disueltos totales) y de cada ion se exponen en la Figura 5.2.

Tabla 5.1: Parámetros de extracto acuoso a 50 L/kg por 24 horas.

Parámetro	Valor
pH	11,600
K ⁺ (mg/L)	1.088,9
Ca ²⁺ (mg/L)	-
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	323,6
Mg ²⁺ (mg/L)	-
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	-
Sólidos disueltos totales (g/L)	4,4

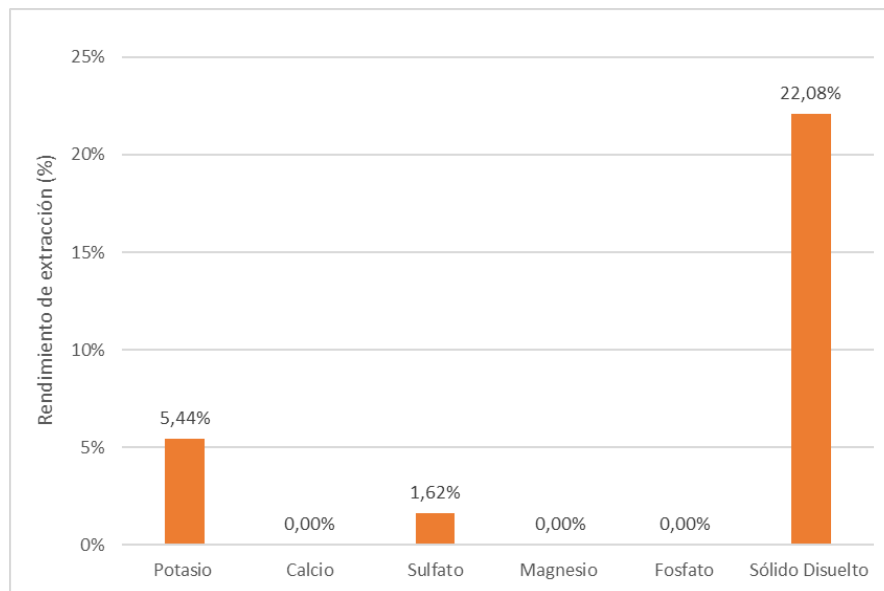


Figura 5.2: Rendimiento de extracción acuosa a 50 L/kg por 24 horas.

No se detectó presencia de los iones calcio, magnesio y fosfato.

5.1.2.2. Extracción ácida a 2,5 y 10 meq H⁺/g.

El porcentaje de rendimiento másico total (en sólidos disueltos totales) y de cada ion en los tres instantes estudiados se exponen en las siguientes Figura 5.3 y Figura 5.4.

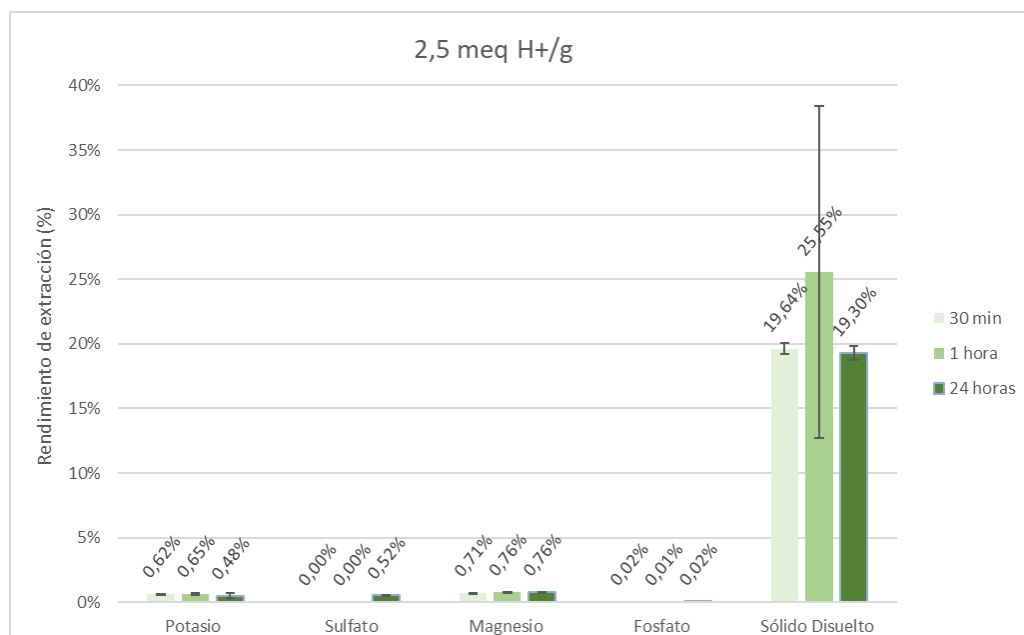


Figura 5.3: Cinética de extracción ácida de sólidos disueltos a 2,5 meq H⁺/g por 24 horas.

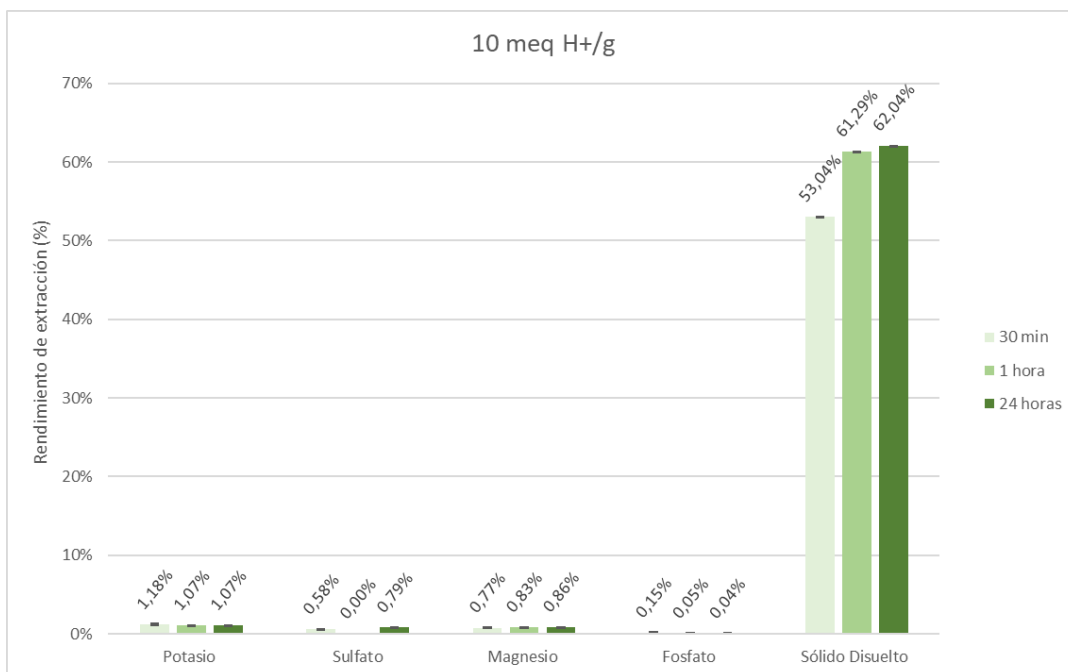


Figura 5.4: Cinética de extracción ácida de sólidos disueltos a 10 meq H⁺/g por 24 horas.

Se observa que el rendimiento de extracción es prácticamente independiente del tiempo (pasados los 30 minutos de reacción).

Se observa que no se consiguió extraer ion fosfato a pesar de aumentar la razón ácido/ceniza, esto debido a que los valores de pH resultantes de la razón de 10 meq H⁺/g se encuentran alrededor de 7,5.

Todos los valores de concentración de calcio medidos para ambas extracciones ácidas superaron el valor de sólido total disuelto, lo cual es inválido. Por esta razón que se omitieron estos resultados.

Con la información obtenida de estos resultados se realizó un segundo ensayo, para evaluar la cinética en un período más corto (menor a 60 minutos) y aumentando la razón ácido/ceniza a 17,5 meq H⁺/g.

5.1.3. Actividad 1.3: Evaluación de la cinética de extracción ácida.

Como se expone en el subtítulo de esta sección del experimento, esta etapa consistió en someter la extracción ácida a un monitoreo de sus niveles de extracción de iones dentro de los primeros 60

minutos para hallar el instante en el que logra la mayor cantidad de iones extraídos. Sin embargo, previo a la extracción ácida se realizó una extracción acuosa cuyos parámetros se muestran a continuación.

5.1.3.1. Extracción acuosa de 1 hora.

Los niveles de los nutrientes de interés, así como el pH del extracto obtenido en esta fase del ensayo se muestran en la Tabla 5.2, por otro lado, el porcentaje de rendimiento másico total y de cada ion (los cuales fueron calculados con la ecuación n°1) se exponen en la Figura 5.5.

Tabla 5.2: Parámetros de extracto acuoso a 50 L/kg por 1 hora.

Parámetro	Valor
pH	10,370
K ⁺ (mg/L)	891,8
Ca ²⁺ (mg/L)	-
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	226,7
Mg ²⁺ (mg/L)	-
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	-
Sólidos disueltos totales (g/L)	3,395

Los valores de pH y concentración de ion potasio resultaron ser menores que en la extracción acuosa de 24 horas, sin embargo, se escogieron estos valores como referencia para el diseño del medio cultivo.

