

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

**RECUPERACIÓN DE Ni Y Co DE LATERITA FERRUGINOSA DEL  
ESTADO COJEDES A TRAVÉS DE LA BIOLIXIVIACIÓN CON  
CULTIVOS DE *Aspergillus niger***

Presentado Ante la Ilustre  
Universidad Central de  
Venezuela para optar el Título  
De Ingeniero Metalúrgico  
Por los Brs. Castillo, Guillermo  
y Villafañe, Claudia

Caracas, 2003

## **TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

# **RECUPERACIÓN DE Ni Y Co DE LATERITA FERRUGINOSA DEL ESTADO COJEDES A TRAVÉS DE LA BIOLIXIVIACIÓN CON CULTIVOS DE *Aspergillus niger***

TUTOR ACADEMICO: Prof. Di Yorio, Carlo.

TUTOR INDUSTRIAL: Dr. Dorta Blas.

ASESOR: Dr. Rus Jose

Presentado Ante la Ilustre  
Universidad Central de  
Venezuela para optar el Titulo  
De Ingeniero Metalúrgico  
Por los Brs. Castillo, Guillermo  
y Villafañe, Claudia

Caracas, 2003

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a:

En primer lugar, a nuestros padres por todo el apoyo y comprensión brindada en todo momento, sin los cuales no hubiésemos logrado culminar esta etapa de nuestras vidas.

En especial al profesor Blas Dorta, por habernos brindado toda su colaboración, atención y ayuda incondicional, que sirvió de guía durante toda la realización de este trabajo.

Nuestro tutor, el profesor Carlo Di Yorio, por habernos dado la oportunidad de trabajar en este proyecto, además por guiarnos durante la realización de este trabajo.

Nuestros compañeros Katherine Martinez y Domenico Pavone por guiarnos y ayudarnos de manera incondicional, en el desarrollo experimental de este trabajo.

Marcial Pérez por dedicar parte de su tiempo a ayudarnos, y con el cual compartimos momentos agradables.

La profesora Olivia Brito por ser una excelente guía durante toda la carrera.

Agradecemos la colaboración prestada por las personas que integran el laboratorio de Microbiología y en especial a la profesora Carmen “Conchita,” del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, sin la cual no hubiésemos culminado este trabajo.

Nuestros amigos Edgar Betancourt y Renny Vivas, por la ayuda que nos prestaron en los momentos más difíciles.

Al profesor José Rus por su atención y por habernos guiado durante el desarrollo de este trabajo.

Marcel Graterol y Maryu Plata, por su compañía y comprensión en todo momento, especialmente en los críticos.

Por último, agradecemos a todas aquellas personas que de una manera u otra, ayudaron a la culminación de este trabajo.

## RESUMEN

En este trabajo, se realizó el estudio a escala de laboratorio, utilizando el método de biolixiviación dinámica con cultivos *Aspergillus niger* de manera indirecta y directa, analizando las variables del proceso, y de esta forma poder evaluar la viabilidad técnica de este método. El mineral fue sometido a una caracterización química-mineralógica con el fin de establecer metodologías apropiadas para su procesamiento. Por último, se evaluaron la extracción del níquel, cobalto y hierro a fin de analizar la selectividad y eficiencia del proceso. Una vez caracterizado el mineral, se procedió al estudio del crecimiento de *A. niger* en distintos medios nutritivos, variando las condiciones de incubación, con la finalidad de optimizar la producción de ácidos orgánicos por este microorganismo. Posteriormente, se llevaron a cabo los estudios de lixiviación química con ácidos orgánicos comerciales (ácido cítrico y oxálico), variando la densidad de pulpa, y de esta manera poder evaluar la efectividad de estos ácidos como solución lixivante y el efecto de la densidad de pulpa en la disolución de los metales de interés. Estudios de biolixiviación indirecta, fueron llevados a cabo usando como solución lixivante extractos libres de células, obtenidos durante el estudio del crecimiento de *A. niger*. Por último, los estudios de biolixiviación directa, se realizaron con cultivos sumergidos en distintos medios nutritivos. También se realizó un ensayo exploratorio de biolixiviación directa en fermentación sólida, en condiciones estáticas, utilizando un medio nutritivo de germen desgrasado de maíz con cáscara de arroz, en proporción 1:1.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede decir que la biolixiviación con *A. niger* es un proceso selectivo para la recuperación de níquel y cobalto, lo cual es ideal en los procesos de lixiviación. El proceso de biolixiviación directa en medio de sales fue el más efectivo de los procesos estudiados, alcanzándose una recuperación de 20% de níquel, 95% de cobalto y 3.4% de hierro, a los 28 días de lixiviación.

Como conclusión se tiene que, el cobalto presente en el mineral es altamente susceptible a la biolixiviación con cultivos de *A. niger*, mientras que el níquel es poco susceptible. El ácido cítrico fue el más efectivo de los ácidos orgánicos comerciales en la extracción de níquel y cobalto, además, también se observó que un incremento en la densidad de pulpa produce un efecto negativo en la disolución del mineral laterítico. Por último, el medio de sales es el más eficiente para el crecimiento de *A. niger* y para la producción de ácido cítrico.

Por último, se recomienda el pretratamiento del mineral con la finalidad de aumentar la susceptibilidad del níquel a la biolixiviación, a la vez que, la biolixiviación directa con medio de germen desgrasado de maíz debe ser optimizada, ya que este medio presenta características apropiadas para ser utilizado en procesos a gran escala.

Palabras claves: Biolixiviación, níquel, cobalto, *A. niger*, medio de cultivo, crecimiento, metabolismo, incubación.

## INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. FUNDAMENTO TEORICO.....	3
2.1. El Níquel.....	3
2.1.1. Propiedades.....	4
2.1.2. Minerales de níquel.....	5
2.1.2.1. Lateritas.....	6
2.1.3. Menas de níquel.....	6
2.2. El Cobalto.....	7
2.2.1. Propiedades.....	9
2.3. Procesos convencionales de obtención del níquel y cobalto.....	9
2.3.1. Proceso Pirometalúrgico.....	10
2.3.2. Proceso Hidrometalúrgico.....	12
2.3.2.1. Lixiviación.....	12
2.3.2.2. Tipos de lixiviación.....	13
2.4. Biolixiviación.....	14
2.4.1. Microorganismos.....	15
2.4.2. Clasificación de los microorganismos.....	16
2.4.3. Clasificación de los microorganismos lixiviantes.....	18
2.4.3.1 <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> .....	19
2.4.3.2. <i>Aspergillus niger</i> .....	20
2.4.3.2.1. Factores que intervienen en la producción del ácido cítrico.....	22
2.4.4. Crecimiento microbiano.....	25
2.4.4.1. Ciclo de Crecimiento Microbiano.....	25
2.4.5. Biolixiviación de minerales sulfurados.....	28
2.4.5.1. Mecanismo indirecto.....	29
2.4.5.2. Mecanismo directo.....	30
2.4.5.3. Factores que influyen en la disolución de los minerales.....	30

2.4.6. Biolixiviación de minerales oxidados.....	31
2.4.6.1. Mecanismo de acción.....	33
2.4.6.2. Lixiviación química.....	33
2.4.6.3. Lixiviación biológica.....	35
2.4.6.4. Influencia de los factores ambientales.....	36
2.4.6.5. Remoción de hierro.....	40
2.4.6.6. Clasificación física de la Biolixiviación.....	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.1. Mineral.....	46
3.1.1. Recolección de muestras.....	46
3.1.2. Caracterización del mineral.....	47
3.1.2.1. Homogenización.....	47
3.1.2.2. Caracterización Visual.....	48
3.1.2.3. Análisis químico cuantitativo.....	48
3.1.3. Preparación física de la muestra .....	49
3.1.3.1. Clasificación granulométrica .....	49
3.1.3.2. Reducción de tamaño.....	49
3.2. Microorganismo.....	50
3.2.1. Medios de cultivo.....	51
3.2.1.1. Medio de sales (MS) .....	51
3.2.1.2. Medio de Germen desgrasado de Maíz (MG) .....	51
3.2.2. Preparación de los inóculos.....	51
3.2.3. Cultivos Sumergidos.....	52
3.2.3.1. En matraces erlenmeyer.....	52
3.2.3.2. En Tanque de Fermentación.....	52
3.2.4. Determinación de la biomasa en los cultivos sumergidos.....	53
3.2.4.1. Directa por gravimetría.....	53
3.2.4.2. Indirecta por el método de Ride y Drysdale.....	54
3.2.5. Determinación del pH y la acidez de los cultivos sumergidos.....	54
3.2.6. Determinación de la concentración de ácidos orgánicos.....	55

3.3. Lixiviación Química con ácidos orgánicos comerciales.....	55
3.4. Biolixiviación.....	56
3.4.1. Biolixiviación Indirecta.....	56
3.4.2. Biolixiviación Directa.....	57
3.4.2.1. Biolixiviación Directa en cultivo sumergido.....	57
3.5. Ensayo exploratorio.....	58
3.5.1. Biolixiviación directa en fermentación sólida .....	58
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	60
4.1. Mineral.....	60
4.1.1. Caracterización del mineral.....	60
4.1.2. Análisis químico cuantitativo.....	62
4.1.3. Clasificación granulométrica.....	62
4.2. Microorganismo.....	65
4.2.1. Concentración de ácidos orgánicos producidos por <i>A. niger</i> .....	74
4.3. Lixiviación química con ácidos orgánicos comerciales.....	75
4.4. Biolixiviación.....	78
4.4.1. Biolixiviación indirecta.....	78
4.4.2. Biolixiviación directa.....	83
4.4.2.1. Directa en cultivo sumergido.....	83
4.4.2.1.1. Concentración de ácidos orgánicos producidos por <i>A. niger</i> en presencia de mineral.....	88
4.5. Coeficientes de selectividad.....	89
4.6. Ensayo exploratorio.....	91
4.6.1. Biolixiviación directa en fermentación sólida.....	91
5. CONCLUSIONES.....	94
6. RECOMENDACIONES.....	96

7. BIBLIOGRAFIA..... 97

GLOSARIO..... 99

ANEXOS



## 1. INTRODUCCION

En la actualidad, las principales reservas mundiales de níquel están en forma de lateritas. Sin embargo, hoy día el níquel se obtiene a partir de los minerales sulfurados debido a que las lateritas son difíciles de concentrar. Por otro lado la energía requerida para procesar industrialmente las lateritas es superior a la necesaria para recuperar el níquel de una cantidad similar en un mineral sulfurado. Una ventaja del tratamiento de las lateritas es que se localizan muy cerca de la superficie. El níquel obtenido de los sulfuros se caracteriza por un alto costo de minería y moderado costo para su procesamiento. Actualmente, los métodos utilizados para la concentración de níquel requieren tecnologías sofisticadas, gran consumo de energía y generalmente producen una gran contaminación ambiental. Debido a todo esto, en este trabajo se realizó un estudio de un método biohidrometalúrgico de bajo impacto ambiental y económicamente rentable, para la obtención de níquel y cobalto a partir de laterita.

Venezuela cuenta con depósitos de lateritas níquelíferas como el depósito de Loma de Níquel, cerca de la población de Tacata, Estado Aragua, con reservas calculadas para 30 años de explotación a un tenor promedio de 1,57% de níquel. Esta mina está siendo explotada en la actualidad por vía pirometalúrgica.

Por otro lado, se tienen los depósitos de Tinaquillo, Estado Cojedes, los cuales no cuentan con semejantes volúmenes de reserva, ni están siendo explotados actualmente. Sin embargo, con el estudio y desarrollo de esta nueva vía de biolixiviación para lateritas níquelíferas, se podrán fijar las bases para la posible explotación de estos depósitos, así como también, las bases para estudios posteriores en busca del máximo rendimiento del proceso.

Los antecedentes sobre la biolixiviación de lateritas níquelíferas, se remiten a procesos a escala de laboratorio, donde han aplicado la lixiviación química con ácidos

orgánicos comerciales, entre los cuales se destaca el ácido cítrico, y han utilizado diversos microorganismos de manera directa e indirecta, entre ellos, destacan el género *Aspergillus* y *Penicillium*. Trabajos similares fueron realizados por P.G. Tzeferis y col., sobre la lixiviación de níquel y hierro de mineral niquelífero oxidado por ácidos orgánicos, donde se obtuvieron las mayores recuperaciones con ácido cítrico. I.M. Castro y col. sobre la biolixiviación de níquel y zinc de silicatos usando cultivos de *A. niger*, obteniendo los mejores resultados con la biolixiviación directa. Por otro lado, el estudio realizado por O. Coto y col., sobre biolixiviación de serpentinita niquelífera de Cuba, quienes obtuvieron los mejores resultados usando cultivos de *A. niger*.

En este trabajo, se realizó un estudio a escala de laboratorio, utilizando el método de biolixiviación dinámica con cultivos *Aspergillus niger* de manera indirecta y directa, analizando las variables del proceso, y de esta forma evaluar la viabilidad técnica de este método. El mineral es sometido a una caracterización química-mineralógica con el fin de establecer metodologías apropiadas para el procesamiento del mineral. Por último, se evalúan la extracción del níquel, cobalto y hierro con el fin de analizar la selectividad y eficiencia del proceso.

## 2. FUNDAMENTO TEORICO

### 2.1. El Níquel

El níquel es un elemento metálico magnético, de aspecto blanco plateado, utilizado principalmente en aleaciones. Es uno de los elementos de transición del sistema periódico y su número atómico es 28. En la corteza terrestre se encuentra en un  $8,4 \times 10^{-3}\%$  en peso, ocupando el lugar 22 en abundancia entre los elementos de la tierra.

El níquel se ha utilizado en la acuñación de monedas en aleaciones de níquel y cobre, pero no fue reconocido como sustancia elemental hasta el año 1751, cuando el químico sueco, A. Cronstedt, consiguió aislar el metal de una mena de niquelina. Sin embargo, no fue hasta el año de 1804 cuando se logró obtener el níquel en su forma metálica. Sin embargo, mucho antes de esto ya era utilizado en aleaciones hierro-níquel, según análisis químicos realizados a artefactos encontrados tales como armas, herramientas y monedas, las cuales contenían níquel en cantidades variables. Los chinos en la era antes de Cristo, lo utilizaban en utensilios de la casa e instrumentos, y era denominado cobre blanco. También los chinos realizaban una aleación de níquel-cobre que le añadían zinc para construir utensilios decorativos como candelabros para posteriormente ser comercializados [1].

El níquel es un metal duro, maleable y dúctil, que puede presentar un intenso brillo. Tiene propiedades magnéticas por debajo de  $345\text{ }^{\circ}\text{C}$ . y es un buen conductor del calor y la electricidad (1/4 del cobre). Es estable al aire y al agua. Aparece bajo cinco formas alotrópicas diferentes. El níquel metálico no es muy activo químicamente. Es fácilmente soluble en ácido nítrico diluido, y se convierte en pasivo (no reactivo) en ácidos oxidantes concentrados. Los no oxidantes lo atacan lentamente y los hidróxidos alcalinos no lo atacan.

Actualmente, la principal aplicación a escala industrial del níquel es en aleaciones de acero inoxidable donde se utiliza aproximadamente 57% de la producción mundial. El

uso en aleaciones es debido a que aporta dureza, tenacidad y gran resistencia a la corrosión. El níquel puro se utiliza en la fabricación de baterías alcalinas, aparatos de laboratorio, galvanoplastia, monedas, imanes, electrodos, soldadura, bujías, instrumental odontológico y quirúrgico. También es usado como catalizador en hidrogenaciones para obtención de margarinas y grasas sólidas a partir de aceites líquidos. En las plantas desalinizadoras de agua del mar se emplean tuberías de aleaciones de cobre y níquel. Otros usos importantes son la fabricación de monedas, blindajes, cámaras acorazadas [1].

Las aleaciones de níquel presentan gran diversidad de aplicaciones, debido a que presentan resistencia a la corrosión y al calor, a continuación se presentan algunas de ellas:

- Turbinas de gas de avión.
- Turbinas de vapor en plantas de generación eléctrica.
- Procesamientos de metales.
- Aplicaciones médicas.
- Equipos de tratamientos térmicos.
- Industria química y petroquímica.
- Sistemas de gasificación.
- Válvulas, cableado, galvanizado (niquelado).

Entre los compuestos de níquel, el sulfato y los óxidos son los más importantes. Se emplean en el coloreado de verde de los vidrios así como también en cerámicas. Los hidróxidos de níquel se emplean en las baterías de níquel - cadmio.

### **2.1.1 Propiedades**

A continuación se presentan las principales propiedades físico-químicas del níquel:

**Tabla 2.1.** Propiedades físico-químicas del níquel [1].

Símbolo: Ni

Radio Atómico: 1,149 Å

Valencia: 2, 3

Numero Atómico: 28

Peso Atómico: 58.69

Punto de Fusión (°C): 1455

Punto de Ebullición (°C): 2913

Densidad a 20 °C (kg/m<sup>3</sup>): 8900

Capacidad calorífica (Ni sólido de 20 a 1450 °C): 0,134 cal/gr.