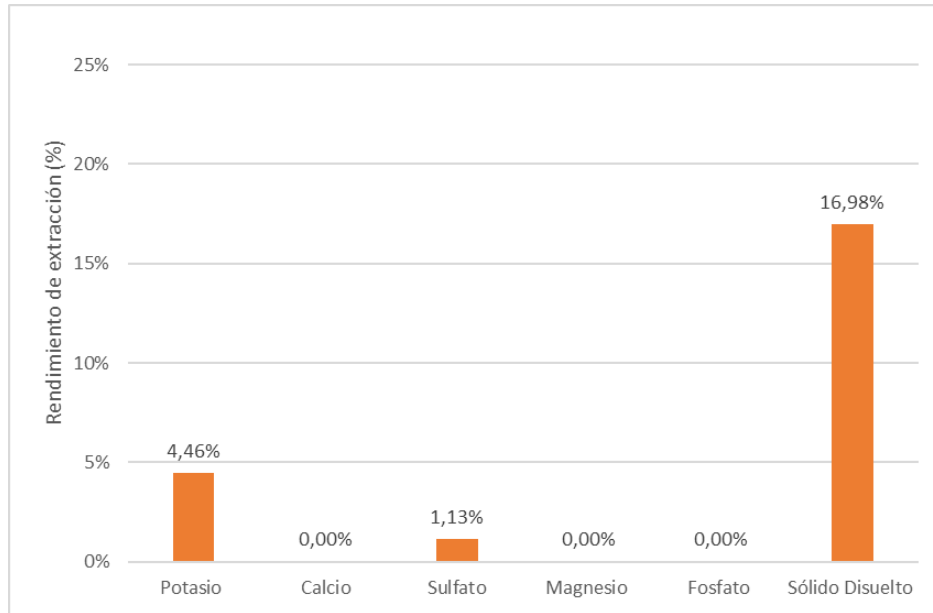


Figura 5.5: Rendimiento de extracción acuosa a 50 L/kg por 1 hora.

5.1.3.2. Extracción ácida a 2,5 y 17,5 meq H+/g.

La variación de pH de los extractos ácidos se ve representada en el siguiente gráfico.

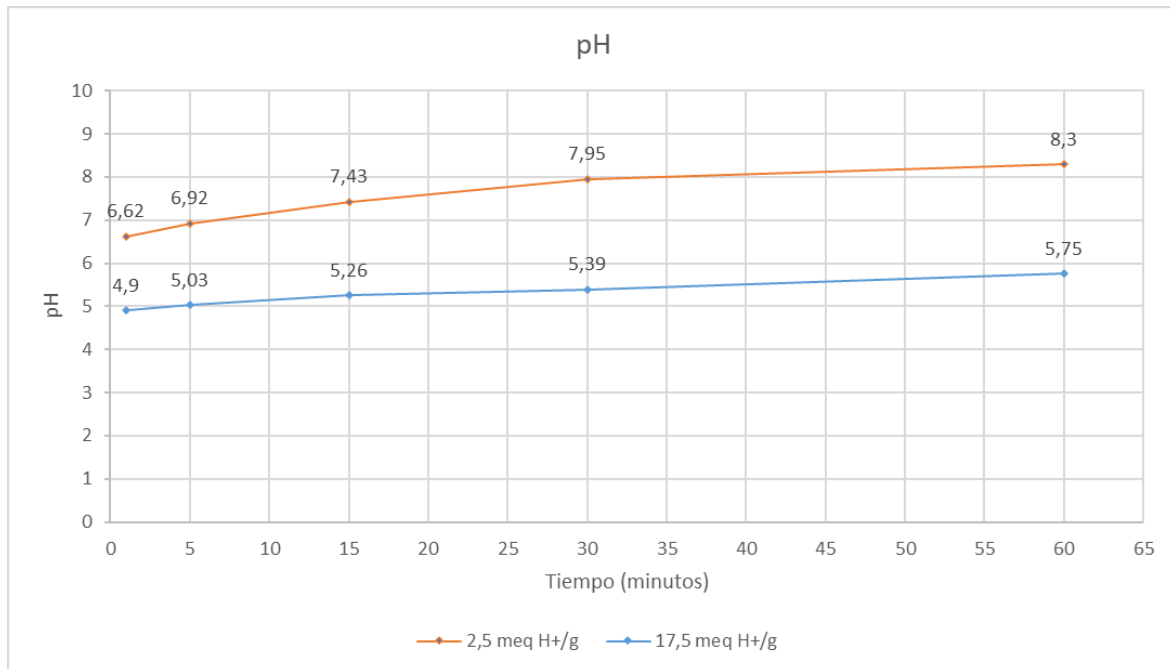


Figura 5.6: Variación del pH en el tiempo a 2,5 y 17,5 meq H+/g de ceniza por 60 minutos.

La cinética de extracción de iones para ambas relaciones de ácido/ceniza se describe a continuación.

- Ion Potasio: El rendimiento de potasio se mantiene relativamente constante en el tiempo a ambas razones de ácido/masa de ceniza. Sin embargo, tal como se observa en la Figura 5.7, se produce un rendimiento superior utilizando una razón de 17,5 meq H⁺/g cuyo valor se sobrepone en un 66% más que al utilizar una razón de 2,5 meq H⁺/g.

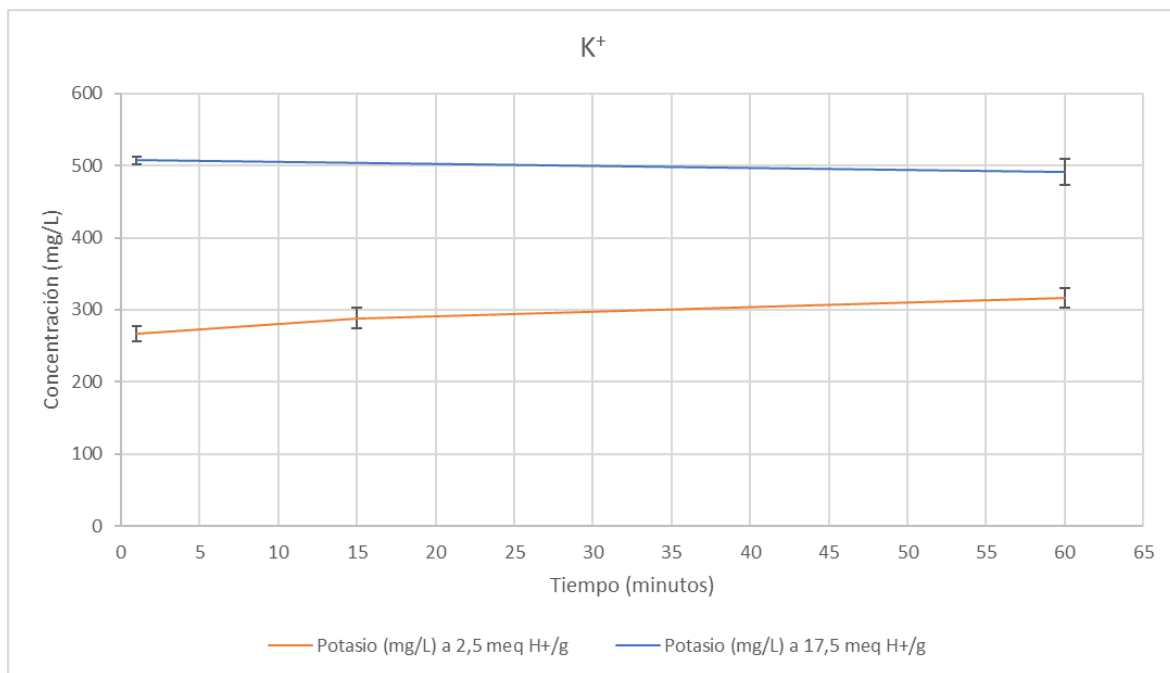


Figura 5.7: Cinética de extracción de ion potasio a 2,5 y 17,5 meq H⁺/g de ceniza por 60 minutos.

- Ion magnesio: En ambas razones de ácido/masa de ceniza se observa un ligero aumento en la concentración conforme avanza el tiempo; un 29% para 2,5 meq H⁺/g y un 21% para 17,5 meq H⁺/g (Ver Figura 5.8).

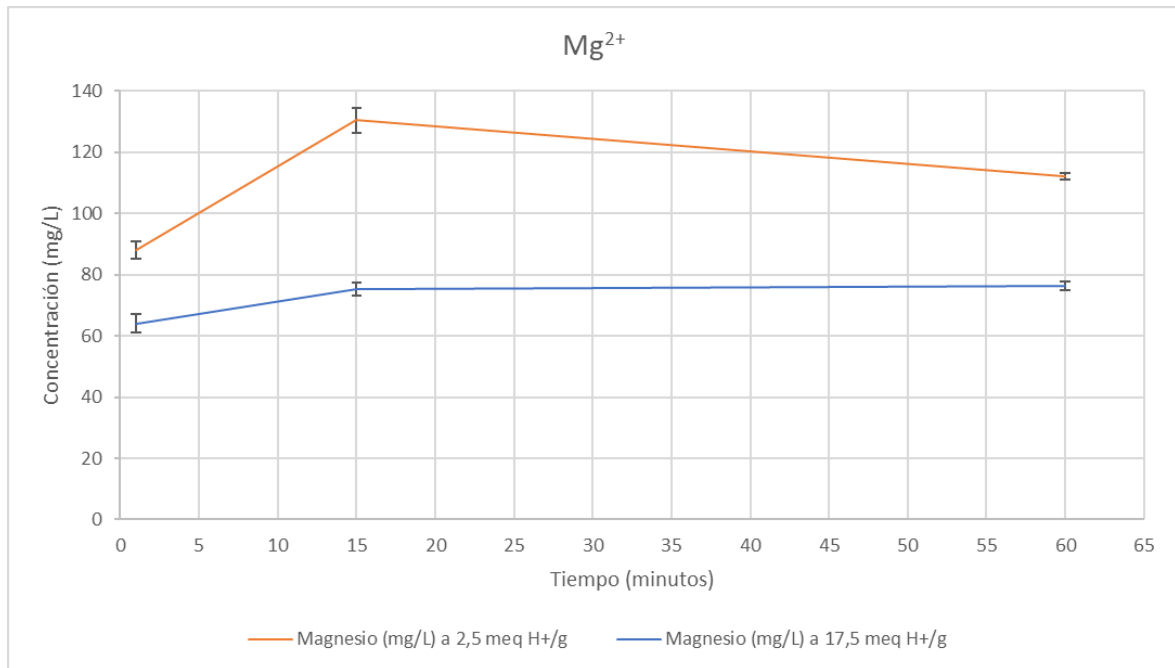


Figura 5.8: Cinética de extracción de ion magnesio a 2,5 y 17,5 meq H+/g de ceniza por 60 minutos.