Calor específico a 100 °C: 0,1123 cal/gr.

Coefficiente de dilatación térmica a 0 - 100 °C: 0,0000133

Resistividad eléctrica a 20 °C: 6,844 ohm\*cm.

Temperatura de transformación magnética: 353 °C

Modulo de elasticidad

En tracción:  $21,09 \cdot 10^3$  Kg/cm<sup>2</sup>

En torsión:  $773 \cdot 10^3$  Kg/cm<sup>2</sup>

Volumen atómico (cm<sup>3</sup>/mol): 6,60

Estructura: f.c.c.

### **2.1.2. Minerales de níquel**

El mineral de níquel se encuentra comúnmente presentado en dos tipos de depósitos una en forma de sulfuros, en donde la más conocida es la pentlandita (Ni,Fe)<sub>3</sub>S<sub>8</sub>. La otra forma que tienen los minerales de níquel son las lateritas donde los minerales de la mena principales son limonita niquelífera ((Fe,Ni)O(OH)) y garnierita ((Ni,Mg)<sub>3</sub>H<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>11</sub>), la cual es un silicato doble de níquel y magnesio que siempre contiene hierro y cobalto [2]. También existen otros tipos de minerales asociados al níquel como son: millerita (NiS), niquelina (NiAs), gersdorffita (NiAsS), ullmanita (NiSbS), rammelsbergita (NiAs<sub>2</sub>),

cloantita ( $\text{NiAs}_2$ ), annabergita [ $\text{Ni}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ], forbesita [ $(\text{Ni},\text{Co})\text{HAsO}_4$ ], maucherita [ $\text{Ni}_4\text{As}_3$ ].

### **2.1.2.1. Lateritas**

La palabra laterita proviene del latín “latericius” que significa ladrillo. Las lateritas son depósitos heterogéneos que se localizan principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de la Tierra. Ellas presentan un contenido en níquel, entre 0.3 % y 1.5 %, con una alta concentración de hierro, aunque pueden contener algunos elementos de interés como cobalto, aluminio, y otros. Las principales reservas de níquel mundial están en forma de lateritas. Sin embargo, en la actualidad el níquel se obtiene a partir de los minerales sulfurados debido a que las lateritas son difíciles de concentrar. Por otro lado la energía requerida para procesar industrialmente las lateritas es superior a la necesaria para recuperar el níquel de una cantidad similar en un mineral sulfuroso. Una ventaja del tratamiento de las lateritas es que se localizan muy cerca de la superficie. El níquel obtenido de los sulfuros se caracteriza por un alto costo de minería y moderado costo para su procesamiento [3].

El tratamiento de lateritas por métodos pirometalúrgicos consume gran cantidad de energía. También pueden ser tratadas por métodos hidrometalúrgicos, que necesitan menos energía pero requieren de tecnologías sofisticadas. Debido a esto se hace necesaria la búsqueda de nuevos métodos hidrometalúrgicos.

### **2.1.3. Menas de níquel**

Las menas de níquel comúnmente son oxidadas o sulfuradas, y no se encuentran unidas, cada una de ellas forman yacimientos independientes y las menas extraídas se tratan en las plantas metalúrgicas aplicando procesos tecnológicos diferentes.

La distribución de los depósitos de menas de níquel a nivel mundial es muy variada, el más grande y más conocido está en Ontario, Canadá, que posee una mena sulfurada.

Otros depósitos de este tipo de menas se encuentran en Minesota, Sudáfrica, Rusia, Finlandia y Australia Occidental. Con respecto a la distribución de las menas lateríticas niquelíferas, estas se encuentran en regiones tropicales húmedas, como Cuba, Australia, Brasil y Venezuela. Las que poseen mayor renombre son las de Moa Bay y Nicaro en Cuba [2].

Las menas de lateritas niquelíferas se clasifican en dos tipos como son la saprofitas y las limoníticas siendo silicatos y óxidos respectivamente. Estos tipos de mineral son extraídos de diferentes zonas de lateritas y poseen características mineralógicas diferentes y pueden ser tratadas por rutas tecnológicas distintas [4].

## **2.2. El Cobalto**

El cobalto es un elemento metálico, magnético, de color blanco plateado, usado principalmente para obtener aleaciones. Su número atómico es 27 y es uno de los elementos de transición del sistema periódico. El cobalto constituye el  $2.3 \times 10^{-3}\%$  de la corteza terrestre, ocupando el lugar 30 en abundancia entre los elementos de la corteza.

El cobalto fue descubierto en 1735 por el químico sueco George Brandt. Tiene poca solidez y escasa ductilidad a temperatura normal, pero es dúctil a altas temperaturas. El cobalto es un metal duro, quebradizo, muy parecido al hierro y níquel. Ferromagnético, con un punto de Curie de 1150 °C. Su permeabilidad magnética es 2/3 de la del hierro. Su conductividad eléctrica es 1/4 de la del cobre. Es estable al aire y el agua a temperatura ambiente. Reacciona fácilmente con los halógenos y elementos del grupo del nitrógeno. Se disuelve fácilmente en ácidos oxidantes diluidos; los oxidantes concentrados dan lugar a una capa de pasivación que lo protegen. Los ácidos no oxidantes lo atacan lentamente. Presenta dos formas alotrópicas  $\alpha$  (hexagonal) y  $\beta$  (cúbica), produciéndose la transición hacia los 400°C [5].

La principal aplicación del cobalto es en aleaciones. Las aleaciones resistentes a la temperatura, llamadas superaleaciones, contienen cobalto y se emplean en la industria y en las turbinas de los aviones. Una aleación con acero llamada acero de cobalto se utiliza para fabricar imanes permanentes. Con el carburo de wolframio el cobalto forma el carboloy, un material resistente usado para cortar y trabajar el acero. También se emplea en la industria de la cerámica y en el secado de pinturas, así como de catalizador.

De los distintos isótopos de cobalto conocidos, el cobalto 60 radioactivo es el más importante. Tiene una vida media de 5,7 años y produce una intensa radiación gamma. El cobalto 60 se utiliza ampliamente en la industria y en la terapia radioisotópica.

Entre sus compuestos: Las sales de cobalto y potasio (silicatos y aluminatos) se han empleado para la obtención de colores azules (azul de Sevres y Thenard) en porcelanas, vidrios, alfarería, azulejos y esmaltes.

El óxido de cobalto se utiliza en la industria del vidrio, porcelana y esmaltes. Una solución de cloruro de cobalto se utiliza como tinta que cambia de color según las condiciones de humedad (anhidro es azul e hidratado es rojo). Otros usos importantes son la síntesis de vitamina B<sub>12</sub> y catalizadores. En la industria química, el cobalto se utiliza en la catálisis homogénea y heterogénea para sintetizar combustibles [5].

El cobalto y sus compuestos presentan gran diversidad de aplicaciones, debido a sus propiedades, a continuación se presentan algunas de ellas:

- Turbinas de aviones resistentes a la fricción.
- Imanes permanentes.
- Cerámicas y vidrios especiales.
- Aplicaciones médicas (prótesis dentarias y óseas).
- Ingeniería y medicina nuclear.
- Industria química.

### **2.2.1. Propiedades**



A continuación se presentan las principales propiedades físico-químicas del cobalto:

**Tabla 2.2.** Propiedades físico-químicas del cobalto [5].

Símbolo: Co

Radio Atómico: 1.16 Å

Valencia: 2, 3

Numero Atómico: 27

Peso Atómico: 58.93

Punto de Fusión (°C): 1495

Punto de Ebullición (°C): 2927

Densidad a 20 °C (kg/m<sup>3</sup>): 8870

Calor específico a 100 °C: 0,098 cal/gr.

Temperatura o punto de Curie (°C): 1150.

Volumen atómico (cm<sup>3</sup>/mol): 6,7

Estructura: h.c.p.

El cobalto, comúnmente, se obtiene por tostado parcial de minerales sulfurosos en presencia de fundentes. La materia prima resultante contiene sulfuros y arseniuros de Co, Ni y Cu en mayores concentraciones. Para el procesamiento posterior, la materia prima se calienta en presencia de NaCl [5].

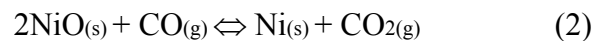
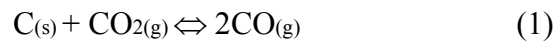
### **2.3. Procesos convencionales de obtención del níquel y cobalto**

Para la obtención del níquel y cobalto hay varios procesos que han sido implementados, los cuales son el Pirometalúrgico, Lixiviación ácida a presión, Lixiviación amoniacal. La elección del tipo de proceso depende de las características de la mena de interés.

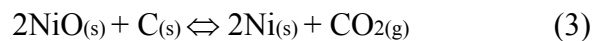
#### **2.3.1. Proceso Pirometalúrgico**

Es el principal método de procesamiento de los minerales níquelíferos, tanto de óxidos como sulfuros, con formación de mata de níquel, la que luego se oxida en un convertidor. Oxidando la mata de níquel, proveniente del procesado de minerales de óxidos libres, se obtiene NiO con una pureza de 98%.

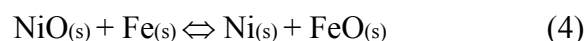
Según Szczygiel [6], el níquel es un metal metalúrgicamente noble y su óxido es fácilmente reducible. En la industria el níquel se obtiene en estado líquido lo cual, requiere temperaturas superiores a su punto de fusión de 1455 °C. El proceso de reducción se realiza en horno eléctrico de arco en el cual, se carga con la mata de níquel junto con carbón como reductor. Las reacciones más importantes del proceso son la reacción de Boudouard [6] y la de reducción:



De acuerdo con el alto valor de la constante de equilibrio  $K_{eq} = P_{\text{CO}_2}/P_{\text{CO}}$ , se puede escribir la reacción general de reducción del óxido de níquel de siguiente manera:



Los yacimientos de níquel se caracterizan por el alto contenido de hierro, y por esta razón, los minerales oxidados ricos en níquel se utilizan para producción directa de ferroníquel en hornos eléctricos, en los cuales el reductor empleado son finos de coque. Al final se obtiene ferro-níquel de una composición de 80-85% de Fe, 7 a 9% de Ni, 4 a 5% de SiO<sub>2</sub> y alrededor 1% de C. Durante este proceso, parte del hierro puede pasar a la escoria debido a la siguiente reacción:



En el caso de una mena pobre de níquel, con un contenido de más o menos el 1%, el método descrito: Mineral  $\Rightarrow$  Mata  $\Rightarrow$  Mata concentrada  $\Rightarrow$  Oxido de níquel; es antieconómico [4].

La obtención de níquel de un alto grado de pureza (aproximadamente 99,4 a 99,7%), es posible mediante la refinación electrolítica de los ánodos colados de níquel bruto, los cuales contienen impurezas tales como cobalto, cobre, hierro, azufre y metales nobles. La electro-refinación posibilita el beneficio de los metales noble contenidos en el níquel bruto.

El níquel más puro, de un contenido de alrededor 99,9%, se obtiene en el llamado proceso del carbonilo, el cual se basa en la reacción reversible de la formación de ciertos compuestos de níquel, hierro y cobalto con el monóxido de carbono, es decir, carbonilos. El tetra carbonilo de níquel  $\text{Ni}(\text{CO})_4$  funde a 25 °C, ebulle a 45 °C y se descompone a 180 - 200 °C, de acuerdo a la reacción:



Por medio de este método, es posible separar el níquel de metales como el cobre, el cual no forma carbonilo. A fin de separar al níquel del cobalto y el hierro, aprovechando las diferencias en las temperaturas de ebullición y descomposición de los respectivos carbonilos, así como también se emplea la destilación fraccionada de los mismos.

Los procesos a base de carbonilos no han encontrado gran aplicación, ya que se requiere de aparatos e instalaciones complicadas por la alta toxicidad del monóxido de carbono y de los mismos carbonilos [6].

### **2.3.2. Proceso Hidrometalúrgico**

Cuando el proceso pirometalúrgico no es viable para la explotación de menas níquelíferas, debido a aspectos económicos, se hace necesario la implementación de otros procesos. La lixiviación es la técnica más utilizada en estos casos.

#### **2.3.2.1. Lixiviación**

Es un proceso mediante el cual se extraen un elemento o compuesto de interés por medio de una disolución (ataque químico). La lixiviación ideal es aquella en donde el agente lixivante, el cual es el encargado de disolver el útil, ataca selectivamente al compuesto o elemento de interés. Por lo general para que la lixiviación sea un proceso ideal requieren de un equipamiento que permita alcanzar las condiciones ideales, este equipamiento es por lo general bastante costoso y por esta razón se justifica la inversión si la producción así lo amerita. Sin embargo en la mayoría de los procesos de lixiviación tienden a solubilizar más de un elemento de interés, esto implica un consumo de adicional del agente lixivante y una contaminación del licor lo que aumenta los costos. Por tal motivo se busca un equilibrio entre las condiciones necesarias para que se de una lixiviación ideal y el factor económico, buscándose así las mejores condiciones de lixiviación para los menores costos de operación.

Previo a lo descrito anteriormente, se debe realizar un estudio físico-químico para garantizar, que el proceso sea factible. Los factores que corresponden a la viabilidad son las reacciones químicas y electroquímicas.

Las reacciones químicas y electroquímicas de lixiviación deben ser estudiadas tanto desde el punto de vista termodinámico como cinético, para que las condiciones generales de la lixiviación puedan ser predecidas. La termodinámica de la lixiviación es generalmente manejada a través del diagrama de Pourbaix, estos presentan las regiones de estabilidad o el dominio de las soluciones iónicas disueltas y de las fases sólidas, relativo al potencial de óxido reducción y al pH.

Sin embargo la termodinámica de la lixiviación solo nos proporciona información certera de que el proceso se pueda dar o no, con el inconveniente de que no es sabido el tiempo en que la reacción ocurra. Este dato es arrojado por la cinética, la cual a su vez depende en estos casos de las siguientes etapas que ocurren entre el sólido y la solución:

- a) Transporte del reactante a la interfase sólido – líquido.
- b) Reacción en la interfase, carácter químico o electroquímico.
- c) Transporte de los productos de reacción desde la interfase hasta la solución.

En muchos casos, de estas tres etapas la más lenta es el transporte de los productos, y su vez es la que controla la cinética del proceso.

Después de hacer el estudio físico-químico de la lixiviación, se procede a examinar los factores comerciales, los cuales son: la cantidad de reservas del mineral, concentración del útil, costos de minería, cualidades del terreno, costo de equipos de lixiviación y características del mineral, las cuales definirán si el proyecto sea realizado o no.

### **2.3.2.2. Tipos de lixiviación**

Los modos lixiviación son muy variados, pero el caso de lixiviación de menas de níquel se han especializado en dos tipos, las cuales son la lixiviación ácida a presión y la lixiviación amoniacal.

- Lixiviación ácida a presión: El proceso se realiza con ácido, donde la especie de interés es susceptible al contacto con este. Generalmente la lixiviación del níquel en lateritas se produce con ácido sulfúrico, solo en los casos que las menas a tratar poseen bajo contenido de Mg y Sílice [7].

La Freeport Nickel Co. desarrolló un proceso de disolución con ácido sulfúrico para los depósitos lateríticos de Moa Bay, en Cuba, que predominantemente son de tipo limonítico, baja en magnesio y altos en cobalto, usando temperaturas y presiones elevadas.

Lo resaltante de este proceso esta en la selectividad de lixiviación del níquel y el cobalto del mineral, rico en hierro [8].

- Lixiviación Amoniacal: Los minerales de níquel de alto contenido de elementos que consumen el ácido sulfúrico (Mg, silicatos) se pueden tratar por el método de tostación reductora-lixiviación amoniacal. Esta lixiviación es más selectiva pero exige altas temperaturas (800 °C) y equipamientos más especializados.

Este proceso es operado en gran escala en Nicaro (Cuba) [9]. El proceso esta basado en la patente americana 1.487.145 publicada el 18 de marzo de 1924, siendo el autor de esta M. H. Caron. En el proceso la mena se somete a una tostación reductora seguida de un enfriamiento en condiciones no oxidantes, lixivando luego en una solución amoniacal y después calentando la solución fértil para recuperar el níquel y el cobalto como precipitado.

#### **2.4. Biolixiviación**

La lixiviación bacteriana o biolixiviación consiste en la disolución o solubilización de metales a partir de distintas materias primas, generalmente sulfuradas por la acción directa o indirecta de los microorganismos. Esta operación se incluye en la hidrometalurgia, y más concretamente en la biohidrometalurgia, debido a la participación activa de los microorganismos en el proceso. Finalmente, la operación también es conocida como de naturaleza geomicrobiológica. Cabe destacar que en el presente trabajo, se estudiará la viabilidad y la factibilidad técnica de la biolixiviación, para luego relacionarla con su posible explotación en lateritas niquelíferas a nivel semi-industrial, de lo cual existen pocas referencias.