- Ion calcio: Se observa en la Figura 5.9 que el rendimiento del ion calcio es independiente del tiempo de reacción, sin embargo, se logran extracciones muy superiores a una razón de meq H+/g más alta.

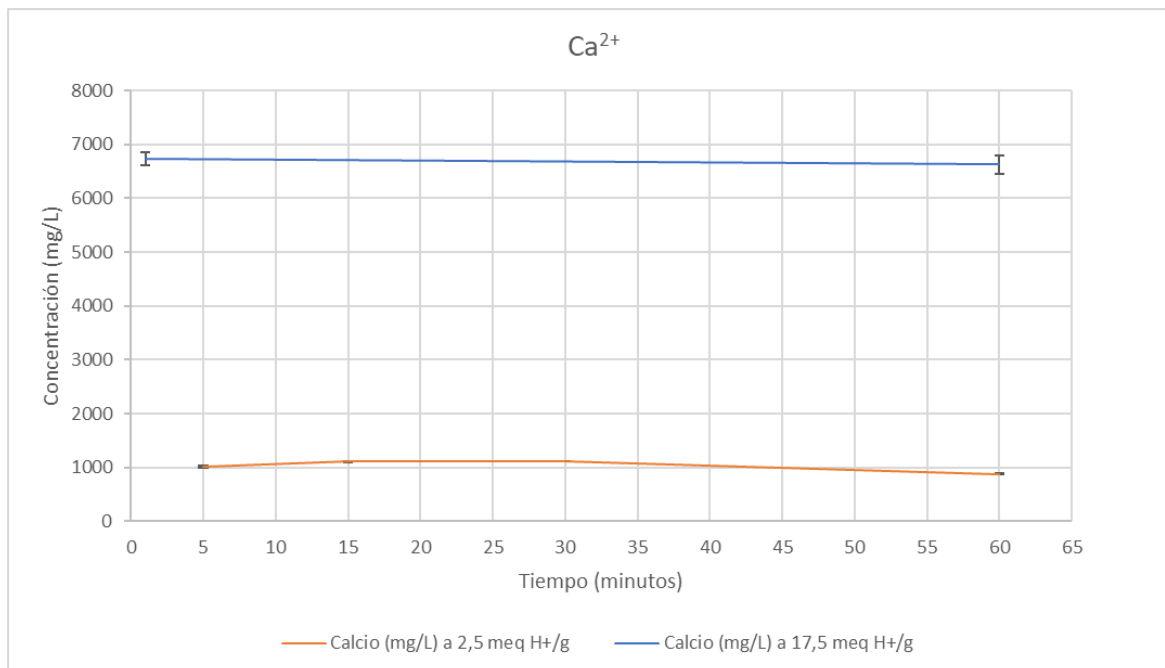


Figura 5.9: Cinética de extracción de ion calcio a 2,5 y 17,5 meq H⁺/g de ceniza por 60 minutos.

- Ion sulfato: Las extracciones ácidas de sulfato son considerablemente inferiores respecto a la extracción acuosa tal como se puede observar en la Figura 5.10. El rendimiento es casi nulo a razón de 2,5 meq H⁺/g y bajo a 17,5 meq H⁺/g disminuyendo un 27% después de 60 minutos.

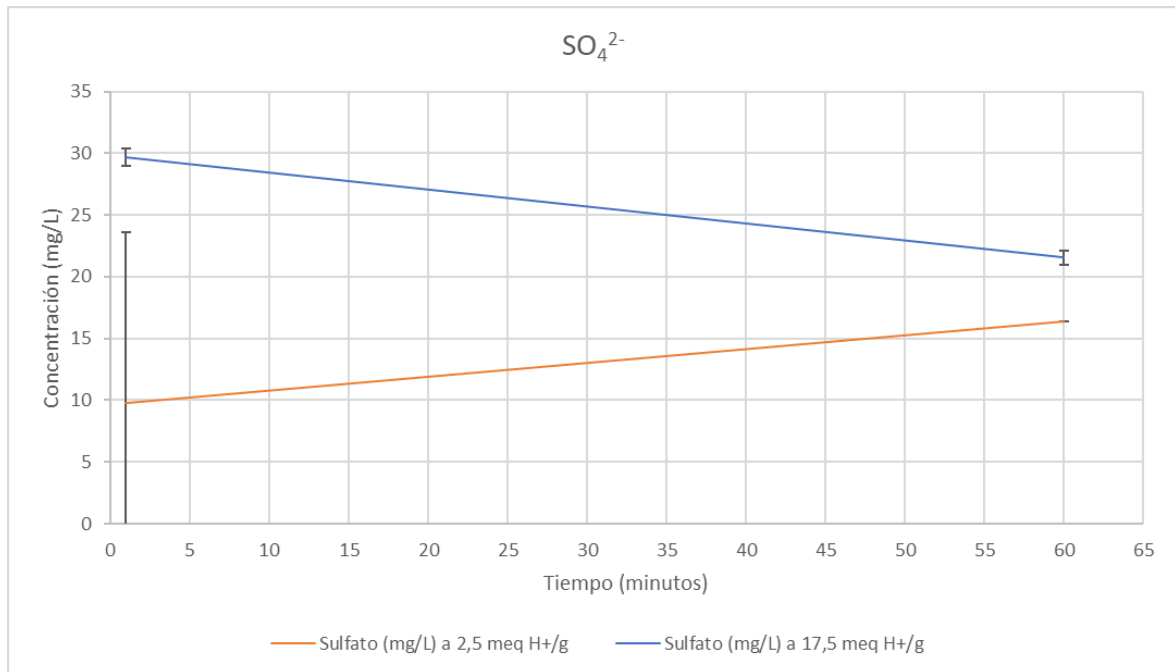


Figura 5.10: Cinética de extracción de ion sulfato a 2,5 y 17,5 meq H+/g de ceniza por 60 minutos.

- Ion fosfato: Como se observa en la Figura 5.11 el rendimiento del fosfato resulta ser dependiente del pH resultante, en donde se logra la máxima extracción al minuto de reacción y para ambas razones de meq H+/g. Sin embargo, a razón de 17,5 meq H+/g se logra extraer más de 8 veces la cantidad que se extrae a 2,5 meq H+/g.

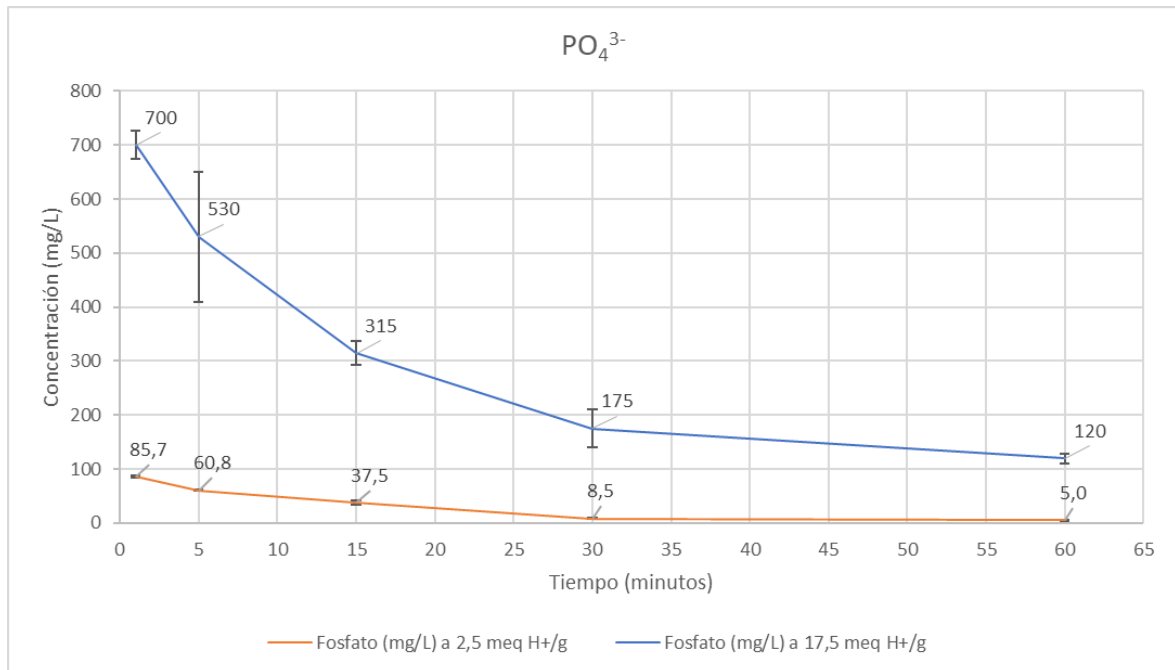


Figura 5.11: Cinética de extracción de ion fosfato a 2,5 y 17,5 meq H⁺/g de ceniza por 60 minutos.