La biolixiviación presenta algunas ventajas y desventajas respecto a los procesos hidrometalúrgicos convencionales y pirometalúrgicos.

• Ventajas y desventajas de la Biolixiviación:

- a) Ausencia de contaminación ambiental por SO<sub>2</sub>.
- b) Consumos energéticos reducidos, como consecuencia de que no es preciso secar los minerales y de que los procesos tienen lugar a temperaturas inferiores a 100 °C.
- c) Bajo consumo de reactivos, ya que estos son producidos por los microorganismos.
- d) Bajos costos de operación, que en el caso del cobre pueden llegar a ser la mitad de lo necesario para obtenerlo por vía pirometalúrgica .
- e) Posibilidad de tratamiento de metales pobres y productos residuales, que de otra forma no podrían beneficiarse.
- f) Flexibilidad en las instalaciones, que permite hacerlas rentables incluso trabajando a escalas reducidas.
- g) Fácil separación del hierro de los residuos, ya que precipita de forma jarositas que se pueden recuperar como una fase cristalina, fácilmente filtrable.

Adicionalmente, la biolixiviación también presenta una serie de desventajas que han limitado su implantación general a nivel industrial. Las más importantes son:

- a) A causa del lento crecimiento de los microorganismos implicados, las velocidades de reacción del proceso son bajas, del orden de días a semanas.
- b) La obtención de soluciones excesivamente diluidas que dificulta obtener directamente el metal a partir de ellas.
- c) La adopción de nuevos procesos extractivos que requieren correr varios riesgos, fundamentalmente económicos, que la situación actual de la Metalurgia Extractiva no permite asumir y por lo tanto la adopción de tecnologías nuevas, como la biolixiviación, está bastante impedida [3].

#### **2.4.1. Microorganismos**

Son organismos microscópicos constituidos por una sola célula o agrupación de células. La célula es la unidad fundamental de toda materia viva. Una única célula es una

entidad, aislada de otras células por una membrana celular (y quizás por una pared celular) y conteniendo dentro de ella una variedad de materiales químicos y estructuras subcelulares. La membrana celular es la barrera que separa el interior celular con el exterior. Dentro de la membrana celular se encuentran las diversas estructuras y sustancias que hacen posible que la célula funcione. Estructuras claves son el núcleo o nucleóide, donde se guarda la información necesaria para hacer más células, y el citoplasma, donde se encuentra la maquinaria para el crecimiento y el funcionamiento celular.

Todas las células contienen determinados tipos de componentes químicos complejos: proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos. Tras cuidadosos estudios de la organización interna de las células, se ha puesto de manifiesto la existencia de dos tipos básicos: células procariotas y células eucariotas [10].

#### 2.4.2. Clasificación de los microorganismos

**Tabla 2.3** Clasificación de los microorganismos [10].

<b>Procarióticos</b>	<b>Eucarióticos</b>
Archaea	Eukarya: - Algas - Hongos - Protozoos
Bacteria	

Dentro de Bacteria se presentan varias ramas evolutivas, que incluyen a todos los procariotas causantes de enfermedades (patógenos) y a la mayor parte de las bacterias que se encuentran normalmente en el suelo, aguas y muchos otros medios. Algunos de estos organismos contienen pigmentos que les permiten usar la luz como fuente de energía mediante un proceso llamado fototrofia, otros dependen de compuestos orgánicos como fuente de energía y algunos pueden usar incluso compuestos químicos inorgánicos como combustible para realizar los procesos celulares. Tanto los ambientes aerobios (que



contienen O<sub>2</sub>) como los anóxicos o anaerobios pueden ser habitados por distintas especies de Bacteria.

La imagen de los procariotas denominados globalmente Archaea es, por el contrario, muy distinta. La mayor parte de los Archaea son anaerobios, es decir, son células incapaces de vivir al aire libre. Muchos se desarrollan bajo condiciones de crecimiento poco usuales, habitando lo que los humanos consideran ambientes extremos: fuentes termales (a veces temperaturas superiores a las de ebullición del agua), acúmulos de agua extraordinariamente salina y suelos y aguas altamente ácidas o alcalinas.

Entre los Eukarya se encuentran las algas, hongos y los protozoos. Las algas contienen clorofila, un pigmento verde que sirve como molécula captadora de luz y que hace posible que las algas realicen fototrofia. Las algas son frecuentes en hábitat acuático y se pueden encontrar también en suelos. Los hongos filamentosos o unicelulares, como las levaduras, carecen de clorofila y adquieren su energía de compuestos orgánicos en el suelo y en el agua. Los protozoos son Eukarya incoloros y móviles que obtienen alimento por ingestión de otros organismos o partículas orgánicas. Los protozoos carecen de las paredes celulares que presentan las algas y los hongos.

Por otro lado, los microorganismos se pueden clasificar según los siguientes aspectos [10]:

**a) Temperatura:**

- Psicrófilos → La temperatura óptima de crecimiento es de 15 °C o inferior.
- Mesófilos → Crece a temperaturas entre 20 y 45 °C.
- Termófilos → La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 45 y 80 °C.

**b) pH:**

- Acidófilo → Su crecimiento óptimo se produce a valores bajos de pH (ácidos).
- Alcalófilo → Su crecimiento óptimo se produce a valores altos de pH (básicos).

**c) Oxígeno:**

- Aerobio → Usa el oxígeno en la respiración, algunos lo requieren para el crecimiento.
- Anaerobio → No puede usar el oxígeno en la respiración y su crecimiento puede ser inhibido por el oxígeno.

**d) Fuente Carbono:**

- Autótrofo → Biosintetiza todo el material celular a partir del CO<sub>2</sub>, como única fuente de carbono.
- Heterótrofo → Requiere compuestos orgánicos como fuente de carbono.

**e) Fuente de energía:**

- Fotótrofos → Utilizan luz como fuente de energía.
- Quimiotrofos → Utilizan productos químicos como fuente de energía.

Los quimiotrofos se clasifican a su vez en:

- Quimiorganotrofos → Utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía.
- Quimiolitotrofos → Utilizan compuestos inorgánicos como fuente de energía.

### **2.4.3. Clasificación de los microorganismos lixiviantes**

Los microorganismos que participan en la degradación de los minerales se caracterizan por su capacidad para resistir ambientes extremos. Los hábitat en que se desarrollan se caracterizan por: bajo pH, altas concentraciones de metales pesados y, en algunos casos, elevadas temperaturas. Sin embargo en estas condiciones desfavorables, este grupo de microorganismos es capaz, no solo de vivir sino también de desarrollarse y reproducirse.

Estos microorganismos, por su actividad lixiviante, juegan un papel importante en la solubilización de metales valiosos.

A continuación se mencionan los principales microorganismos involucrados en la lixiviación [3]:

**Tabla 2.4.** Microorganismos involucrados en la lixiviación de minerales [3].

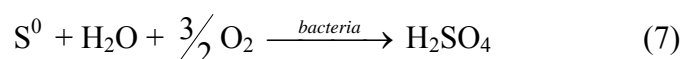
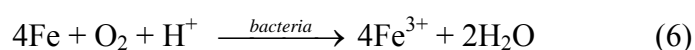
Género / especie	Fuente de carbono	Mineral a tratar
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Autótrofos	Sulfuros
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>		
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>		
<i>Thiobacillus sp</i>		
<i>Nitrobacter vinogradskyi</i>		
<i>Aspergillus Níger</i>	Heterótrofos	Óxidos
<i>Penicillium simplicissimum</i>		
<i>Penicillium expansum</i>		
<i>Penicillium glaucum</i>		
<i>Bacillus circulans</i>		
<i>Cephalosporium sp</i>		

Son numerosos los trabajos que hablan sobre la diversidad de microorganismos relacionados con la biolixiviación, los cuales han demostrado que *T.ferrooxidans*, para el caso de minerales sulfurados y los géneros *Aspergillus* y *penicillium*, para el caso de minerales oxidados, no son los únicos microorganismos implicados en la solubilización de minerales, aunque si los más representativos [3].

#### 2.4.3.1 *Thiobacillus ferrooxidans*

Colmer y Hinkel (1947) obtuvieron por primera vez a *T ferrooxidans* [3]. Es una bacteria Gram negativa, sus células son pequeñas, cilíndricas y de aproximadamente 1,0 μ

de longitud y 1,5  $\mu$  de diámetro. Presenta la típica pared celular de las bacterias Gram negativas y un único flagelo polar. Investigadores chilenos observaron que además del flagelo pueden presentar pili y otras estructuras con apariencia de cuentas de perlas, desconociéndose la función fisiológica de estas. No forman esporas y se dividen por fisión binaria. Sus células se encuentran aisladas o formando parejas. Vive a pH ácido (1.5 – 3), siendo el óptimo 2 (acidófila). Es una bacteria aeróbica, mesófila, autótrofa y como quimiolitotrofa obtiene su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos: azufre, tiosulfato, tetrionato, hierro, y de numerosos sulfatos insolubles. Algunas de estas reacciones son:

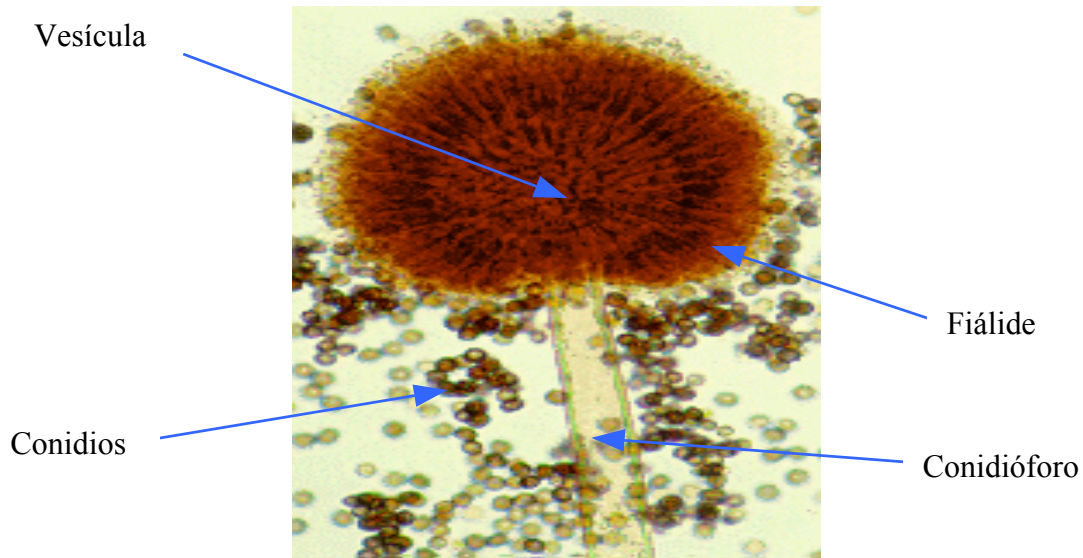


El crecimiento de *T.ferrooxidans* es relativamente lento y su tiempo generacional oscila entre 5,3 y 15 horas.

#### **2.4.3.2. *Aspergillus niger***

El *A. niger* (van Tieghem, 1867), es un organismo del género fúngico. Microscópicamente las colonias son inicialmente blancas, posteriormente negras y con un reverso amarillo. A nivel microscópico, los conidióforos son hialinos, pigmentados en su parte superior, lisos y de pared gruesa [11]. Como hongo filamentoso, cada filamento crece fundamentalmente en el ápice, por extensión de la célula terminal. Cada filamento aislado se llama hifa (septada) que crece formando bolas compactas que colectivamente se llama micelio, que pueden fácilmente ser vistas sin el microscopio. El micelio surge porque las hifas individuales al crecer se entrecruzan dando lugar a espesos aglomerados. A partir del micelio, algunas hifas pueden ir buscando la superficie, originando así micelio aéreo que a su vez da lugar a esporas llamadas conidios (fig. 2.1.). Los conidios son esporas asexuales, a menudo fuertemente pigmentadas y resistentes a la desecación, siendo su misión la de

dispersar el hongo a nuevos hábitats. Es un microorganismo aeróbico, mesófilo, heterótrofo y quimiorganotrofo [10].



**Figura 2.1.** Morfología microscópica del *A. niger* [11].

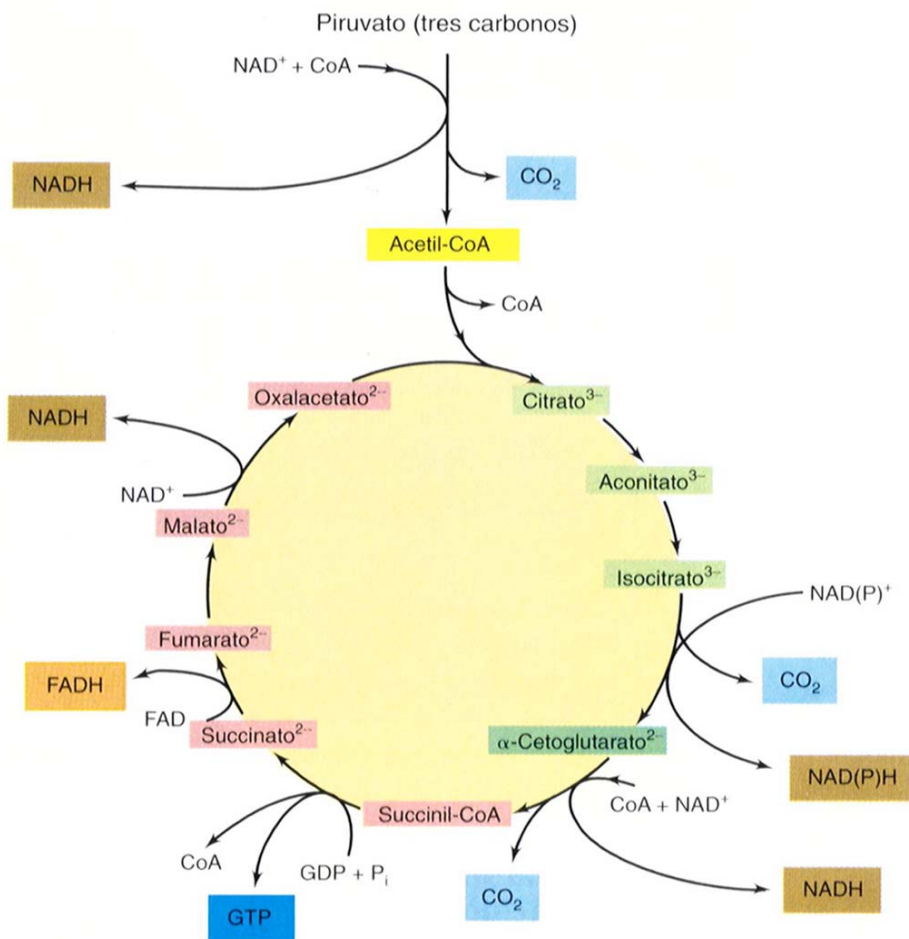
La producción de ácidos orgánicos por el metabolismo de este hongo ha sido bien estudiada. Entre los ácidos producidos por el *A. niger* se encuentran el ácido cítrico, ácido oxálico, glucónico, glutárico, glicólico, ascórbico, acético, entre otros.

Estos ácidos excretados pueden tener un doble efecto en la disolución de metales: suministrar iones hidronios para la acidólisis del mineral y el acomplejamiento de los metales debido a su capacidad de formar quelatos [3].

Existen una gran variedad de trabajos que hablan sobre la diversidad de ácidos orgánicos excretados por el metabolismo del *A. niger*, los cuales han demostrado que el ácido cítrico no es el único implicado en la solubilización de minerales, aunque si el más representativo [3].

De manera resumida, el ácido cítrico, compuesto de 6 átomos de carbono, es un intermediario del ciclo de los ácidos tricarbóxicos que se sintetiza en la célula por la

condensación del acetyl CoA y el ácido oxaloacético, con la intervención de la enzima citrato sintasa, dando lugar al ácido cítrico, el cual pasa a isocítrico, reacción catalizada por la enzima aconitasa, generándose posteriormente una serie de intermediarios como  $\alpha$  cetoglutarato, succinil CoA, succinato, piruvato y malato hasta llegar a oxaloacetato (fig. 2.2) [10].



**Figura 2.2.** Ciclo de los ácidos tricarboxílicos [10].

#### 2.4.3.2.1. Factores que intervienen en la producción del ácido cítrico

Entre los factores que intervienen en los rendimientos a obtener en la producción del ácido cítrico están [11]:

a) Fuente de carbono:

Uno de los aspectos más importantes en los estudios de lixiviación de minerales oxidados es la selección de una adecuada fuente de carbono que propicie la formación de grandes cantidades de ácido cítrico y a su vez sea económica. Los microorganismos producen altos valores de ácidos sólo si crecen en un exceso de fuente carbonada.