- Sólidos disueltos totales: Se observa en la Figura 5.12 que la cantidad de sólidos disueltos se mantiene relativamente constante en los primeros 30 minutos. Iniciando con un rendimiento del 13,9% a razón de 2,5 meq H⁺/g y 44% a razón de 17,5 meq H⁺/g. (Calculado con base en los 20 gramos de ceniza utilizados inicialmente)

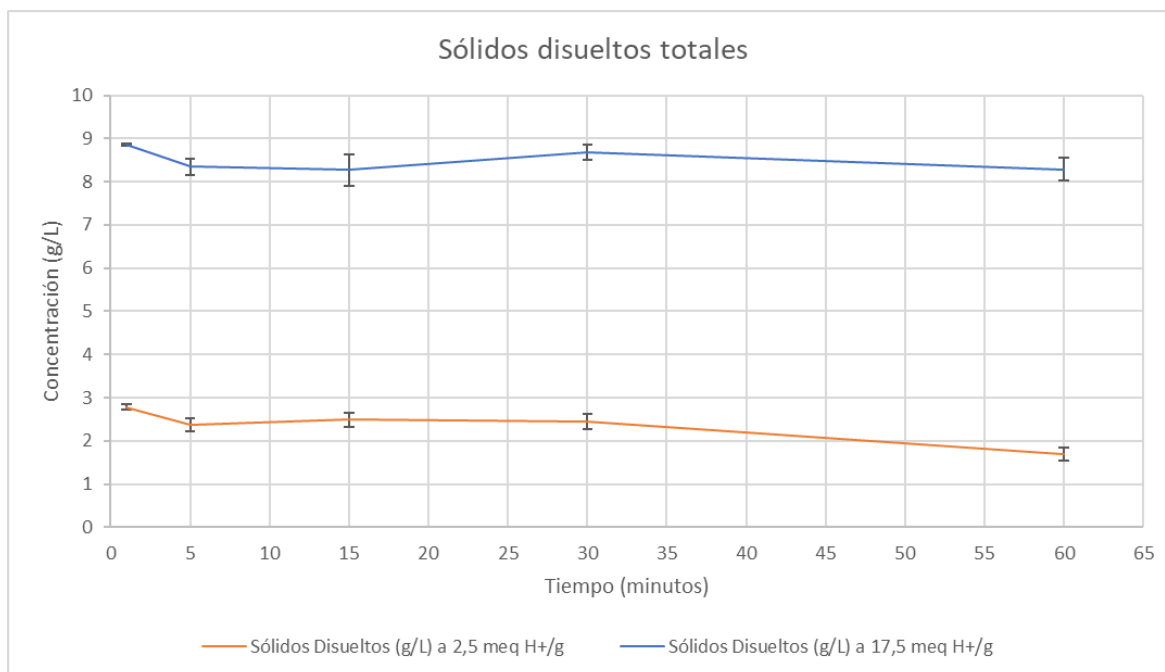


Figura 5.12: Cinética de extracción de sólidos disueltos a 2,5 y 17,5 meq H⁺/g de ceniza por 60 minutos.

Los resultados de este segundo ensayo permitieron definir un tiempo de reacción de 1 minuto para extracción ácida para ensayos futuros, dado que es el instante donde se consigue la mayor extracción de fosfato.

5.1.4. Actividad 1.4: Ensayo de extracción por 1 minuto (2,5 y 17,5 meq H⁺/g)

A continuación, se muestran los parámetros medidos para la extracción ácida de 1 minuto para ambas relaciones ácido/masa de ceniza.

Tabla 5.3: Parámetros de extracción ácida a 2,5 y 17,5 meq H⁺/g.

Parámetro	2,5 meq H ⁺ /g	17,5 meq H ⁺ /g
pH	6,48	4,66
Fosfato (mg/L)	141,333	736,667

Se puede apreciar que los niveles de pH y ion fosfato se condicen con los obtenidos de la actividad anterior lo que indica reproducibilidad del procedimiento. Por lo mismo, se considerarán los valores al primer minuto de los extractos de la actividad 1.3 para el diseño del medio de cultivo, los cuales se exponen en la siguiente tabla.

Tabla 5.4: Composición de los extractos de ceniza.

Concentración de Nutriente	Ex. Acuoso	Ex. Ácido 17,5 meq H+/g (t: 1 min)
K ⁺ (mg/L)	892	507
Ca ²⁺ (mg/L)	-	6732
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	226	30
Mg ²⁺ (mg/L)	-	64
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	-	700

5.2. Objetivo 2 - Etapa 2: Diseñar medios de cultivo para cianobacterias a partir de los componentes solubles de las cenizas de madera.

5.2.1. Actividad 2.1: Diseño del medio de cultivo.

Se diseñó un medio de cultivo considerando los valores estimados de rendimiento máximo de los nutrientes en las células (Ecuación n°2), la concentración mínima de nutrientes (Ecuación n°3) y el volumen de extracto necesario para satisfacer la demanda de nutrientes (Ecuación n°4), los cuales se exponen en la siguiente tabla. Se omitió el valor del azufre dado que no se conoce con exactitud su composición dentro de las cianobacterias.

Tabla 5.5: Volumen de extracto necesario para la demanda de nutrientes.

Elemento	Fuente	% en CB	% en fuente	$Y_{x/s}$	C_m (g/L)	C_e (g/L)	V (L)
K	K^+	0,72	100	138,9	0,014	0,507	0,034
Ca	Ca^{+2}	1,39	100	71,7	0,028	6,732	0,005
Mg	Mg^{+2}	0,51	100	194,9	0,010	0,064	0,192
P	PO_4^{-3}	2,45	32,6	13,3	0,150	0,7	0,257
Extracto acuoso							
K	K^+	0,72	100	138,9	0,014	0,892	0,019

Dados los volúmenes mínimos de cada extracto, se determinó un volumen de 257 mL de extracto ácido y 19 mL de extracto acuoso para la elaboración del medio de cultivo, el cual, se consiguió mezclando ambos volúmenes y aforando a 1 L con agua destilada, obteniéndose un medio de cultivo que se describe en la

Tabla 5.6.

Tabla 5.6: Parámetros y concentración de iones del medio de cultivo diseñado.

Parámetro	Medición
pH	5,2
Conductividad eléctrica (mS/cm)	4,05
K^+ (mg/L)	146,0
PO_4^{3-} (mg/L)	180,1
Ca^{2+} (mg/L)	1708,0
SO_4^{2-} (mg/L)	12,4
Mg^{2+} (mg/L)	11,4

5.2.1.1. Seguimiento del extracto ácido

Se realizó un seguimiento del pH y ion fosfato del extracto ácido cada vez que se le agregó medio de cultivo al fotobiorreactor, esto con el fin de calcular nuevamente el volumen de extracto ácido según

corresponda y asegurar una alimentación constante de fosfato. La concentración de fosfato cambió con el tiempo dándose un comportamiento que se describe en la siguiente tabla.

Tabla 5.7: Seguimiento de extracto ácido 17,5 meq H+/g

Parámetro	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9
pH	4,66	4,58	4,61	4,31
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	700	640	650	590

5.3. Objetivo 3 - Etapa 3: Evaluar la efectividad de los medios de cultivo en el crecimiento de cianobacterias

5.3.1. Actividad 3.1: Cultivo de cianobacterias.

Se dio comienzo al cultivo en el día 0 (cero), donde se midió la concentración de cianobacterias del inóculo mediante biomasa por peso seco y se elaboró la curva de calibrado para absorbancia a 550 nm para estimar la concentración de biomasa por espectrofotometría, la cual se muestra a continuación.

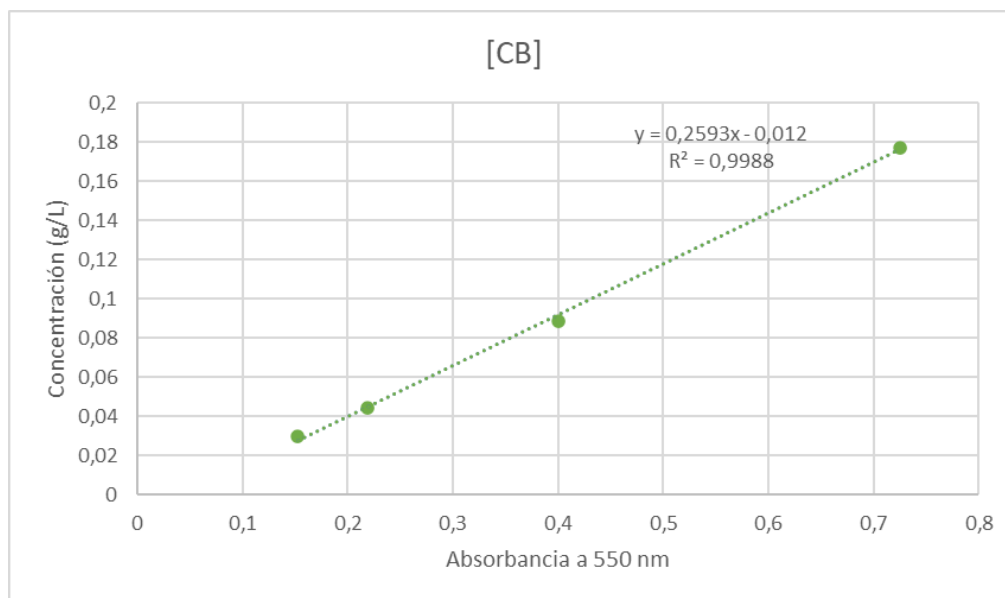


Figura 5.13: Curva de calibrado de concentración de cianobacterias.

La concentración de cianobacterias del inóculo fue de 0,443 g/L, considerando que el cultivo comenzó con un litro de inóculo, la masa total de cianobacterias al inicio del cultivo fue de 0,443 gramos.

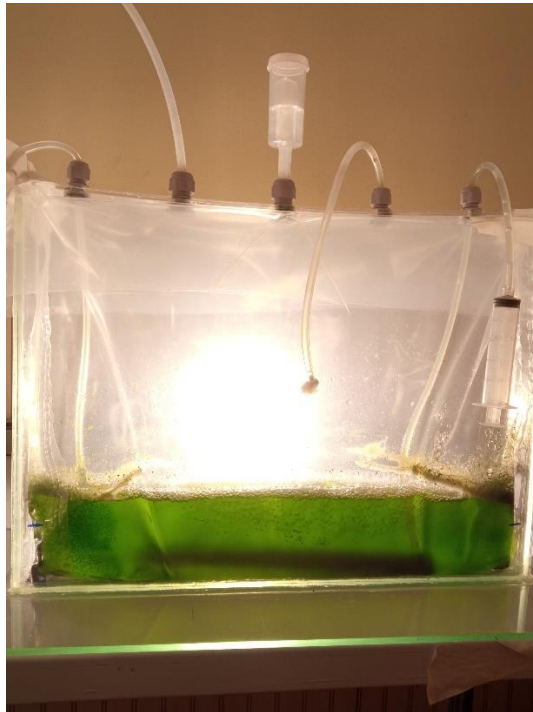


Figura 5.14: Fotobiorreactor inoculado (Día 3 de cultivo).