En general, solamente aquellos azúcares que pueden ser asimilados rápidamente por el hongo (glucosa, fructosa, sacarosa), permiten una producción alta de ácido cítrico.

b) Aireación:

La aireación es un factor crítico para la producción de ácido cítrico en los procesos de fermentación por crecimiento sumergido. Un aumento en la concentración de oxígeno conduce a un incremento en la producción de ácido cítrico y una interrupción en la aireación tiene efectos dañinos, ya que una interrupción transitoria puede redirigir el metabolismo del hongo hacia la producción de biomasa y está establecido que para favorecer la síntesis de ácido cítrico, el crecimiento del hongo debe ser restringido.

c) Sales inorgánicas:

La concentración de las sales inorgánicas en el medio de cultivo influye notablemente en el crecimiento del microorganismo, en la esporulación y en la producción de los ácidos orgánicos y como consecuencia de esto se logran mejores recobrados de los metales en los licores de la biolixiviación. El magnesio juega un papel muy importante en la esporulación del hongo, es por ello que se debe definir la concentración necesaria a añadir en el medio de cultivo de forma tal que garantice simultáneamente la menor producción de esporas y una gran síntesis de ácido. Prescott y Dunn (1967) plantearon que las concentraciones de sulfato de magnesio

inferiores a 0.5 g/L provocaban bajos rendimientos en la producción de ácido cítrico, mientras que concentraciones entre 0.5 g/L y 2 g/L no afectaban la eficiencia del proceso [3].

Sin embargo, Pacheco (1996) al trabajar con concentraciones de magnesio desde 0.08 g/L hasta 0.25 g/L, no encontró diferencias en cuanto a la producción de ácidos, pero sí en el crecimiento. En la medida que disminuyó la concentración del ión magnesio observó diferencias en la producción de ácidos [3].

Con relación a los iones fosfatos, Pacheco (1996) planteó que la mejor concentración era de 0.5 g/L, y que un incremento de esta provoca una disminución de la producción de ácido por la cepa [3].

Otro ión metálico que influye en este proceso biológico es el hierro. Bajos contenidos de este en el medio favorecieron la síntesis de ácido cítrico. Esto se debe a la formación de quelatos donde el hierro se acompleja con el ácido cítrico y da lugar al citrato de hierro.

d) pH:

El mantenimiento de un pH bajo durante el proceso de fermentación para la producción de ácido cítrico, es de gran importancia para que el proceso sea eficiente.

e) Viscosidad del medio:

Rugsaseel y col., 1995 [11], encontraron que la adición de sustancias viscosas al medio de fermentación en cultivos sumergidos, incrementaban la producción del ácido cítrico. Las sustancias viscosas actúan protegiendo al micelio del daño fisiológico que se genera debido a la agitación y como consecuencia hay un incremento significativo de la producción de ácido cítrico.



#### **2.4.4. Crecimiento microbiano**

El crecimiento se define como un incremento en el número de células microbianas en una población. Los microorganismos en su entorno pueden ser considerados, en términos poblacionales como sistemas autocatalíticos capaces de biotransformar compuestos orgánicos e inorgánicos, es decir, capaces de convertir dichos compuestos en biomasa y productos metabólicos.

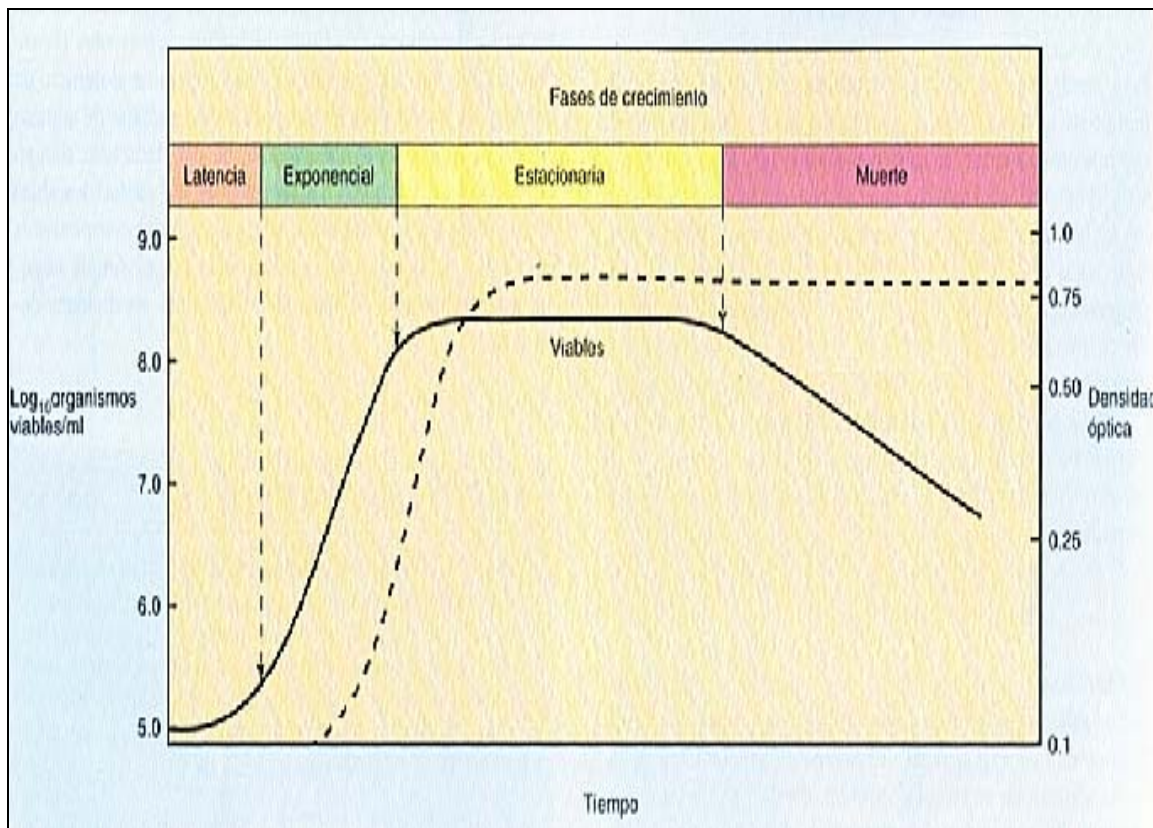
La síntesis de material celular conduce a que cada célula aumente en longitud y diámetro (como consecuencia de su incremento en masa) hasta que la división ocurre. Ello permite considerar a cada célula individual como la unidad de crecimiento en organismos unicelulares.

Así, cuando un medio de cultivo apropiado, constituido fundamentalmente por una fuente de carbono, una fuente energética, una fuente nitrogenada, sales y factores de crecimiento, es inoculado con microorganismos, estos comienzan a dividirse activamente empleando los constituyentes que aporta dicho medio. El proceso continúa hasta que algún componente (sustrato limitante) se agota y el crecimiento se detiene. También puede ocurrir el cese del crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora producida por los mismos microorganismos [3].

La velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células o masa celular por unidad de tiempo. Durante este ciclo de división celular, todos los componentes estructurales de la célula se duplican. El tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos células se denomina tiempo de generación.

##### **2.4.4.1. Ciclo del Crecimiento Microbiano**

La figura 2.3, representa el ciclo del crecimiento microbiano. Esta curva de crecimiento puede dividirse en varias fases: de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte [10].



**Figura 2.3.** Curva de crecimiento típica para una población microbiana [10].

a) Fase de latencia:

Cuando una población microbiana se inocula en medio fresco, no ocurre crecimiento inmediatamente, sino después de cierto tiempo que se llama fase de latencia, que puede ser más larga o más corta dependiendo de muchos factores. Esto también ocurre si el inóculo se toma a partir de un cultivo viejo, entonces tiene lugar una fase de adaptación, incluso si todas las células presentes en el inóculo son viables, esto es, capaces de reproducirse. Esto ocurre porque las células, en estas condiciones, carecen de determinados componentes esenciales y tiene que transcurrir un cierto tiempo para que se proceda a su síntesis. Esta fase está caracterizada por un inapropiado espectro enzimático, un metabolismo deprimido, síntesis de metabolitos intermediarios fácilmente difusibles, síntesis de enzimas extracelulares (principalmente hidrolíticas), etc.

b) Fase o crecimiento exponencial:

En esta fase el número de células se dobla cada cierto período de tiempo, y esta caracterizada por la relación:

$$1/x * dx / dt = \mu_m = \text{ctte} \quad (8)$$

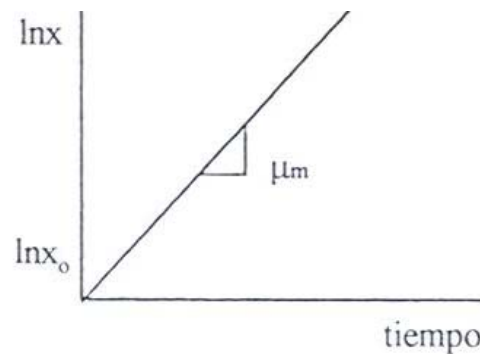
Donde  $\mu_m$  es la velocidad específica de crecimiento máximo.

Esta ecuación es fácilmente integrable, haciendo a  $t = 0$ ,  $x = x_0$  (concentración inicial de biomasa, o lo que es lo mismo concentración del inóculo), quedando:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_m * t \quad (9)$$

$$x = x_0 * e^{\mu_m * t} \quad (10)$$

Es evidente entonces que si durante la fase exponencial se grafica el  $\ln x$  contra el tiempo se obtiene una recta (fig. 2.4.), cuya pendiente es  $\mu_m$  y cuya ordenada al origen es el logaritmo natural de la concentración del inóculo.



**Figura 2.4.** Regresión lineal durante la fase exponencial de crecimiento [3].

A partir de la ecuación (10) se puede calcular el tiempo de generación del microorganismo ( $t_g$ ). Así, cuando  $x = 2x_0$ , se deduce que:

$$t_g = \ln 2 / \mu_m \quad (11)$$

c) Fase estacionaria:

En un cultivo donde no se renueva el medio, el crecimiento exponencial no puede ocurrir indefinidamente. Esto es motivado por el agotamiento del sustrato limitante o por la presencia de agentes inhibidores. En la fase estacionaria no hay incremento neto del número de células. Sin embargo, aunque en esta fase no tiene lugar crecimiento, todavía ocurren muchas funciones celulares, incluyendo el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. Esta fase esta caracterizada por marcados cambios en la composición celular y cese del crecimiento, es decir:

$$1/x * dx / dt = 0 \quad (12)$$

d) Fase de muerte:

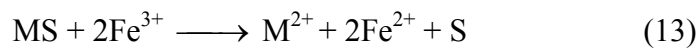
Si la incubación continua después que la población alcance la fase estacionaria, las células deben permanecer vivas y metabólicamente activas, pero también deben morir. Si esto último ocurre se dice que las células entran en fase de muerte o declinación. En la figura 2.3, se observa que esta fase es también una función exponencial, sin embargo, en muchos casos la velocidad de muerte es mucho más lenta que el crecimiento exponencial. Esta fase esta caracterizada por la pérdida de viabilidad celular y la autólisis.

#### **2.4.5. Biolixiviación de minerales sulfurados**

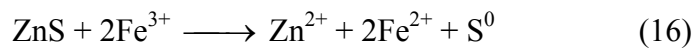
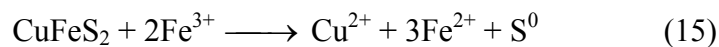
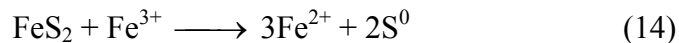
Los metales se pueden extraer de los minerales a través de procesos biológicos o de procesos puramente químicos de transferencia electrónica. La oxidación bacteriana transcurre a través de un mecanismo electroquímico en donde el microorganismo actúa como un catalizador que transporta los electrones del donante (mineral) al receptor (oxígeno). Desde otro punto de vista, el ataque y solubilización de un determinado mineral por bacterias puede ocurrir por un contacto directo [3].

### 2.4.5.1. Mecanismo indirecto

En el mecanismo indirecto, el microorganismo actúa a través de las sustancias producidas en su propio metabolismo. En este sentido, las bacterias *T.ferrooxidans* son capaces de utilizar para su propio provecho la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  y el azufre reducido. En el primer caso, el producto es el hierro férrico con una gran capacidad oxidante los propios sulfuros metálicos, según la siguiente reacción general :



Simultáneamente el azufre también puede ser oxidado a ácido sulfúrico según la reacción (7). Así pues, en medio oxidante y ácido son posibles reacciones como las siguientes:



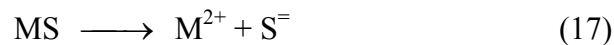
Posteriormente, los productos de estas reacciones pueden volver a ser oxidados y reutilizados en la lixiviación química de los minerales. Es decir, la acción bacteriana regenera el medio de ataque y reduce el consumo de reactivos. Este tipo de mecanismo es uno de los más importantes en las aplicaciones industriales actuales de la biolixiviación, es decir lixiviación de minerales de cobre, de uranio y de oro en montones [3].

En resumen, la acción indirecta de los microorganismos tiene lugar por la interacción con productos intermedios o finales del metabolismo bacteriano sin que haya una participación directa de tipo enzimático. El papel que juega la bacteria es de formación y regeneración continua de los reactivos capaces de atacar el sustrato mineral [3].

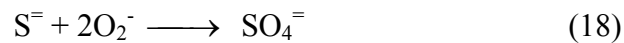
### 2.4.5.2. Mecanismo directo

El mecanismo directo, como su nombre lo indica, requiere de un contacto directo entre el microorganismo y el sustrato, en presencia de oxígeno. La bacteria oxida directamente, a través de acción enzimática, el azufre y el hierro ferroso de los minerales a ácido sulfúrico y férrico, respectivamente, según las reacciones (6) y (7).

La primera etapa del ataque directo en la oxidación del mineral sulfuro (MS) es la solubilización del sustrato sólido, previa a la oxidación metabólica, siendo efectiva mediante una disociación del MS:



Una vez liberado el anión sulfuro, se une inmediatamente al sistema enzimático de la bacteria y así es oxidado a sulfato. Como consecuencia, el equilibrio (17) se desplaza hacia la derecha favoreciéndose la disolución del mineral y formándose ión  $\text{SO}_4^{\ominus\ominus}$ :



### 2.4.5.3. Factores que influyen en la disolución de los minerales

Entre los factores que influyen en la biolixiviación se encuentran aquellos que afectan directamente al crecimiento de los microorganismos y aquellos otros que afectan a la cinética de solubilización de los minerales. En ambos casos, el principal problema a resolver es como mantener las condiciones ambientales para el adecuado crecimiento celular en sistema lixivante. Entre las variables a controlar se encuentran [3]:

- a) Temperatura: La temperatura óptima para la oxidación de minerales sulfurados por acción de las bacterias mesófilas se encuentra entre un rango de 28 y 35 °C. En esta variable se recogen dos factores importantes a tener en cuenta: el aumento en la velocidad de reacción por incremento de la temperatura (activación) y, a la vez, un

incremento de la velocidad de muerte térmica de las células (inactivación) producto de la desnaturalización proteica, que provoca la pérdida de la activación biológica, pudiendo ser ésta más importante que la activación del proceso de biolixiviación de los sulfuros.

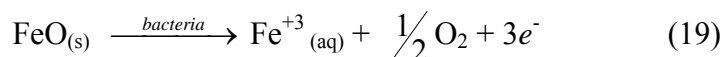
- b) Acidez del medio: La oxidación de las formas reducidas del azufre depende los movimientos de protones y electrones, por lo que el pH influye directamente sobre la actividad bacteriana. El pH óptimo para la lixiviación bacteriana está en el intervalo de 1,9 a 2,8. A pH superiores la adherencia de las células al sustrato se puede ver afectada.
- c) Concentración de nutrientes: El nitrógeno es el nutriente más importante para *Thiobacillus* y debe ser suministrado como sales de amonio ya que en forma de nitrato de bacterias aeróbicas no pueden asimilarlo. También se ha demostrado la incorporación del nitrógeno atmosférico al material celular. El potasio y el calcio son elementos minoritarios vitales para el crecimiento, aunque se requieren de cantidades tan pequeñas que son suministrados por el propio mineral.
- d) Disponibilidad de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>: La disponibilidad del CO<sub>2</sub> es muy importante ya que constituye la única fuente de carbono para las bacterias autótrofas. La energía necesaria para asimilarlo depende de la oxidación de los sustratos. En medio ácido, la solubilidad del O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> es baja, por lo que es necesario una velocidad de transferencia de materia máxima para que este aspecto no sea controlante del proceso. En la cinética de las reacciones son importantes también las características del mineral, el tipo de especie mineralógica, el tamaño de las partículas o el área superficial expuesta.

#### **2.4.6. Biolixiviación de minerales oxidados**

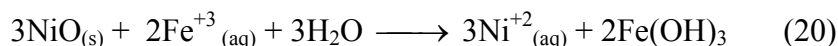
Los minerales oxidados como silicatos, carbonatos y fosfatos son lixiviados principalmente por microorganismos heterótrofos, los cuales excretan ácidos orgánicos que

operan mediante dos mecanismos que pueden ocurrir simultáneamente o no. Como resultado se obtiene un metal oxidado que ha sido disuelto de una fase sólida a una fase líquida donde los iones hidronio desplazan los cationes metálicos de la matriz del mineral y con ello se induce la disolución de los metales. Posteriormente los ácidos orgánicos secuestran los metales a través de un mecanismo de quelación, formándose complejos solubles. Este mecanismo es aplicable tanto a minerales silicatos como no silicatos. La formación de estos complejos evita que los metales precipiten en forma de hidróxidos, proceso que beneficia la lixiviación ya que es posible disminuir el nivel de toxicidad al acomplejarse el ión metálico con el anión del ácido orgánico [3].

Por otro lado, estudios realizados por Pedraza y Parra [12], demuestran que las lateritas pueden ser atacadas por *T. Ferrooxidans*, el cual debido a la ausencia de compuestos de azufre en el mineral laterítico, utiliza como fuente de energía el hierro ( $\text{Fe}^{+3}$ ) que bajo ciertas condiciones producen. Los microorganismos se verán en la necesidad de catalizar la oxidación de minerales ferrosos presentes. La acción bacteriana puede representarse por:



El óxido de níquel reacciona directamente con iones férricos disueltos, producidos en la reacción (19), para solubilizar el níquel de acuerdo a:



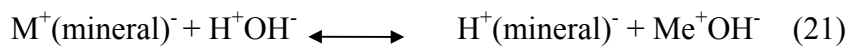
Este mecanismo de disolución bacteriana también fue estudiado por J.A. Muñoz *et al.* [13], donde demuestra la efectiva recuperación de uranio a partir de una mena oxidada ubicada en Salamanca (España). El principio del método está en la separación de los minerales de uranio con sulfato ferroso producido por la acción bacteriana sobre la pirita presente en la mena. En otras palabras, en el proceso las bacterias no atacan a los minerales de uranio directamente, pero crea las condiciones químicas necesarias para su disolución.



#### 2.4.6.1. Mecanismo de acción

Dentro de los microorganismos heterótrofos, los hongos filamentosos son los que han demostrado una mayor efectividad en la extracción de metales presentes en minerales oxidados. Se destacan dentro de ellos las especies *A. niger* y *P. simplicissimum*, debido a su habilidad de excretar grandes cantidades de ácidos orgánicos [3]. Entre estos, el más efectivo ha sido el ácido cítrico.

El mecanismo fundamental de impacto de los microorganismos sobre los silicatos no ha sido estudiado profundamente pero es conocido que la destrucción química del silicato está basada en procesos de hidrólisis según la reacción siguiente:



Donde:

$M^+(\text{metal})$  ..... es el mineral inicial  
 $H^+(\text{mineral})^-$  ..... es el mineral desgastado  
 $Me^+$  ..... es el catión en solución.

Desde el inicio de la década del sesenta [3], se comenzaron a aislar bacterias y hongos que disolvían metales contenidos en las rocas. Los ácidos orgánicos y los compuestos con al menos dos grupos reactivos hidrofílicos son excretados al medio de cultivo como productos metabólicos de los microorganismos heterótrofos. Posteriormente estos metabolitos disuelven los metales dando lugar a sales y quelatos.

#### 2.4.6.2. Lixiviación química

Con el objetivo de simular el proceso de biolixiviación, muchos trabajos se han desarrollado enfrentando diversos ácidos con el mineral. Por ejemplo, al comparar los

recobrados de níquel obtenidos mediante la acción del ácido sulfúrico y de 15 ácidos orgánicos diferentes, se encontró que a una densidad de pulpa del 10 % más del 70 % del níquel fue solubilizado con ácido cítrico 0.5 M, mientras que con ácido sulfúrico (0.5 M) sólo se alcanzó un 60 % de extracción. Otros ácidos que exhibieron buena capacidad de lixiviación del níquel fueron el ácido glicólico, el ácido láctico y el ácido glucónico, con los que se alcanzaron valores de 30 % de extracción [3].

En 1993, Tarasova y Khavsky [14], también demostraron la superioridad del ácido cítrico sobre el ácido sulfúrico para la disolución del níquel laterítico. Sin embargo, Alibhai y col. (1991) [3], lograron mejores resultados con el ácido sulfúrico que con el ácido cítrico, aunque los recobrados más significativos se alcanzaron con la mezcla de ambos ácidos. Una vez más se pone de manifiesto la marcada influencia del tipo de mineral a ser tratado.

Para la serpentinita de Rumania el ácido glucónico fue el ácido orgánico más efectivo en la extracción de níquel, mientras que el ácido cítrico presenta selectividad por el silicato, lo mismo ocurrió con la serpentinita cubana [15].

Alibhai y col. (1991, 1993) [3], también consideraron al ácido cítrico como el mejor agente lixivante de níquel, debido a que forma un complejo soluble con el mismo, además de presentar selectividad significativa por el níquel en relación con el hierro presente en el enrejado del mineral laterítico. El ácido oxálico también mostró buenos resultados pero tiene como inconveniente que precipita el níquel como oxalato, lo que dificulta los procesos de lixiviación con minerales altos contenedores de metales.

Recientemente Coto y col. (2001) [15] estudiaron el efecto de seis ácidos orgánicos para la lixiviación de níquel y cobalto presente en la serpentinita cubana del yacimiento niquelífero de Moa (Holguín). Ellos probaron diferentes concentraciones de los ácidos (0.05 M, 0.25 M y 0.5 M), siendo el ácido cítrico el más eficiente, ya que lixivió un 80 % de níquel y un 90 % de cobalto.

### 2.4.6.3. Lixiviación biológica

Los estudios de lixiviación de níquel y cobalto en minerales oxidados con el empleo de microorganismos se han concentrado en el uso de hongos filamentosos, fundamentalmente de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, en proceso que conllevan a la exposición directa del hongo al mineral, o en aquellas realizadas en dos etapas.

Durante un ensayo de lixiviación de níquel con 14 cepas fúngicas, los mejores resultados se lograron con *P. simplicissimum* P-6, la cual alcanzó un 72% de extracción del níquel presente en lateritas con silicato, después de treinta días de incubación. Las cepas de *Aspergillus* estudiadas presentaron resultados inferiores [3].

Sobre mineral laterítico brasileño también las cepas de *Penicillium* alcanzaron mejores resultados que las cepas de *Aspergillus*, destacándose entre ellas *P. simplicissimum*, el cual además de níquel logró solubilizar aluminio [3].

Alibhai y col. (1991) [3], al utilizar caldo de fermentación de *Aspergillus* y *Penicillium*, para una lixiviación química en dos etapas, encontraron que el licor de *Aspergillus* A-3 lixivió el 70 % del níquel a temperatura ambiente a los 30 días de incubación. No obstante, ellos concluyeron que la lixiviación en una etapa fue superior a la de dos etapas, ya que el contacto íntimo entre el mineral y microorganismos favorece el proceso.

Otras cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* lograron lixiviar un 55 % y un 60 % de níquel y cobalto respectivamente frente a mineral laterítico de Litharakia (Grecia) [3].

El tratamiento del mineral mejora considerablemente la eficiencia en los procesos de lixiviación. Una cepa microbiana fue tratada por ultrasonido para promover un mayor crecimiento fúngico [16]. Después de sometidas las esporas de *A. niger* a ondas ultrasónicas el hongo exhibió un incremento en el crecimiento, y fue capaz de lixiviar en sólo 14 días un 95 % del níquel contenido.

El tratamiento con ultrasonido además de favorecer el crecimiento del hongo, incrementa la extracción mediante una lixiviación selectiva del níquel sobre el hierro[3].

#### **2.4.6.4. Influencia de los factores ambientales**

Como se mencionó anteriormente la composición del medio de cultivo, el pH, la presencia o no de determinados elementos trazas, son algunos de los parámetros que pueden variar la cantidad y el tipo de ácido excretado por las cepas, y como consecuencia, a su vez se ve afectado los recobrados de los metales en los licores de la biolixiviación.

La producción de un tipo de ácido orgánico está genéticamente determinada e interrelacionada con los factores ambientales.

##### a) Efecto de la fuente de carbono:

Diversos estudios a escala de laboratorio han demostrado que con glucosa como fuente de carbono, con concentraciones entre un 8 y un 10 % en el medio de fermentación se garantizan cantidades considerables de ácidos [17].

Con el objetivo de alcanzar buenos recobrados de níquel lixiviado con una cepa de *A. niger*, Sukla y Panchanadikar [3] ensayaron diferentes medios de cultivo: melazas de caña, licor de remojo de maíz, medio Czapeck, caldo Sabouraud glucosa, extracto de malta y papa dextrosa. Los mejores resultados se lograron con extracto de malta más glucosa y papa dextrosa.

La sacarosa también ha sido utilizada como fuente de carbono para la lixiviación microbiana de minerales oxidados. Los mayores recobrados se han alcanzado con concentraciones entre 120 g/L y 180 g/L [14].

La fuente carbonada sobre la cual se desarrollan los microorganismos influye decisivamente en el tipo de ácido a producirse. Estudios realizados por Alibhai y col. [3] demostraron que, sobre glucosa la cepa de *Aspergillus* A-2 produjo 40.8 g/L de ácido cítrico y sólo 2 g/L de ácido oxálico, sin embargo la cepa de *Penicillium* P-6 sintetizó 33.9 g/L de ácido cítrico nada de ácido oxálico. Resultados similares fueron alcanzados cuando utilizaron sacarosa como fuente de carbono. Cuando el hongo se cultivó sobre melazas, las cepas produjeron ácido oxálico y nada de ácido cítrico.

b) Efecto de la temperatura:

La temperatura es un factor físico determinante en las reacciones químicas y biológicas. En la biolixiviación la mayoría de los estudios se han realizado a la temperatura óptima de desarrollo del microorganismo.

Los procesos de lixiviación de minerales oxidados pueden desarrollarse en una o en dos etapas. En el primer caso el microorganismo está en contacto directo con el mineral y en el segundo se precisa del micelio y posterior utilización del líquido conteniendo los productos metabólicos como agente lixivante químico, o sea, primero una síntesis del ácido orgánico en un fermentador y luego una lixiviación química donde el caldo de fermentación se enfrenta al mineral. En la primera variante el rango de temperatura a la cual se desarrolla el proceso se corresponde con los valores óptimos para el crecimiento del hongo (20-40 °C).

La lixiviación química por lo general se trabaja a temperaturas elevadas. Por ejemplo, Bosecker [3] desarrolló la lixiviación de un mineral laterítico de República Dominicana con una mezcla de ácido cítrico y ácido sulfúrico a 650 °C, alcanzando valores de 90.6 % de níquel, 70 % de aluminio, 7 % de cromo, 27.6 % de hierro y 10.5 % de magnesio.

c) Efecto del pH:

El pH inicial de los medios de cultivo es decisivo en la concentración y en el tipo de ácido a ser sintetizado por los microorganismos, y por tanto influye en la eficiencia de la biolixiviación [3]. Esto depende de la cepa y del mineral a tratar. Bosecker (1986 ) [3] informó que a pH iniciales del medio de cultivo entre 3 y 5 se alcanzaban muy buenos resultados en la disolución de níquel y que a pH superiores a 5 se afectaba notablemente la solubilización del mineral laterítico. Sin embargo Metha y col. (1979) [3] lograron muy buenos resultados en la extracción de aluminio al tratar rocas basálticas a pH inicial 7, en ambos casos utilizaron *P. simplicissimum* para desarrollar la lixiviación microbiana. Por tanto, es un requisito necesario e imprescindible, para cada mineral, un pH óptimo de lixiviación el cual debe ser inferior al punto isoeléctrico del mineral.

Un ejemplo de cómo varía el tipo de ácido con el pH fueron los estudios de Burgstaller y Schinner [3] quienes encontraron que *A. niger* a pH 2 produjo grandes cantidades de ácido cítrico, mientras que a pH 6 se favoreció la producción de ácido oxálico.

d) Tolerancia de los microorganismos a los iones metálicos:

Los metales pesados son tóxicos para la célula a concentraciones elevadas y requeridos en muy bajas cantidades. Es por ello que para los trabajos de lixiviación es necesario la selección de cepas resistentes a metales, ya que en la medida que el proceso se desarrolla la concentración de estos en los licores se incrementa.

Bosecker (1986 A) [3] aisló una cepa de *A. niger* tolerante a 1300 ppm de  $\text{Ni}^{2+}$ , mientras que *Penicillium* P-6 lo hizo a 4800 ppm de  $\text{Ni}^{2+}$ . Posteriormente en 1996 encontró que cepas adaptadas de *P. simplicissimum* fueron capaces de crecer a 10000 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  y 6000 ppm de  $\text{Cr}^{3+}$  y que un aislamiento de *Aspergillus fumigatus* fue activo a una concentración de 3000 ppm de  $\text{Ni}^{2+}$  [17].

Anteriormente Sukla y Panchanadikar [3] aislaron nueve cepas de *A. niger* de mineral laterítico, siete de ellas crecieron desde el primer aislamiento entre 1g/L y 1.5 g/L de níquel. Después de su adaptación estas fueron capaces de crecer a 4000 ppm de Ni<sup>2+</sup>. Un ejemplo sorprendente de extrema tolerancia fue la cepa de *Penicillium ochrochloron* en una solución de cobre de 80 g/L [3]

Un aspecto a tener en cuenta en todo proceso de lixiviación con microorganismos es la capacidad que presentan de adsorber metales lo que trae como consecuencia la pérdida de los mismos en solución. Tzeferis y col. (1994) [3] detectaron una pérdida entre un 3.5 % y un 10.8% de níquel durante la lixiviación de mineral laterítico, al emplear *Aspergillus* y *Penicillium*. Por su parte Kar y col. (1995) [3] comprobaron que una alta concentración de esporas como inóculo generaba una biomasa tan densa, que favorecía un alto atrapamiento de los metales solubles, y por ende, una disminución en los recobrados durante los procesos de lixiviación.

e) Densidad de pulpa:

La eficiencia de la lixiviación microbiana también se ve afectada por la mayor o menor concentración del mineral incorporado al sistema, lo que se conoce como densidad de pulpa. Un incremento de ésta, provoca disminución en el recobrado del metal [3]. Esto se debe a que el incremento de la densidad de pulpa genera una mayor cantidad de productos solubles disueltos, lo que puede inhibir la actividad microbiana [3] y así influir negativamente en la disolución de los metales.

Por su parte Kar y col. (1995) [3] consideran que la disminución en los por cientos de lixiviación con el aumento de la densidad de pulpa se deben a la limitación de los metabolitos fúngicos, al incremento de la viscosidad del medio y por tanto a una disminución del oxígeno disponible para el desarrollo del hongo lo que trae como consecuencia una inhibición de la síntesis los ácidos orgánicos.

La susceptibilidad de los minerales a los agentes quelantes depende de diversos factores:

- Composición química.
- Extensión de la sustitución de los elementos en los diferentes sitios del enrejado.
- Estabilidad del enrejado.
- Porosidad y tamaño del grano del mineral.
- Permeabilidad.
- Existencia de grietas, hendiduras y de otras líneas de debilidad.

Además de la biosorción de metales por parte de la biomasa microbiana, Valix y col. (2001) [3] demostraron que la electrosorción del níquel sobre el residuo sólido contribuye a la pérdida de metal soluble en el sistema. Los cambios de superficie y del tipo de mineral presente en el residuo tienen una gran influencia sobre el fenómeno de la electrosorción, siendo decisivo en el control del pH para lograr un proceso óptimo de biolixiviación.

En los minerales contenedores de grandes cantidades de hierro como la limonita, este metal al igual que el níquel y el magnesio están estrechamente unidos al enrejado cristalino del mineral, por lo que su movilización es muy escasa. Esto fue comprobado en los trabajos realizados por Bosecker (1986) [3], al emplear una cepa de *Penicillium* P-6 la cual solamente pudo lixiviar el 14 % del níquel limonitizado, mientras sobre mineral silicato solubilizó más del 72 % del níquel presente en el mineral, a diferencia de los ensayos con silicato donde disolvió más del 72 % del níquel contenido en el mineral.