5.3.2. Actividad 3.2: Monitoreo y seguimiento del fotobiorreactor.

5.3.2.1. Biomasa y velocidad de crecimiento

Los parámetros medidos (biomasa total, velocidad de crecimiento y concentración del cultivo) que se muestran en las siguientes tablas y figuras revelan un crecimiento sostenido y estable de las cianobacterias por 16 días.

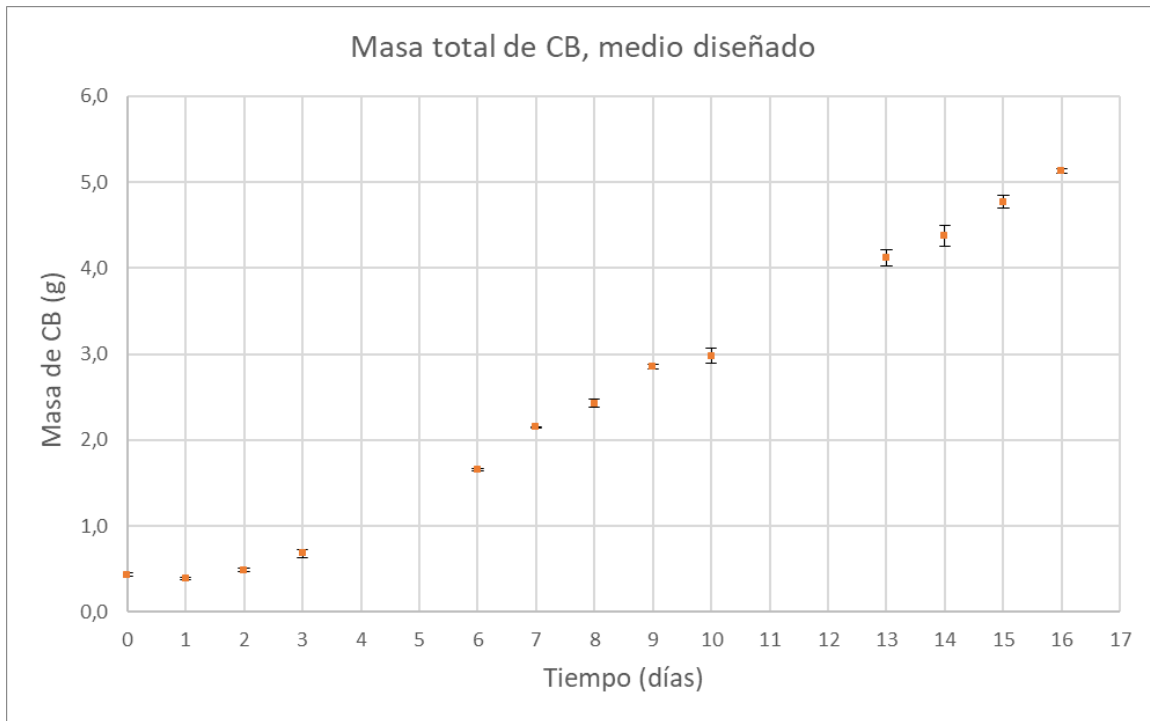


Figura 5.15: Masa total de cianobacterias en cultivo realizado con extractos de ceniza en el tiempo.

Se logra apreciar un crecimiento sostenido en la biomasa del cultivo, sin embargo, en los primeros 6 días la curva de crecimiento expresa un leve carácter exponencial. A partir de este momento, el cultivo exhibe un crecimiento lineal (ver Figura 5.16).

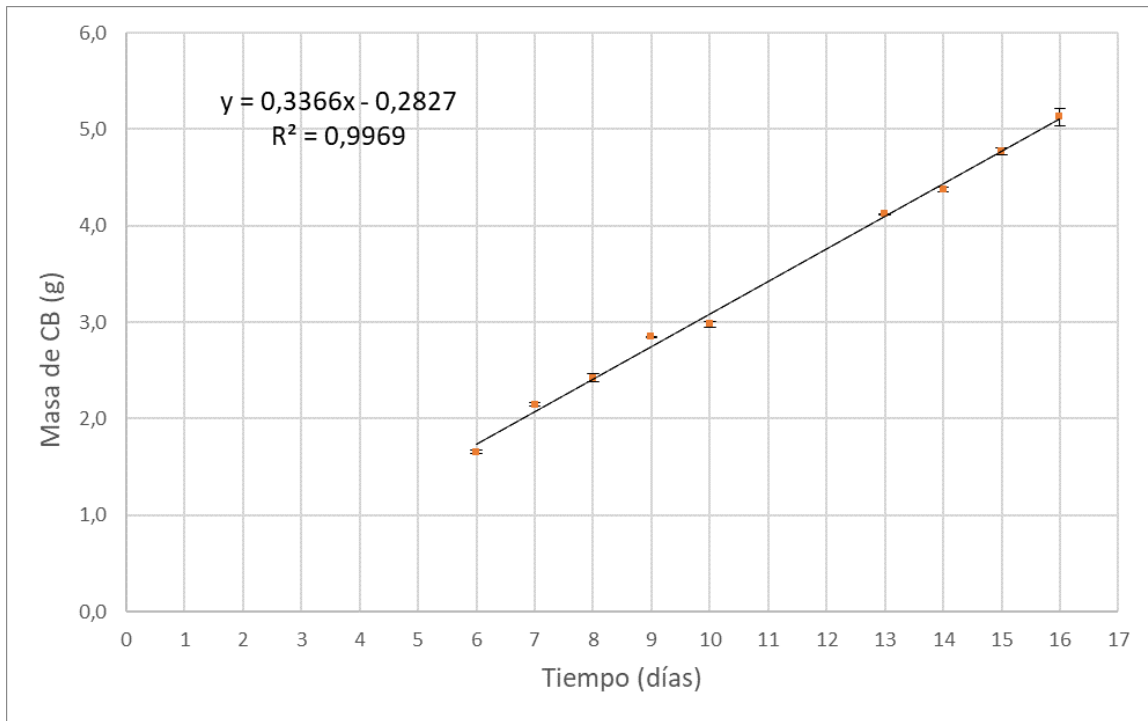


Figura 5.16: Masa total de cianobacterias en cultivo realizado con extractos de ceniza desde el día 6 de cultivo.

De la línea de tendencia de este gráfico se desprende la ecuación de crecimiento del cultivo a partir del día 6, el cual se describe a continuación.

$$Biomasa\ total\ (g) = 0,3366 \left(\frac{g}{día}\right) * t\ (días) - 0,9969 \quad R^2 = 0,9969 \quad (5)$$

La ecuación corresponde a una recta, en donde su pendiente representa la tasa de crecimiento promedio del cultivo a partir del día 6, el cual fue de un valor de 0,337 gramos por día según los datos obtenidos con espectrofotometría.

Por otro lado, la evolución del cultivo de cianobacterias realizado con un medio definido Arnon y a las mismas condiciones de irradiancia se presenta a continuación.

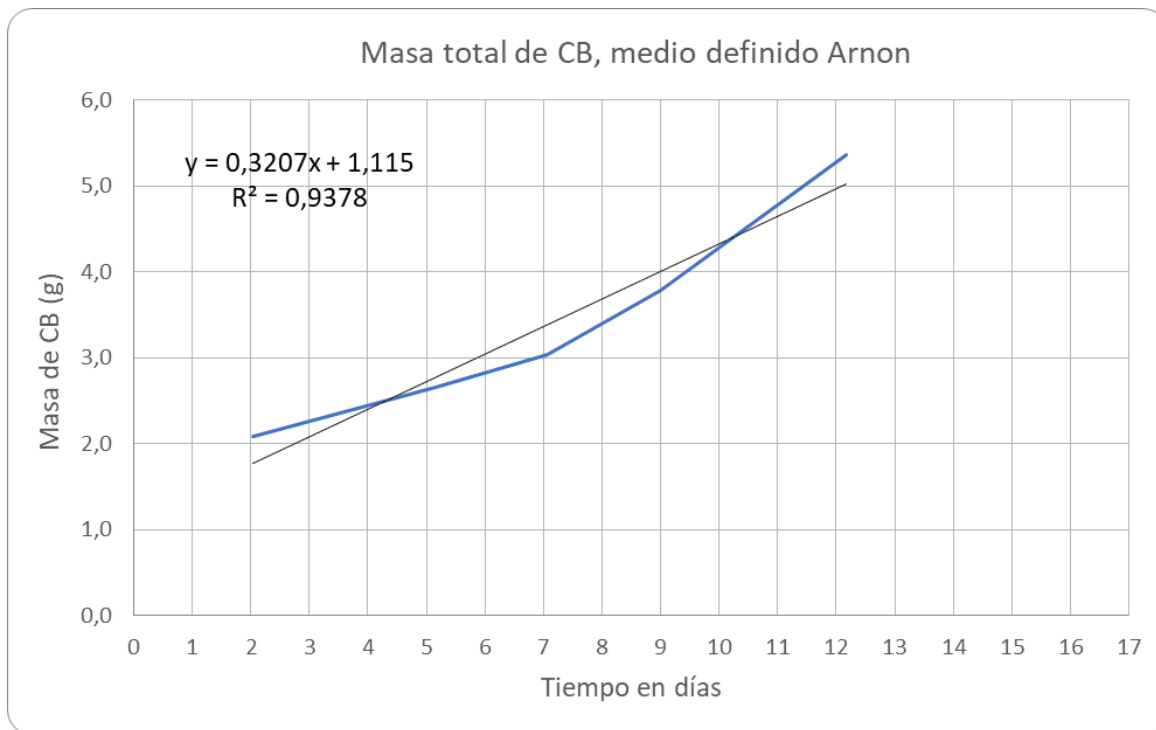


Figura 5.17: Masa total de cianobacterias en cultivo realizado con medio Arnon en el tiempo.

El crecimiento de biomasa en este cultivo se describe en la siguiente ecuación.

$$Biomasa\ total\ (g) = 0,3207 \left(\frac{g}{día} \right) * t\ (días) + 1,115 \quad R^2 = 0,9378 \quad (6)$$

La pendiente de la recta que representa la tasa de crecimiento promedio del cultivo y tiene un valor de 0,3207 gramos por día, muy similar a la del cultivo diseñado a partir de extractos de ceniza.