#### **2.4.6.5. Remoción de hierro**

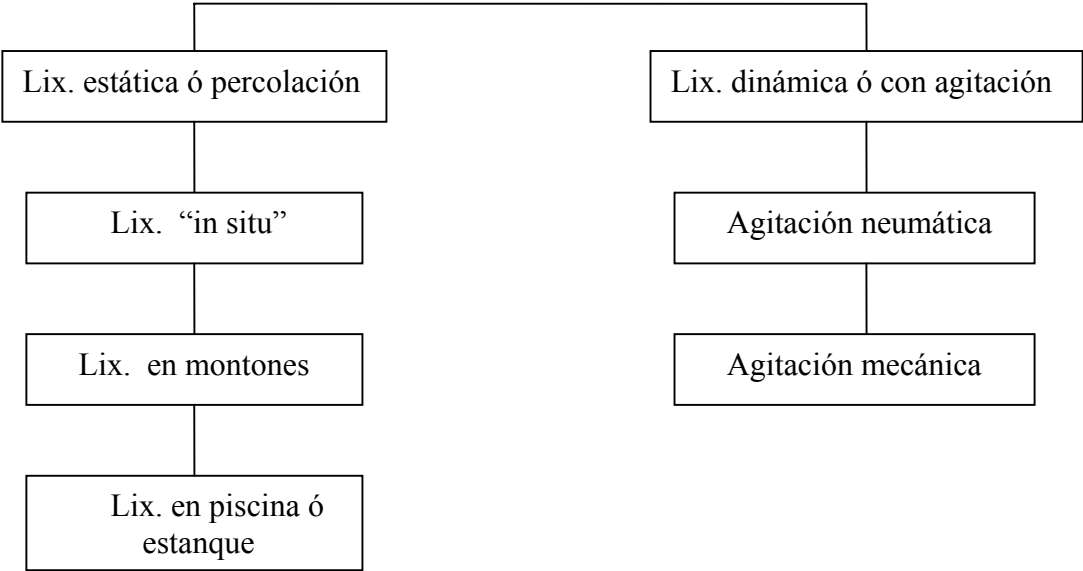
Los óxidos de hierro contenidos como impurezas en cuarzos, kaolinas y otros minerales pueden afectar grandemente su uso como materias primas. Diferentes métodos no biológicos han sido utilizados independientemente o en combinaciones para remover el



hierro. Sin embargo, algunos de estos métodos como separación magnética y flotación no se han podido aplicar a una escala industrial ya que su eficiencia depende fundamentalmente de las características mineralógicas de la materia a tratar. Los métodos químicos con empleo de ácidos orgánicos y agentes reductores son aceptables para alcanzar por cientos de recobrados de hierro considerables pero son muy costosos, las condiciones de operación son muy difíciles y son muy dañinos al ambiente.

La capacidad de los microorganismos para lixiviar hierro de los minerales oxidados puede ser empleada para la remoción de este elemento de diferentes materias primas que contienen óxidos de hierro como impurezas. Diferentes bacterias heterotróficas y hongos que disuelven hierro de estos óxidos han sido aislados de suelo, agua y de menas de hierro, utilizando goethita, limonita, o hematita. Algunas de estas bacterias fueron identificadas como *Bacillus* y *Pseudomonas* y la mayoría de los hongos filamentosos como *Aspergillus* y *Penicillium* [3].

**2.4.6.6. Clasificación física de la Biolixiviación**



**Figura 2.5.** Esquema de la clasificación física de la biolixiviación.

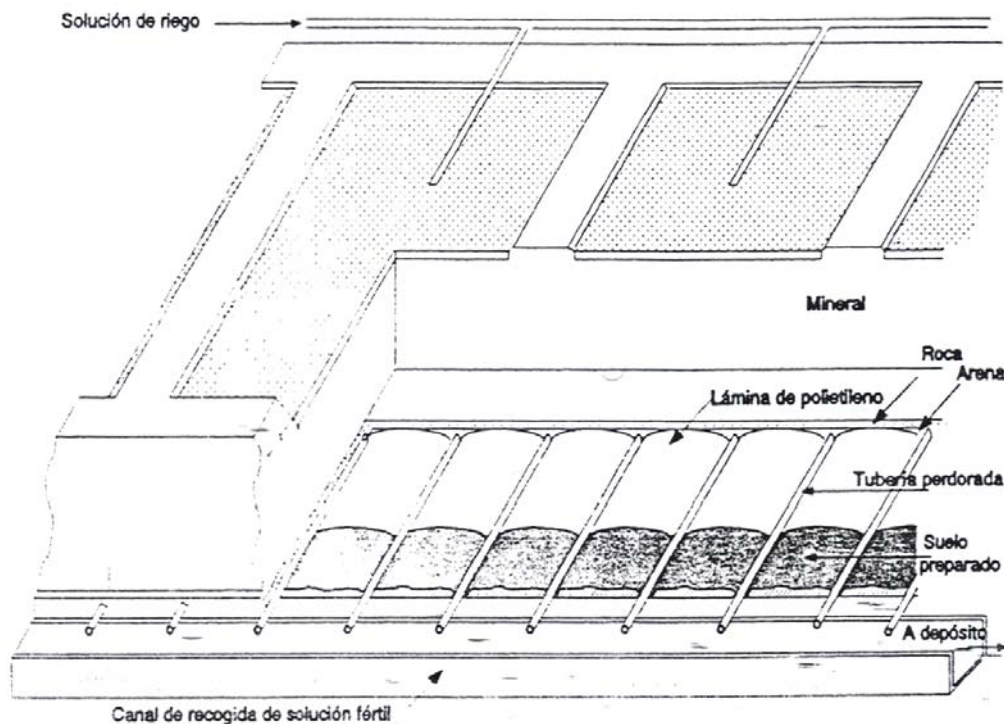
Una vez estudiadas las características de la mena y del mineral, así como diversos factores como: geología de la mena, ubicación geográfica, disponibilidad económica, volumen de reservas, etc, se procede a analizar cual es la metodología adecuada para la lixiviación. Esta metodología se divide en dos tipos: Lixiviación estática y Lixiviación agitada. Siendo su principal diferencia la forma en que somete el mineral al contacto con la solución lixivante.

- Lixiviación estática o de lecho fijo: En este caso el material a lixiviar no se mueve, es decir, no hay movimiento del sólido respecto al líquido, y el licor pasa a través del lecho del mineral el cual puede estar dispuesto de diferentes formas. En la lixiviación estática el tamaño de partícula debe ser tal que permita el contacto entre el lixivante y el mineral. Este tipo de lixiviación se caracteriza por presentar reacciones muy lentas (semanas, meses, años).

Existen diferentes tipos de lixiviación de lecho fijo. El primer tipo de lixiviación es la denominada “*in situ*”, mediante la cual se solubilizan las especies mineralógicas valiosas existentes en un yacimiento sin necesidad de extraer el mineral del terreno, sino por el contrario, inyectando las soluciones lixiviantes en la zona mineralizada. Las soluciones fértiles se recogen a través de pozos desde los que se envían a una planta de tratamiento de líquidos para proceder a la recuperación del metal [18].

Esta técnica *in situ* tiene costos de operaciones relativamente bajos con respecto a otros medios de lixiviación, por lo que se emplean en minas ya explotadas con mineral residual de bajo tenor o en minas que por su bajo tenor no justifican los gastos de explotación. Sin embargo la velocidad de estos procesos es muy lenta (5 a 10 años).

La otra forma de lixiviación de lecho fijo es llamada de *montones o en eras*, esta técnica implica una cuidadosa preparación del terreno de forma que resulte posible la recogida de las soluciones fértiles sin posibilidad de que éstas se pierdan en el terreno en el que se ha implantado.



**Figura 2.6.** Lixiviación en “montones o en eras” [18].

En la figura 2.6. se representa un modelo de lixiviación en montón; en donde para su construcción se procede inicialmente a la preparación del terreno sobre el que se construirá, dejándolo libre de piedras, liso y con una pendiente de 4 a 5 grados. Seguidamente se extiende una capa de arena de río, de unos 5 a 10 cm. de espesor sobre la cual se sitúa una lamina de polietileno. Sobre la lámina de polietileno se colocan tuberías de drenaje perforadas para recoger el licor, que conducen a un canal exterior, desde donde se envía a los depósitos de almacenamiento que, a su vez, alimentarán la planta de recuperación del metal. Estas tuberías están esparcidas a lo largo de toda la base del montón y tienen una ligera pendiente hacia el canal exterior. Sobre la lámina y las tuberías se dispone una nueva capa de arena de 20-25 cm de espesor, con objeto de protegerlas del daño que pudiera producir la carga del mineral en el montón. Sobre esta capa de arena se carga con cuidado una capa de mineral de 50-100 cm. y, a continuación se procede a la carga del resto del mineral no marginal (triturado) a lixiviar utilizando camiones o

bulldozer. El montón de mineral tiene al final una forma tronco-piramidal con alturas que varían en función de las características del mismo.

La cantidad de mineral en el montón depende de una serie de factores como son: configuración del terreno, características del mineral y de la operación, reservas a tratar, etc., pudiendo llegar a sobrepasar el millón de toneladas.

Una vez construido el montón en su totalidad, se comienza la operación de lixiviación del metal contenido en el mineral. Las soluciones lixiviantes, se hacen llegar a la parte superior del montón y se distribuyen utilizando diversos sistemas, como tuberías perforadas, aspersores, etc. Los montones se suelen dividir en secciones para el mejor control y operación. El riego de líquido lixivante se realiza de forma discontinua o continua dependiendo del caso.

Las soluciones fértiles o licores recogidas en los canales exteriores que son conducidos a depósitos, piscinas o balsas en los que se almacenan previamente a su envío a las plantas de concentración. Estas balsas consisten en cubetas construidas por excavación en el propio terreno, que posteriormente se impermeabilizan con láminas de material adecuado: polietileno, neopreno, caucho-butilo, arcillas, etc [18].

- Lixiviación Agitada: En este tipo de lixiviación, el mineral es reducido de tamaño a una granulometría muy fina (menor de  $100-150\mu$ ), para facilitar la transferencia de materia, el cual se encuentra en una pulpa formada con el agente lixivante.

Además de la función principal de la agitación, que es mantener en suspensión el sólido en el seno del líquido para conseguir lixiviarlo, otra función es conseguir una fuerte turbulencia de la pulpa para que así, por la inercia del sólido a seguir el movimiento del líquido, se establezca una velocidad relativa entre ambos, lo que favorece la difusión de los reactivos a través de la capa de tránsito aumentando de velocidad de disolución.

Este tipo de proceso presenta una cinética muy rápida gracias a la gran área superficial del mineral y la agitación del medio, que agiliza notablemente el transporte de productos y reactivos desde la interfase al seno del líquido. En este tipo de lixiviación la pulpa se coloca en un recipiente el cual posee algún dispositivo que permita la agitación de la pulpa. Esta agitación puede ser mecánica o neumática. Además este proceso presenta la ventaja de poder efectuarse en recipiente cerrados lo que permite un buen control ambiental, y a su vez, en estos contenedores cerrados la lixiviación puede darse a presión atmosférica o a presiones artificiales las cuales se modifican para que el proceso sea termodinámicamente estable. En estos recipientes, a los cuales se les da el nombre de digestores, se puede modificar la temperatura con el mismo fin antes dicho. En estos procedimientos el capital requerido es generalmente elevado, además el proceso necesita de posteriores procedimiento de separación sólido – líquido. Esta técnica se emplea para tratar minerales de alto tenor [18].

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Mineral

##### 3.1.1. Recolección de muestras

En primer lugar se debe conocer el tenor general del mineral a lo largo de toda la extensión del depósito, por tal motivo se extrajo el mineral de diferentes puntos, los cuales se encuentran en distintas posiciones y alturas. A estos lugares se les clasificó en dos frentes. Las muestras recolectadas de estos frentes fueron analizadas químicamente y de esta forma se creó a groso modo un mapa de la composición del depósito. La realización de este mapa permitió elegir de forma conveniente los puntos de extracción del mineral a utilizarse en los ensayos de lixiviación [19].

El yacimiento fue clasificado en dos frentes: el primero llamado Damica y el segundo llamado Arneses [19]. Las muestras fueron recolectadas del frente Damica, el cual a su vez presenta tres frentes o niveles. Al nivel más bajo se le dio el nombre de cota 0, al nivel intermedio se denominó como cota 1, el cual está ubicado a una distancia de 10 m por encima de la cota 0, y al nivel más alto se le dio el nombre de cota 2, el cual está ubicado a una distancia de 25 m por encima de la cota 0. La parte más alta del frente Damica se encuentra a una distancia promedio de 15 m por debajo de la loma o parte más alta del frente Arnesen.

Las muestras fueron tomadas de los diferentes niveles del frente Damica, tomándose como variable la cota del mineral, de la siguiente manera:

- La muestra 1 (T2) fue tomada de la cota más alta, es decir, de la cota 2.
- La muestra 2 (T1) fue tomada de la cota intermedia, o sea, de la cota 1.
- La muestra 3 (T0) fue tomada de la cota 0.

El muestreo se realizó en los frentes seleccionados removiendo la capa de la superficie de aproximadamente 10 centímetros, luego se extrajo mineral suficiente para la realización de los ensayos. Cada punto de recolección fue fotografiado para identificar las características del mineral en el yacimiento, así como su ubicación.



**Figura 3.1.** Vista de los tres frentes de la mina estudiada (Damica): (a) Cota superior (T2) y Cota intermedia (T1). (b) Cota intermedia (T1) y Cota inferior (T0).

### 3.1.2. Caracterización del mineral

La caracterización del mineral se basó en una caracterización visual y un análisis químico cuantitativo. Este estudio permitió establecer las rutas o criterios posibles para el proceso de extracción.

La identificación de las posibles fases presentes en este mineral, fue determinada por Betancourt E. y Vivas R. [19], en su estudio de la extracción de níquel y cobalto en lateritas por medio de lixiviación ácida en columnas.

#### 3.1.2.1. Homogenización

Debido a que las muestras fueron tomadas a distintas cotas de la mina, estas no poseen la misma composición, por lo tanto se procedió a la homogenización de estas. Para

ello, primero se toman cantidades iguales de cada punto. Luego se prepara una especie de torta, la cual se mezcla con una herramienta adecuada, por ejemplo una pala. Esta mezcla luego se pasa por una cuarteadora Jhonson, para garantizar su homogenización. Este paso es de vital importancia, ya que pueden afectar los resultados finales de todo el proceso. A estas muestras producto de la mezcla y homogenización de las tres cotas se le dio el nombre de todo en uno, y con este compuesto se realizaron los ensayos de biolixiviación, ya que el todo en uno es una muestra representativa de la alimentación a planta.

### **3.1.2.2. Caracterización Visual**

El mineral fue analizado visualmente, tomándose en cuenta las siguientes características: color general del mineral, partículas de otros colores presentes en el mineral, forma y tamaño de las partículas y terrones y la consistencia de los terrones. En el proceso de observación también se tomo en cuenta cualquier otra característica en particular que haya presentado el mineral.

### **3.1.2.3. Análisis químico cuantitativo**

El análisis químico cuantitativo permite conocer que elementos y en que proporción están contenidos en el mineral. Para esto, existen dos rutas alternativas, una es la fusión y la otra es la digestión con agua regia. Debido a los resultados obtenidos en estudios anteriores [19] se decidió realizar el análisis químico cuantitativo mediante digestión con agua regia, ya que esta ruta es más económica, sencilla y los resultados son similares a los obtenidos por fusión.

La digestión se realizó de la siguiente manera: se tomó una muestra de 0,5 grs. de mineral previamente molido y homogenizado, la cual se colocó en un beaker de teflón donde se le adicionó 20ml de una mezcla de ácido clorhídrico y ácido nítrico en una relación de 3:1 (agua regia) y se calentó a 80 °C aproximadamente por una hora. Posteriormente se destaparon los beakers y fueron llevados a sequedad a una temperatura



de 130°C por 20 minutos. Luego se agregaron 30 ml de ácido nítrico al 1% y se calentó, sin dejar hervir, por 20 minutos. Las soluciones se dejaron enfriar y se filtraron, y posteriormente fueron analizadas por absorción atómica mediante el equipo Analyst 300 de la casa PEKÍN ELMER, y para el análisis de cada elemento se empleo la lámpara de cátodo hueco de este elemento.

### **3.1.3. Preparación física de la muestra**

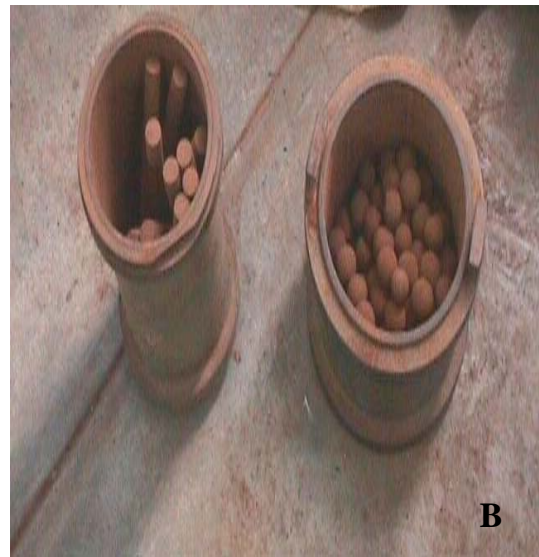
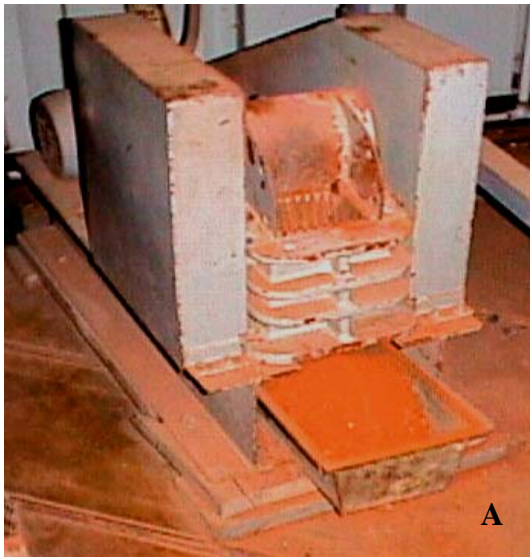
#### **3.1.3.1. Clasificación granulométrica**

Para la clasificación granulométrica del mineral todo en uno en bruto, tal cual como se presenta en la mena, se empleo el método de tamizaje en seco, con la finalidad de establecer las condiciones necesarias para la preparación física de la muestra. El conocimiento de la granulometría es de vital importancia para relacionarlo con el grado de liberación que presenta el mineral.

#### **3.1.3.2. Reducción de tamaño**

El mineral se caracteriza por ser fácilmente deleznable o inconsistente y por presentar una gran cantidad de partículas finas, sin embargo, por la presencia de terrones formados por la aglomeración de estos finos, fue necesaria una reducción de tamaño para reducir estos terrones. Esta reducción se realizó en dos etapas: trituración y molienda.

La trituración se llevó a cabo con una trituradora de mandíbula para reducir los terrones de mayor tamaño, y posteriormente se realizó una molienda en seco, la cual se llevó a cabo a distintos tiempos con la finalidad de determinar la curva de molienda característica de este mineral, por medio de la cual, se pueden establecer las mejores condiciones para obtener un tamaño de partícula determinado. Esta fue realizada con molino de barras y molino de bolas. Las cargas de bolas empleada fue de 12 kg para moler 0.7 kg de mena, y para el molino de barra la carga fue de 6 kg para moler 0,4 kg de mena.



**Figura 3.2.** A: Trituradora de mandíbula, B: Molino de barras y molino de bolas con sus respectivas cargas molidoras.

### 3.2. Microorganismo

Para este trabajo se escogió el hongo *Aspergillus niger*, que ha sido utilizado para la producción industrial de ácido cítrico [11]. Se utilizó el aislado ATCC 1015, incluido en el cepario del Laboratorio de Procesos Fermentativos del Instituto de Biología Experimental (IBE), UCV, inicialmente suministrado por “American Type Culture Colection” (ATCC). El mismo fue subcultivado rutinariamente en agar nutritivo dextrosa papa y conservados en cuñas inclinadas, del mismo medio a  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.3.** *A. niger* cultivado en cuñas inclinadas de agar dextrosa papa

### **3.2.1. Medios de cultivo**

#### **3.2.1.1. Medio de sales (MS)**

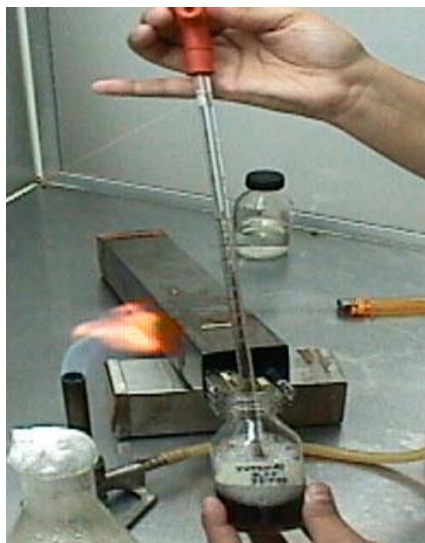
Se utilizó el medio recomendado por Coto O. [3], optimizado para la producción de ácidos orgánicos por *A. niger*. Dicho medio estaba constituido (en gramos por litro) por: 140 de sacarosa, 3 de extracto de levadura, 0.5 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.250 de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.095 de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . El pH fue ajustado a 5 con HCl 1N. Este medio se esterilizó en un autoclave a  $120\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  y a 15 psi durante 20 minutos.

#### **3.2.1.2. Medio de Germen desgrasado de Maíz (MG)**

Medio líquido constituido por: germen desgrasado de maíz al 2% en agua destilada. El germen desgrasado de maíz fue suministrado por Empresas Polar (Promasa, Turmero, edo. Aragua). Este medio se esterilizó en un autoclave a  $120\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  y a 15 psi durante 20 minutos.

### **3.2.2. Preparación de los inóculos**

Las suspensiones de esporas para los inóculos fueron preparadas a partir de cultivos esporulados de 5 días, conservados en tubos de ensayo con agar nutritivo dextrosa papa en plano inclinado, mediante la adición de Tween 80 al 0.5% estéril ( $120\text{ }^\circ\text{C}$ , 15 psi, 20 min) y agitación manual. La concentración de esporas fue determinada mediante el uso de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico.



**Figura 3.4.** Suspensión de esporas para la inoculación.

### **3.2.3. Cultivos Sumergidos**

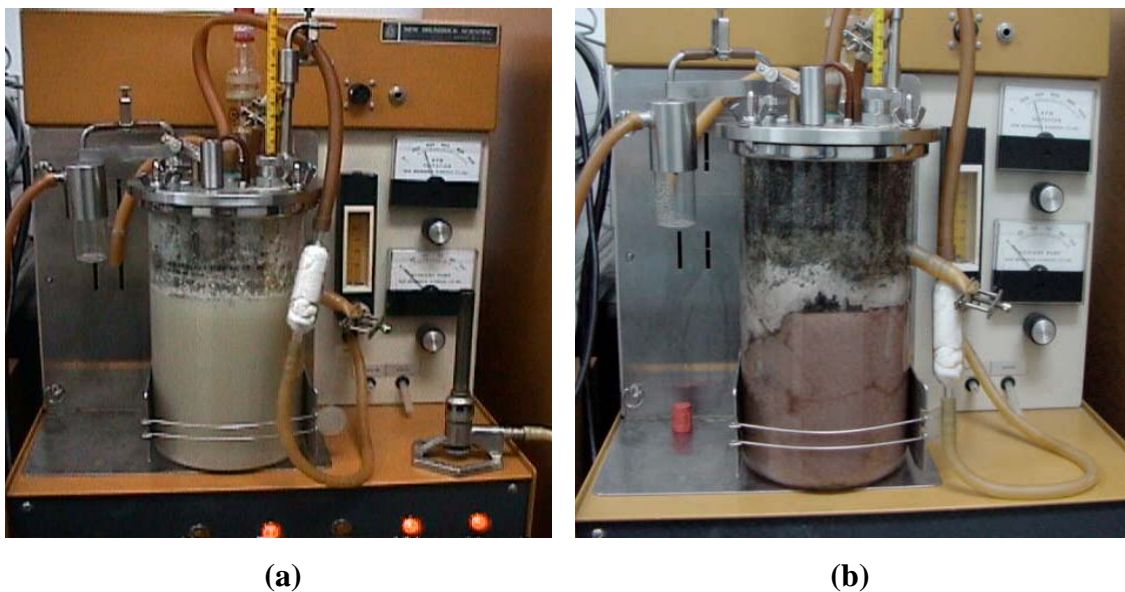
#### **3.2.3.1. En matraces erlenmeyer**

El cultivo se llevó a cabo, por duplicado, en matraces erlenmeyer de 1 litro con un volumen de trabajo de 200 ml de medio MS e inoculado con  $5 \times 10^5$  esporas por mililitro. Las incubaciones se realizaron a  $26 \pm 1$  °C en un agitador orbital New Brunswick Scientific modelo G27 a 130 rpm. Un erlenmeyer fue procesado por día según lo descrito en 3.2.4.1 y 3.2.5.

#### **3.2.3.2. En Tanque de Fermentación**

Se utilizó una unidad de fermentación New Brunswick Scientific BioFlo-C30 equipada con un tanque de 2 litros y sus respectivos sistemas de monitoreo y control de: temperatura, pH, agitación y aireación. Los cultivos fueron realizados en medio MS y posteriormente en medio MG. Para ambos casos se utilizó un volumen de trabajo de 1.5 litros, agitación a 300 rpm, con un suministro de aire de 0.6 vvm a la temperatura de  $26$  °C  $\pm 1$  °C y un pH inicial de 5 para el medio MS y de 6 en el caso del medio MG. La

inoculación se realizó con  $5 \times 10^5$  esporas por mililitro. Se extrajeron alícuotas del cultivo de 50 ml tres veces por día, las cuales fueron procesadas según se indica en 3.2.4 y 3.2.5. Al final del crecimiento se procesó todo el contenido de la unidad de fermentación como se especifica en 3.2.4, 3.2.5 y 3.2.6.



**Figura 3.5.** Cultivos sumergidos en tanque de fermentación a los 5 días de incubación. (a) Cultivo en MS. (b) Cultivo en MG.

### 3.2.4. Determinación de la biomasa en los cultivos sumergidos

#### 3.2.4.1. Directa por gravimetría

El micelio fue cosechado por filtración de volúmenes conocidos de cultivo a través de filtros Whatman N°1 prepesados y posteriormente secados a  $60^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante. Del filtrado se obtuvo una solución sobrenadante que fue utilizada como agente lixivante como se indica en 3.4.1, y previa determinación de la acidez según lo descrito en 3.2.5. Este procedimiento sólo se utilizó para la determinación de biomasa en cultivos sumergidos en medio MS en ausencia de mineral.

### **3.2.4.2. Indirecta por el método de Ride y Drysdale**

Debido a la presencia de sólidos en suspensión en los cultivos sumergidos en medio MG, lo cual hace imposible la separación de la biomasa del resto de la materia fermentada, se procedió a estimar el crecimiento fúngico en forma indirecta, en base a medidas de N-acetilglucosamina, utilizando el método de Ride y Drysdale (1972) (ver Anexos).

La acetilglucosamina es un monosacárido constituyente de la quitina, la cual es uno de los componentes de la pared celular de los hongos filamentosos. Esta representa alrededor del 2-3% de la biomasa total obtenida.

Este método consta básicamente de dos etapas: hidrólisis de la muestra y colorimetría. Con la hidrólisis se logra la despolimerización del N-acetilglucosamina. Con la colorimetría se logra descomponer el N-acetilglucosamina y de esta manera obtener glucosamina, además, en esta etapa se forma un compuesto de 3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hidrazone (MBTH) con dos glucosamina produciéndose de esta manera la coloración de la muestra, requerida para la medición en un espectrofotómetro.

La curva de calibración fue determinada con patrones de glucosamina a distintas concentraciones (32 mg/l, 21.33 mg/l y 10.67 mg/l). Para estimar la concentración de biomasa por este método, fue necesario determinar el contenido de glucosamina presente en el micelio puro, seco y molido, obtenido según lo descrito en 3.2.3.2 en medio MS, y de esta manera poder realizar los cálculos que fueron necesarios para estimar de forma indirecta la biomasa. Con el fin de determinar la posible interferencia del germen desgrasado de maíz en las medidas, se procedió a medir el contenido de glucosamina presente en éste.

### **3.2.5. Determinación del pH y la acidez de los cultivos sumergidos**

Al sobrenadante obtenido según se especifica en 3.2.4 se le determinó el pH, con un analizador de pH marca Corning modelo 7.

La acidez de los cultivos fue determinada mediante valoración con NaOH 0.1 N de una alícuota de 5 ml del sobrenadante obtenido según se indica en 3.2.4, tomando como punto de equivalencia el valor de pH de 8.1. Para el cálculo de la acidez se utilizó la siguiente expresión:

$$N = \text{Vol. NaOH} * N(\text{NaOH}) / \text{Vol. Alícuota} \quad (22)$$

### **3.2.6. Determinación de la concentración de ácidos orgánicos**

La determinación de la concentración de los ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido oxálico), producidos por *A. niger* fue realizada por el Centro de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), bajo las siguientes condiciones:

- Equipo: Cromatógrafo Líquido: Marca Hewlett Packard Modelo: Serie 1100
- Detector: UV-Visible, con arreglo de diodo.
- Columna: Aminex HPX-87H (columna para ácido orgánico) 300x7.8mm.
- Longitud de onda: 213 nm.

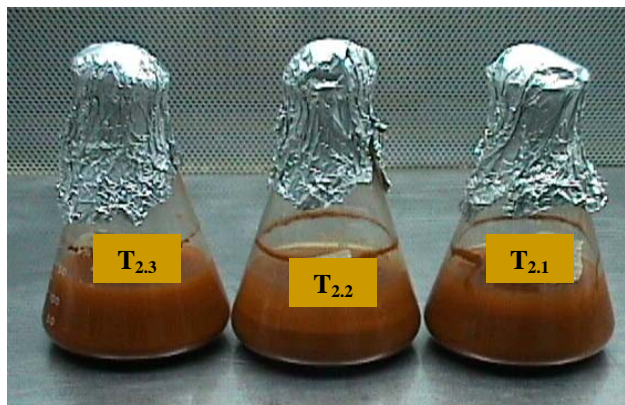
### **3.3. Lixiviación Química con ácidos orgánicos comerciales**

Se utilizaron matraces erlenmeyer de 250 ml con un volumen de trabajo de 100 ml. Los ácidos orgánicos comerciales utilizados fueron ácido cítrico y ácido oxálico, a una concentración de 0.5 molar. La lixiviación se realizó en un agitador orbital New Brunswick Scientific modelo G27 a 130 rpm y  $26 \pm 1$  °C. En este proceso se trabajó con dos densidades de pulpa (5 y 10%), con la finalidad de evaluar el efecto de la densidad de pulpa en la recuperación de los metales de interés. Alícuotas de 15 ml fueron tomadas cada 7 días por un período de 40 días. En ellas se determinó por absorción atómica la concentración de los metales en la solución mediante el equipo Analyst 300 de la casa PEKÍN ELMER, y para el análisis de cada elemento se empleó la lámpara de cátodo hueco de este elemento. Este proceso se realizó por duplicado.

### 3.4. Biolixiviación

#### 3.4.1. Biolixiviación Indirecta

La Biolixiviación indirecta fue realizada en matraces erlenmeyer de 250 ml, cada uno de los cuales contenía 5 gramos de mineral y 100 ml de sobrenadante, previamente esterilizados (120°C, 15 psi, 20 min), obtenido por día según lo descrito en 3.2.3.1. Paralelamente se realizó el método indirecto en matraces erlenmeyer de 250 ml, cada uno de los cuales contenía 5 gramos de mineral y usando como solución lixivante 100 ml del sobrenadante, previamente esterilizados (120°C, 15 psi, 20 min), obtenido al final del crecimiento de *A. niger* según lo descrito 3.2.3.2. La biolixiviación indirecta se realizó en un agitador orbital New Brunswick Scientific modelo G27 a 130 rpm y  $26 \pm 1$  °C. Alícuotas de 15 ml fueron tomadas cada cierto tiempo, para poder determinar por absorción atómica la concentración de los metales en la solución mediante el equipo Aanalyst 300 de la casa PEKÍN ELMER, y para el análisis de cada elemento se empleó la lámpara de cátodo hueco de este elemento.



**Figura 3.6.** Biolixiviación indirecta usando como solución lixivante el sobrenadante obtenido Cultivos Sumergidos en Tanque de Fermentación con medio MS.