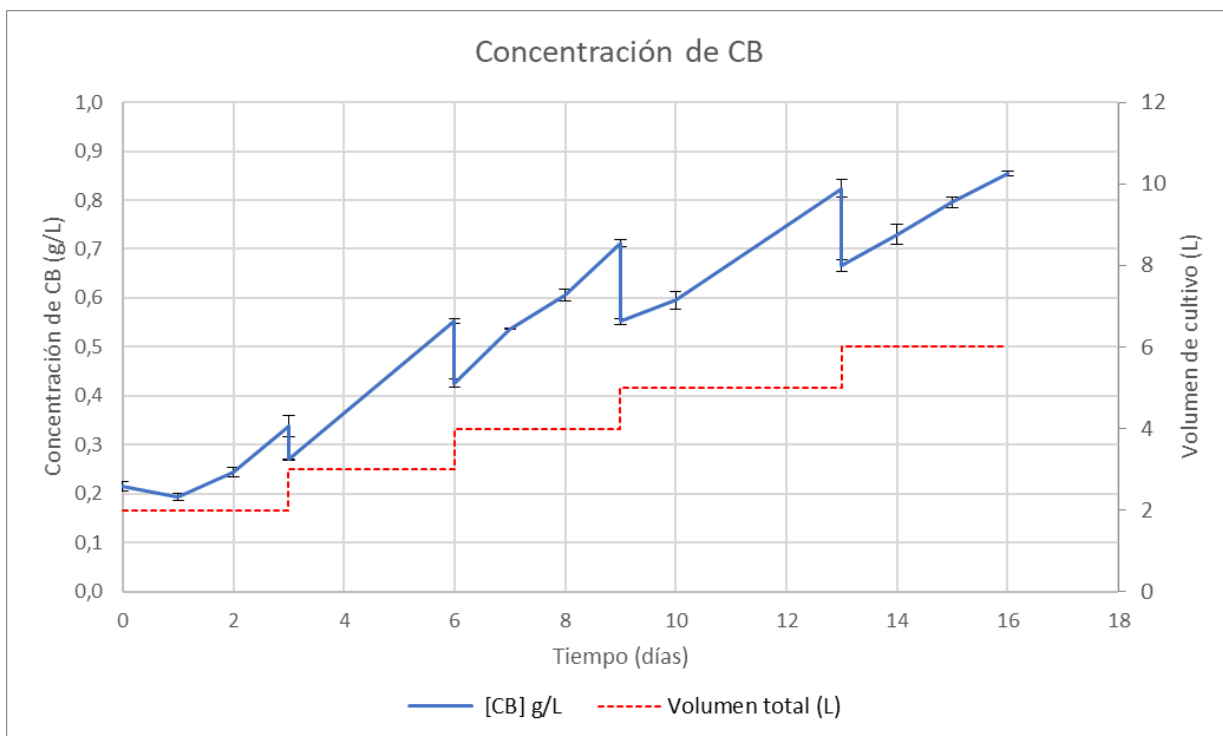


Figura 5.18: Cinética de crecimiento de *Anabaena cylindrica* en fotobiorreactor operado en modalidad semicontinua realizado con extractos de ceniza.

La concentración de cianobacterias al final del cultivo alcanzó un valor de 0,854 g/L según datos de espectrofotometría, sin embargo, el valor real medido por biomasa seca (ver Tabla 5.8) muestra que la concentración alcanzó los 1,25 g/L (supera el valor medido mediante absorbancia en un 46%).

Tabla 5.8.: Condiciones iniciales y finales del cultivo.

Parámetro	Valor inicial	Valor final
Volumen (L)	1	6
Concentración (g/L)	0,433 ± 0,032	1,250 ± 0,036
Biomasa total (g)	0,433 ± 0,032	7,500 ± 0,213

El medio de cultivo fue diseñado para lograr un aumento de concentración de 2 g/L, es decir, se tuvo la expectativa de que el cultivo alcanzara una concentración de 2,433 g/L finales a partir de los 0,433 g/L iniciales, sin embargo, la diferencia de concentración lograda fue de 0,817 g/L.

5.3.2.2. Parámetros fotosintéticos

Los valores de rendimiento cuántico a lo largo del cultivo se muestran en la siguiente figura.

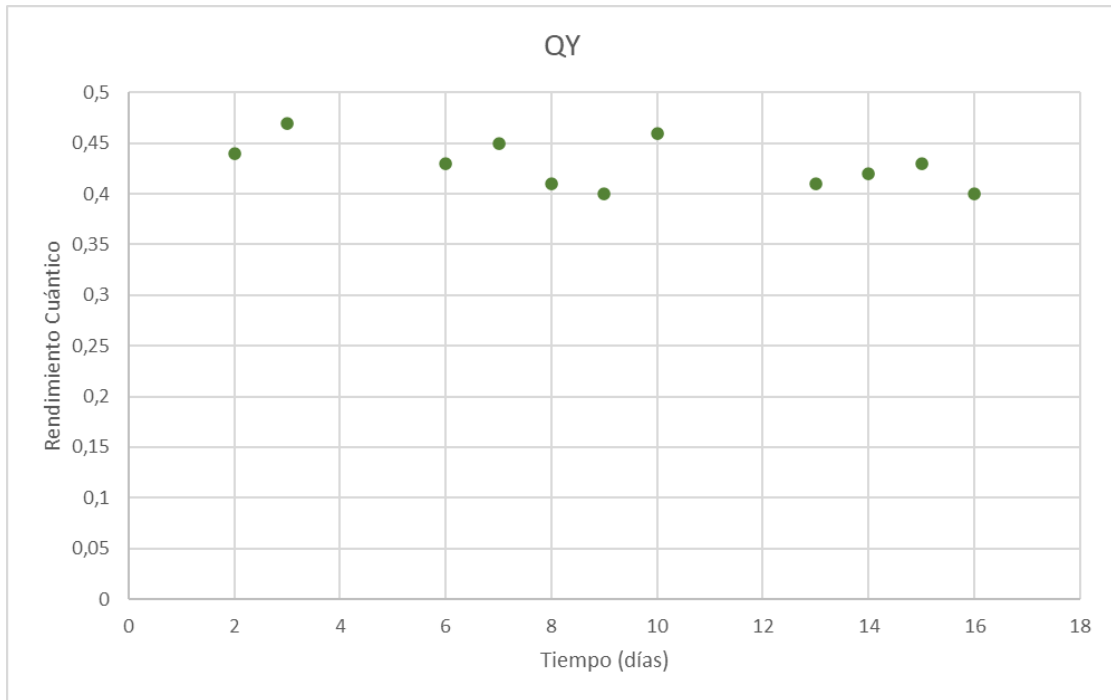


Figura 5.19: Rendimiento cuántico (QY) de cultivo realizado con extractos de ceniza en el tiempo.

El rendimiento cuántico del fotosistema II de las cianobacterias muestra valores que oscilan entre 0,40 y 0,47 con tendencia a la disminución en los últimos 4 días.

6. DISCUSIÓN

Extracción Acuosa

El rendimiento de las extracciones acuosas aumenta con el tiempo, observándose un aumento de aproximadamente un 30% al prolongar el ensayo de 1 hora a 24 horas, asimismo aumenta con la relación L/kg mostrando que a 50 L/kg se consigue un rendimiento máximo de extracción de sólidos de un 37,5% (Figura 5.1).

Se logró extraer los iones potasio y sulfato lo que se explica por ser independientes del pH del medio de extracción (Maresca et al., 2017) obteniéndose rendimientos máxicos de un 5,5% y 1,6% (Tabla 5.1) respectivamente, por lo que, según la composición de la ceniza, se puede aseverar que luego de esta etapa estos elementos aún se encuentran presentes en la ceniza.

El rendimiento máxico total (de sólidos disueltos) es de un 22% por lo que resta un 14,9% de sólido disuelto cuya composición se desconoce; si bien las cenizas se componen en gran parte de calcio y silicio, estos no están presentes en el extracto dado que el ion calcio es soluble a pH más bajo y el silicio se encuentra en forma de óxido prácticamente insoluble en agua. Una posible explicación de esta diferencia es por la presunta presencia de aniones que no fueron medidos, esto debido a que los cationes presentes en la solución (22,3 mmol de K^+) superan con creces los aniones estimados por pH (3,98 mmol OH^-).

La etapa de extracción acuosa, además de tener como función principal extraer cantidades importantes de ion potasio y sulfato, permite preparar la ceniza para la siguiente etapa, en el sentido de que “retira” gran cantidad de compuestos básicos permitiendo que la extracción ácida alcance valores más bajos de pH, y, por ende, aumente el rendimiento de ciertos iones como fosfato, calcio y magnesio.

Extracción ácida

El pH resultante de los ensayos ácidos resultó coherente con los hallazgos de las investigaciones hechas por Maresca et al. (2017) donde se encontró que utilizando una relación ácido/masa de ceniza de 2,5

meq H⁺/g se logran pH resultantes de entre 6 y 12 dependiendo del tipo de ceniza, sin embargo, a 17,5 meq H⁺/g el valor de pH difiere, dado que se obtuvo un valor de 4,9 mientras que el autor logra valores inferiores a 2. Lo anterior podría explicarse debido a que el autor utiliza un ácido distinto (ácido nítrico) lo que favorece otras reacciones con la ceniza dando como resultado una solución con pH distinto, o bien, que las cenizas de eucalipto poseen un comportamiento distinto y específico frente a la variación de la razón ácido/ceniza y del pH resultante.

La extracción de fosfato resultó ser dependiente del pH y, por ende, de la relación ácido/ceniza (ver Figura 5.11). Se obtuvieron extracciones de 88 mg/L (rendimiento de 4,28 g/kg) a 2,5 meq H⁺/g y máximo de 700 mg/L a 17,5 meq H⁺/g (lo cual representa un rendimiento de 35 g/kg), similar a lo que obtuvo Maresca et al. (2017) donde consiguió rendimientos superiores a 1 g/kg a pH por debajo de 5,5.

La extracción de ion calcio también mostró ser dependiente del pH (ver Figura 5.9), lográndose rendimientos de 55 g/kg a 2,5 meq H⁺/g y 336 g/kg a 17,5 meq H⁺/g lo cual bordea la composición de este ion en la ceniza (340 g/kg). Este comportamiento se ve en los hallazgos de Maresca et al. (2017) dado que este autor consiguió un rendimiento de aproximadamente 300 g/kg a un pH cercano a 4.

El tiempo de agitación mostró ser una variable fundamental en el rendimiento de extracción ácida dado que el pH del extracto aumenta drásticamente con el tiempo, de la misma forma, el ion fosfato disminuye su rendimiento de 700 mg/kg a menos de la mitad en 15 minutos y a 120 mg/kg en 60 minutos.

Diseño del medio de cultivo.

El medio de cultivo fue diseñado utilizando como referencia la composición elemental de la cianobacteria *Anabaena cylindrica*, un valor de concentración esperada de 2 g/L y la composición de los extractos provenientes de los ensayos de extracción.

Si bien los elementos más abundantes en la especie estudiada son el C, H, O y N, estos no fueron considerados para el medio de cultivo dado que estos son proporcionados por el aire; el N se obtiene por fijación, H por fotólisis del agua y el carbono es captado por las células en el ciclo de Calvin. Por otro lado, los micronutrientes considerados son los que deben ser proporcionados por el medio de

cultivo, dentro de ellos el que más abunda en la composición de la cianobacteria es el fósforo. (Tabla 1.1)

El ion fosfato, al ser el elemento más escaso respecto a la composición de *Anabaena cylindrica* resultó ser el nutriente limitante, así, la cantidad mínima de extracto ácido fue de 257 mL y de extracto acuoso, 19 mL para satisfacer las necesidades de potasio. Considerando lo anterior y el hecho de que la composición de los extractos se mantuvo relativamente constante, se puede aseverar que los procedimientos realizados se puede obtener 4 litros de medio de cultivo por cada 20 gramos de ceniza de madera.

Cultivo de cianobacterias

El medio de cultivo diseñado permitió aumentar la biomasa del cultivo sin necesidad de suplementos externos (de sales minerales o compuestos orgánicos que aporten elementos), lo que significa que el incremento de la biomasa se debió al consumo de los nutrientes (iones) proporcionados por los extractos de ceniza de madera. Los iones aportados se encontraron en forma y concentración adecuadas para la asimilación por parte de las cianobacterias, por lo que el crecimiento de estas fue un resultado esperable.

Biomasa: El cultivo de cianobacterias mantuvo un crecimiento sostenido en la biomasa, pasando de 0,43 gramos de cultivo a 7,5 gramos en 16 días con una concentración de 1,250 g/L, no obstante, el medio de cultivo fue diseñado para alcanzar una concentración de 2,0 g/L lo cual podría lograrse con mayor tiempo de cultivo dado que no se observó la fase estacionaria en el crecimiento.

Velocidad de crecimiento: Respecto a la velocidad de crecimiento, esta se mantuvo relativamente constante durante el cultivo con 0,314 g/día mientras que para un cultivo con medio Arnon en las mismas condiciones de luz se ha visto una tasa de crecimiento similar de 0,320 g/día.

Rendimiento cuántico: Los valores de rendimiento cuántico del cultivo se mantuvieron relativamente estables entre 0,40 y 0,47 con un valor de irradiancia constante de $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ aprox. mientras que en cultivos realizados en laboratorio con medio Arnon a las mismas condiciones de irradiancia mostraron valores de 0,45-0,47. Además, otros autores utilizando medios definidos exhiben valores de

0,25 en *Anabaena sp.*, alrededor de 0,4 en *Anabaena flos aquae* y *Anabaena variabilis* (Chia et al., 2018) así como valores de 0,33 (Qin et al., 2012) y 0,45 (Morillas et al., 2021) a condiciones de luz controlada.

Por otro lado, a condiciones de cielo abierto se ha visto valores de entre 0,10 y 0,49 (Wenz, 2017), de 0,30 a 0,45 (Barminski et al., 2016) y de 0,3 a 0,4 (Morillas et al., 2021). Lo anterior orienta a afirmar que los valores aquí obtenidos se encuentran por sobre un promedio o valor deseable, y, por lo tanto, que los fotosistemas del cultivo se encuentran en buen estado.

7. CONCLUSIÓN

La secuencia de ensayos de extracción permitió definir un procedimiento reproducible en donde, con una extracción acuosa de 50 L/kg seguida de una extracción ácida por un minuto a una razón de 17,5 meq H⁺/g se logran extraer al máximo los nutrientes presentes en las cenizas. Cuyas concentraciones facultaron el diseño de un medio de cultivo con todo el requerimiento nutricional necesario para que se desarrolle un cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

El medio de cultivo elaborado a partir de cenizas resultó ser efectivo para el crecimiento de *Anabaena cylindrica*, logrando un aumento sostenido y estable de la biomasa que se compara con el crecimiento usando medios definidos.

De la misma forma, se lograron valores de rendimiento cuántico del PS II similares a los obtenidos por otros autores en medios definidos, lo cual denotó un cultivo en buenas condiciones.

De este modo se logró elaborar un procedimiento reproducible mediante el cual se logra aprovechar las cenizas de madera para el cultivo efectivo de microorganismos fotosintéticos sin necesidad de suplementos de nutrientes, abriendo la posibilidad de utilizar las cenizas de forma masiva para el cultivo a gran escala de cianobacterias.

8. ANEXO

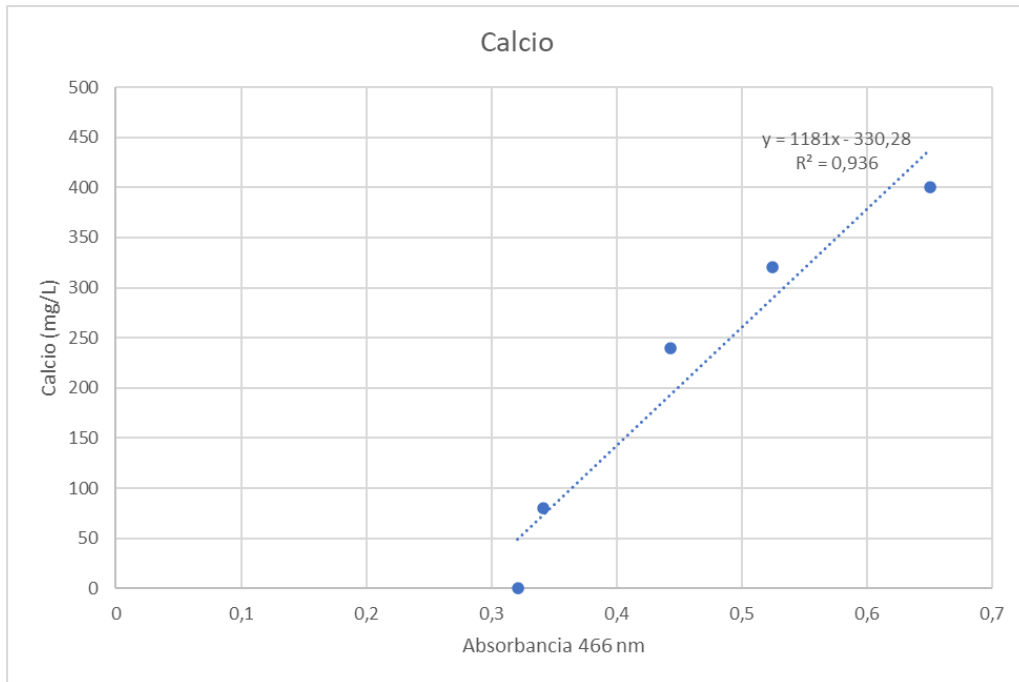


Figura 8.1: Curva de calibrado de concentración de ion calcio.

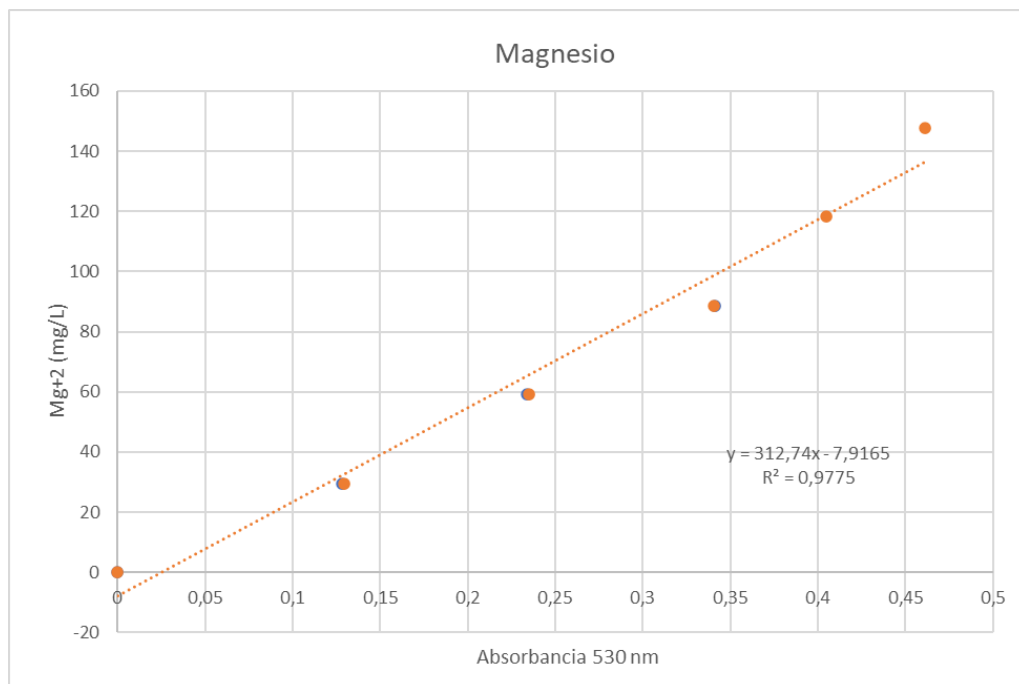


Figura 8.2: Curva de calibrado de concentración de ion magnesio.

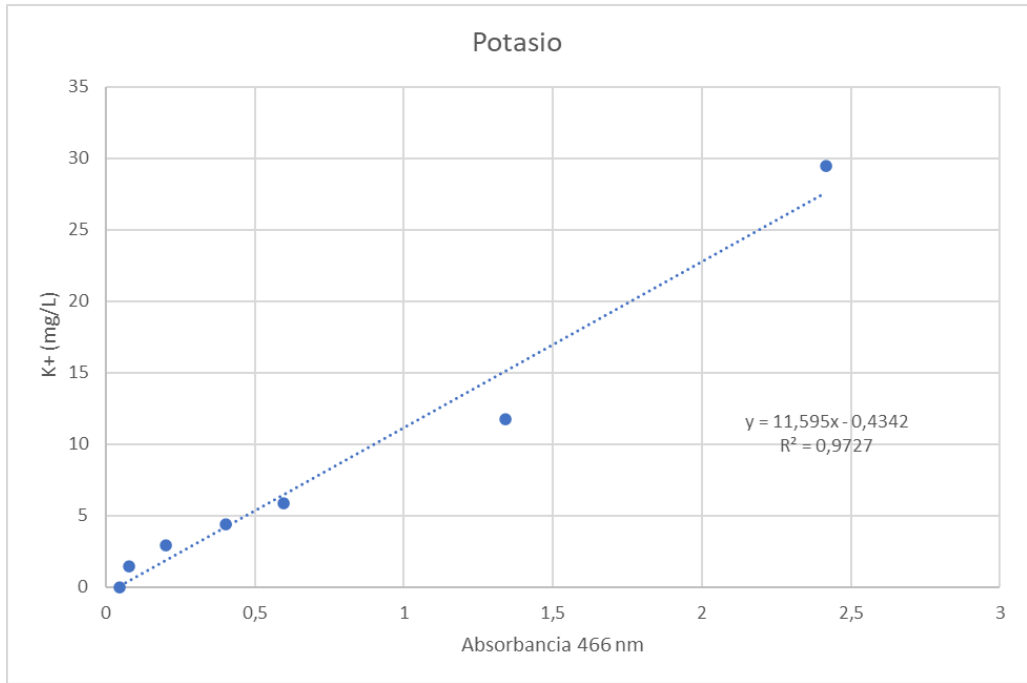


Figura 8.3: Curva de calibrado de concentración de ion potasio.

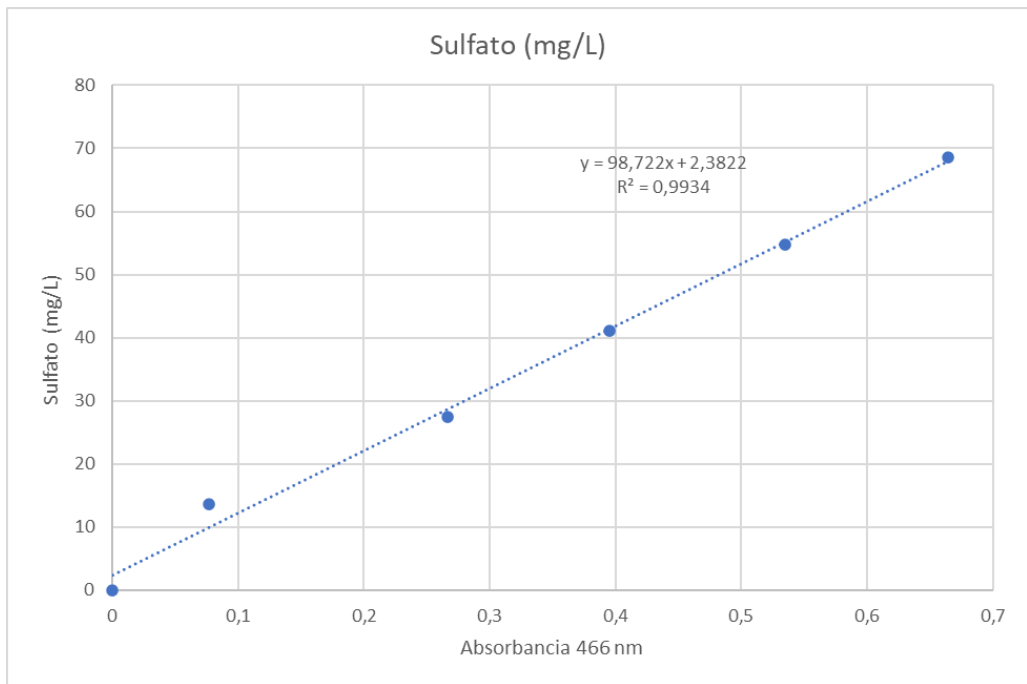


Figura 8.4: Curva de calibrado de concentración de ion sulfato.

9. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, F., Gentina, J. C., & Illanes, A. (2002). Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Ediciones Universitarias de Valparaíso.

Barminski, R., Storteboom, H. & Davis, J.G. Development and evaluation of an organically certifiable growth medium for cultivation of cyanobacteria. *J Appl Phycol* 28, 2623–2630 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0819-2>

Cahuasquí, M. E. L. (2013). Aprovechamiento de lactosuero como enriquecedor de médios de cultivo para el crecimiento de cianobacterias [Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/6638/1/BQ%2039.pdf>

Chia, Mathias & Jankowiak, Jennifer & Kramer, Benjamin & Goleski, Jennifer & Huang, I-Shuo & Zimba, Paul & Bittencourt-Oliveira, Maria do Carmo & Gobler, Christopher. (2018). Succession and toxicity of *Microcystis* and *Anabaena* (*Dolichospermum*) blooms are controlled by nutrient-dependent allelopathic interactions. *Harmful Algae*. 74. 67-77. 10.1016/j.hal.2018.03.002.

Contreras, C., Peña, J. M., Flores, L. B., & Cañizares, R. O. (2013, agosto). AVANCES EN EL DISEÑO CONCEPTUAL DE FOTOBIOREACTORES PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS.

Corporación Nacional Forestal. (2022). Incendios Forestales en Chile. www.conaf.cl. Recuperado 19 de abril de 2022, de <https://www.conaf.cl/incendios-forestales/incendios-forestales-en-chile/>

González, M.E., Sapiains, R., Gómez-González, S., Garreaud, R., Miranda, A., Galleguillos, M., Jacques, M., Pauchard, A., Hoyos, J., Cordero, L., Vásquez, F., Lara, A., Aldunce, P., Delgado, V., Arriagada, Ugarte, A.M., Sepúlveda, A., Farías, L., García, R., Rondanelli, R.,J., Ponce, R.,Vargas, F., Rojas, M., Boisier, J.P., C., Carrasco, Little, C., Osses, M., Zamorano, C., Díaz-Hormazábal, I., Ceballos, A., Guerra, E., Moncada, M., Castillo, I . (2020). Incendios forestales en Chile: causas, impactos y resiliencia. Centro de Ciencia del Clima y la Resiliencia (CR)2, (ANID/FONDAP/15110009), 84 pp. Disponible en <https://www.cr2.cl/incendios/>

Maresca, A., Hyks, J., & Astrup, T. F. (2017). Recirculation of biomass ashes onto forest soils: ash composition, mineralogy and leaching properties. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.008>

Martigani, F. (2012). Influencia de la deficiencia por nutrientes en el crecimiento y la producción de toxinas de una cianobacteria invasora [Universidad de la República]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1439/1/uy24-15607.pdf>

Morillas-España, A., Ana, G.-S., Sánchez-Zurano, C., Ciardi, M., Ación, G., Clagnan, E., Adani, F., & Lafarga, T. (2021). Potential of the cyanobacteria *Anabaena* sp. and *Dolichospermum* sp. for being produced using wastewater or pig slurry: Validation using pilot-scale raceway reactors [Universidad de Almería]. <https://repositorio.ual.es>

Pinto, C. (2019). FACTORES QUE AFECTAN EN EL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA EN LAS CENIZAS GENERADAS EN LA CALDERA DE PODER [Universidad del Bío-Bío]. http://repobib.ubiobio.cl/jspui/bitstream/123456789/3460/1/Pinto_Luengo_Constanza_Daniela.pdf

Qin, H., Peng, C., Liu, Y. and Li, D. (2012), DIFFERENTIAL RESPONSES OF ANABAENA SP. PCC 7120 (CYANOPHYCEAE) CULTURED IN NITROGEN-DEFICIENT AND NITROGEN-ENRICHED MEDIA TO ULTRAVIOLET-B RADIATION. *Journal of Phycology*, 48: 615-625. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01162.x>

Rodríguez, H. (2023, 3 enero). El verdadero pulmón del planeta está en los océanos. www.nationalgeographic.com.es. https://www.nationalgeographic.com.es/naturaleza/verdadero-pulmon-planeta-esta-oceanos_14776

Rossi, F., Li, H., Liu, Y., & de Philippis, R. (2017, agosto). Cyanobacterial inoculation (cyanobacterisation): Perspectives for the development of a standardized multifunctional technology for soil fertilization and desertification reversal. *Earth-Science Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.05.006>

Wang, W., Liu, Y., Li, D., Hu, C., Rao, B., 2009. Feasibility of cyanobacterial inoculation for biological soil crusts formation in desert area. *Soil Biol. Biochem.* 41, 926–929. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.001>. (Science Goes Underground in China).

Wenz, J. (2017). THE INFLUENCE OF OUTDOOR LIGHT ON BIOMASS, NITROGEN, AND PHYTOHORMONE CONCENTRATIONS OF A NITROGEN-FIXING ANABAENA SP. CYANOBACTERIUM [Colorado State University].
<https://api.mountainscholar.org/server/api/core/bitstreams/8892514d-5981-43df-8f6d-ca679ae5371f/content>