### **3.4.2. Biolixiviación Directa**

#### **3.4.2.1. Biolixiviación Directa en cultivo sumergido**

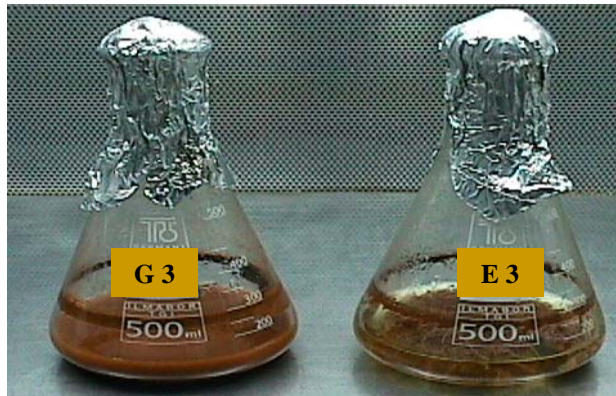
Se realizó en matraces erlenmeyer de 500 ml con un volumen de trabajo de 100 ml de medio MS y paralelamente medio MG. Los cultivos se iniciaron con un inóculo de  $5 \times 10^5$  esporas por mililitro en 100 ml de medio y con 5 gramos de mineral pasante de malla 200, previamente esterilizado. Estos cultivos fueron incubados a  $26 \pm 1$  °C en un orbital New Brunswick Scientific modelo G27 a 130 rpm. Se midió la cinética de lixiviación en función del tiempo, para lo cual se filtró el contenido de un matraz erlenmeyer obteniendo una solución sobrenadante o licor rico en los metales de interés, a la cual se le determinó el pH y la acidez según lo descrito en 3.2.5, y la cantidad recuperada de metales (Co, Ni y Fe) se determinó por absorción atómica mediante el equipo Analyst 300 de la casa PEKÍN ELMER, y para el análisis de cada elemento se empleó la lámpara de cátodo hueco de este elemento.

Para la determinación de biomasa en el método directo, se utilizó el método de Ehresmann de extracción y determinación de proteínas de sustrato sólido fermentado. El contenido de proteínas en la biomasa es alrededor del 40-50%.

Este método se basa en una extracción de proteínas de la muestra con Lauril Sulfato de Sodio (SDS) al 2% a 100 °C durante 5 minutos, luego se centrifuga a 12000 g por 5 minutos. Por último, se mide la densidad óptica en un espectrofotómetro a dos longitudes de onda (228.5 nm y 234.5 nm), y el contenido de proteínas del sobrenadante se determina mediante la fórmula de Ehresmann (ver Anexos).

La curva de calibración fue determinada con estándares de albúmina a distintas concentraciones. Este método se realiza para una cantidad conocida de micelio puro, con la finalidad de determinar el porcentaje de proteínas que contiene.

La posible interferencia del mineral en la determinación de proteínas, se determinó preparando una muestra del método directo con una cantidad conocida de uno de los estándares de albúmina preparados, a la cual se le determina la cantidad de proteínas (ver Anexos).



**Figura 3.7.** Biolixiviación directa en medio MG (G3) y en medio MS (E3) a los 14 días de incubación.

### 3.5. Ensayo exploratorio

#### 3.5.1. Biolixiviación directa en fermentación sólida

Debido a la gran posibilidad, viabilidad y sencillez que presenta el medio sólido para su aplicación en procesos de biolixiviación directa *en situ* o en pilas, se realizaron ensayos muy preliminares del método directo de biolixiviación en fermentación sólida. El medio sólido (MGC) está basado en una mezcla de germen desgrasado de maíz, cáscara de arroz, en una proporción de 1:1 y 5 gramos de mineral. La mezcla fue hidratada con agua con 55% base húmeda Este medio se esterilizó en un autoclave a  $120\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a 15 psi durante 20 minutos.

La biolixiviación fue realizada en botellas de boca ancha de 250 ml. La inoculación se realizó con  $10^6$  esporas por gramo de sólidos. La incubación fue realizada a  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Durante las incubaciones las botellas permanecieron estáticas y en posición vertical. La

cinética de lixiviación fue medida en función del tiempo, para lo cual las muestras fueron suspendidas con 100 ml de agua, determinándose la acidez titulable y el pH según lo descrito en 3.2.5 y la recuperación de los metales de interés se determinó por absorción atómica mediante el equipo Aanalyst 300 de la casa PEKÍN ELMER, y para el análisis de cada elemento se empleó la lámpara de cátodo hueco de este elemento.



**Figura 3.8.** Biolixiviación directa: a la izquierda se observa el control del proceso constituido por medio MGC inoculado, a la derecha se encuentra el método directo en fermentación sólida.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Mineral

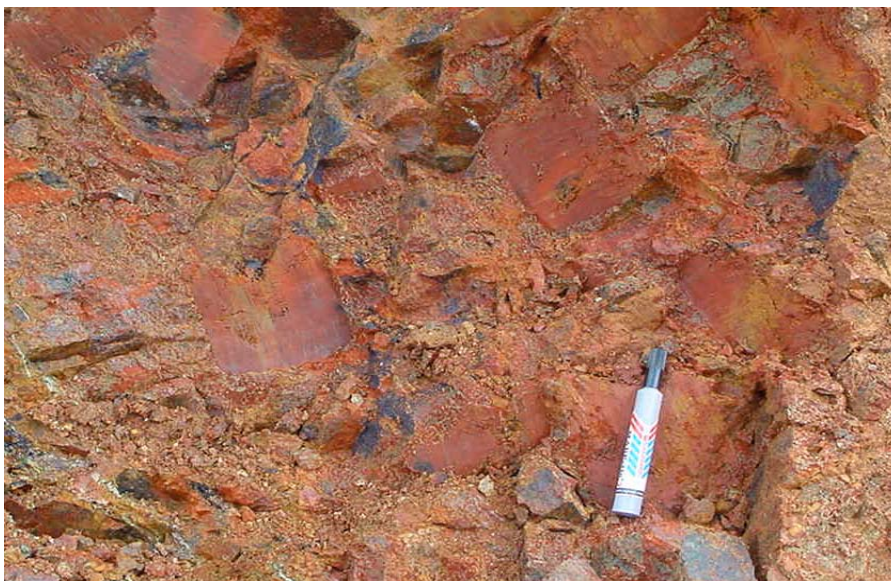
#### 4.1.1. Caracterización del mineral:

La morfología y características principales de los diferentes frentes de la mena se describen en la tabla 4.1:

**Tabla 4.1.** Caracterización visual del mineral

<b>Muestra</b>	<b>Color</b>	<b>Forma</b>	<b>Característica</b>
Damica T0	Marrón	<b>Terrones:</b> - Sub-angular - Aristas pronunciadas - Menores a 7 cm <b>Finos:</b> - Cantidad considerable	- Tamaños Mixtos - Relativamente homogéneo - Alta humedad
Damica T1 Damica T2	Rojizo	<b>Terrones:</b> - Sub-angular - Menores a 10 cm - Aristas pronunciadas <b>Finos:</b> - Cantidad considerable	- Tamaños Mixtos - Presencia de pocas zonas Blancas - Relativamente homogéneo - Alta humedad

La apariencia del mineral de la cota inferior (T0) en la mena, una vez removida la capa superficial, se observa en la figura 4.1.



**Figura 4.1.** Apariencia del mineral (Damica T0) en el depósito.

En la tabla anterior se aprecian las características físicas principales del mineral proveniente de distintas zonas de la mena. Se puede observar que el mineral no presenta considerables diferencias dependiendo de la cota o frente de extracción en la mena, lo que quiere decir que existe una moderada homogeneidad a lo largo de esta. En la figura 3.1 se aprecia la apariencia del mineral en el depósito.

La composición del mineral en sitios puntuales se caracteriza por ser moderadamente heterogénea. Esto se observa en la figura 4.1, en donde se distinguen diferentes colores que dependen de la composición.

Además, el mineral se caracteriza por ser fácilmente deleznable o inconsistentes, presentado una resistencia variable dependiendo del lugar de extracción de los terrones. Además todas las muestras presentan gran cantidad de finos debido a que los terrones son aglomeraciones de partículas finas, producto de la humedad y el contenido de arcilla de la mena. Debido a la condición de los terrones no se pudo realizar una mineralogía formal ya que esta requiere que la muestra a analizar se una roca que pueda llegar a cortarse para posteriormente ser pulida y observada en un microscopio.

A parte de encontrar finos y los terrones formados por estos, en las muestras se encuentran fragmentos de rocas duras como ópalo y cuarzo, en pequeñas porciones.

#### 4.1.2. Análisis químico cuantitativo

Luego de caracterizar el mineral visualmente, se procedió a establecer un perfil de composición química de la mena mediante un análisis químico cuantitativo por la técnica disolución por digestión en agua regia. Los valores obtenidos se representan en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Composición porcentual de níquel, cobalto y hierro presente en las distintas muestras de mineral

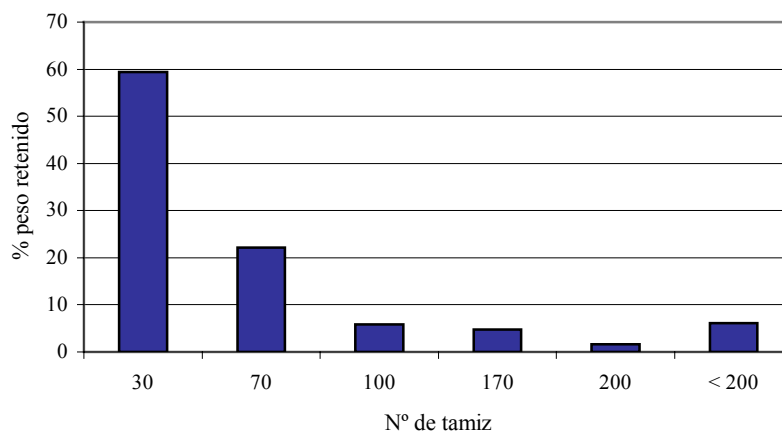
Muestra	% Ni	% Co	% Fe
T0	1.3909 ± 0.0658	0.0632 ± 0.0038	22.1323 ± 0.1600
T1	1.5745 ± 0.0219	0.1615 ± 0.0022	43.4313 ± 0.8060
T2	1.0800 ± 0.0523	0.0535 ± 0.0011	21.1922 ± 2.3175
Todo en uno	1.0920 ± 0.1230	0.1010 ± 0.0200	30.8000 ± 1.5000

En la tabla anterior se observa, que la composición química del mineral, en los tres frentes de extracción, es similar o homogénea, presentándose la mayor variación en el porcentaje de hierro presente en la cota 1. Estos valores concuerdan con la caracterización visual realizada previamente.

En el trabajo realizado por Betancourt E. y Vivas R. [19], se determinó que las posibles fases de níquel presentes en este mineral son: Garnierita  $(\text{Ni,Mg})_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ , Willemsite  $(\text{Ni,Mg})_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$  y Trevorita  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ . Entre las fases mayoritarias del material encontraron la hematita y la goetita. En este estudio también se detectaron arcillas: montmorillonite y kaolinita.

#### 4.1.3. Clasificación granulométrica

El mineral todo en uno, en bruto, fue clasificado por tamaño de partícula mediante tamizaje en seco.



**Gráfico 4.1.** Distribución granulométrica mediante tamizaje en seco de la muestra todo en uno

Adicionalmente, a la muestra todo en uno, en bruto, se le determinó el contenido porcentual de níquel y cobalto a diferentes granulometrías.

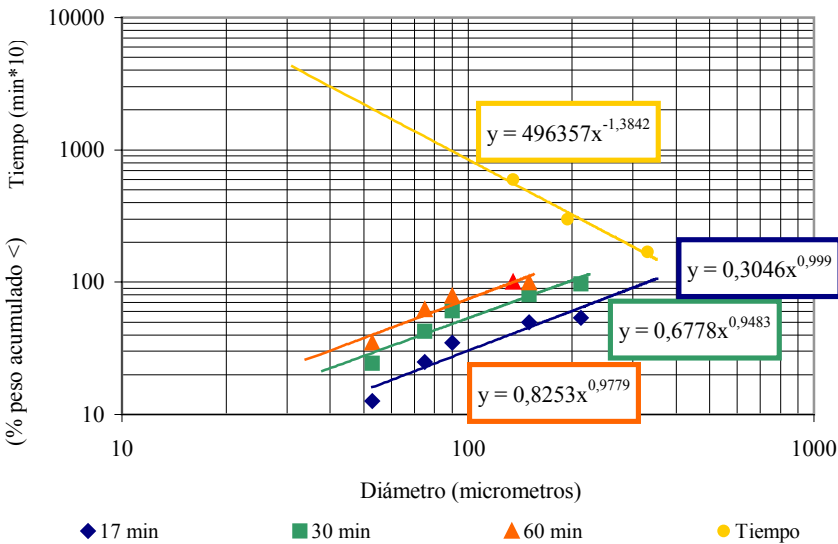
**Tabla 4.3.** Análisis químico elemental de la muestra todo en uno

Nº de tamiz	%Níquel	%Cobalto
16	0,560 ± 0.001	0,142 ± 0.005
30	1,176 ± 0.080	0,355 ± 0.006
70	1,189 ± 0.023	0,197 ± 0.002
100	1,039 ± 0.011	0,078 ± 0.001
150	1,006 ± 0.056	0,054 ± 0.007
270	0,982 ± 0.024	0,032 ± 0.009
400	1,085 ± 0.064	0,037 ± 0.011

Al realizar el tamizaje en seco, actúan fuerzas de atracción que mantienen unidos los finos presentes en el mineral, lo cual trae como consecuencia la formación de aglomerados que producen un error al momento de realizar la clasificación granulométrica por esta vía. Este efecto puede ser observado en el gráfico 4.1, en donde aproximadamente un 60% es retenido en la malla 30 y apenas un 6% es pasante de malla 200. A su vez, mediante el tamizaje seco no se rompen los terrones existentes en el mineral, lo cual también ocasiona que las partículas se encuentren, en su mayoría, retenidas en las mallas 30 y 70, cuando se utiliza esta vía de clasificación granulométrica.

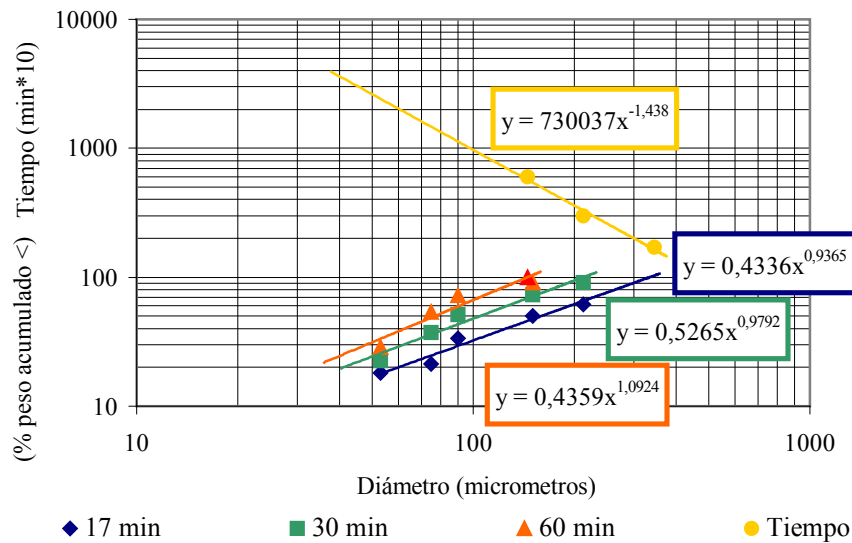
En cuanto al tenor por tamaño de partícula, en la tabla 4.3 se aprecia que el níquel se encuentra relativamente en la misma proporción en todas las granulometrías con excepción de la malla 16 donde el tenor de este baja a 0,56%. Para el caso del cobalto, este se encuentra en las mallas de mayor tamaño 16, 30 y 70, ocurriendo un empobrecimiento en las mallas menores. De estos resultados se puede decir que, para el caso del níquel no es viable concentrarlo por clasificación granulométrica ya que en líneas generales el tenor de este se mantiene en todos los tamaños de partículas. Caso contrario sucede para el cobalto, donde con una simple clasificación granulométrica, se tendrá una excelente concentración de este elemento.

Debido a los resultados obtenidos en la clasificación granulométrica de la muestra todo en uno en bruto, mediante el tamizaje en seco, fue necesario realizar una reducción de tamaño para alcanzar un tamaño de partícula pasante de malla 200, el cual era necesario en los procesos de biolixiviación. Por tal motivo se realizaron curvas de molienda con el fin de conocer el comportamiento del mineral durante la reducción de tamaño. Con los resultados expresados en los gráficos 4.2 y 4.3. se pueden determinar los tiempos necesarios para obtener las granulometrías deseadas.



**Gráfico 4.2.** Curva de molienda de la muestra todo en uno, utilizando molino de bolas.





**Gráfico 4.3.** Curva de molienda de la muestra todo en uno, utilizando molino de barras.

En los gráficos 4.2 y 4.3, se observa que la eficiencia, en cuanto al tiempo molienda de ambos molinos es similar, por lo que estos molinos se pueden utilizar a la par para alcanzar una granulometría determinada, y de esta manera optimizar esta etapa de reducción. Además, se puede observar que para alcanzar un tamaño de partícula cien por ciento pasante de malla 200, es necesario un tiempo de molienda de aproximadamente dos horas y quince minutos.

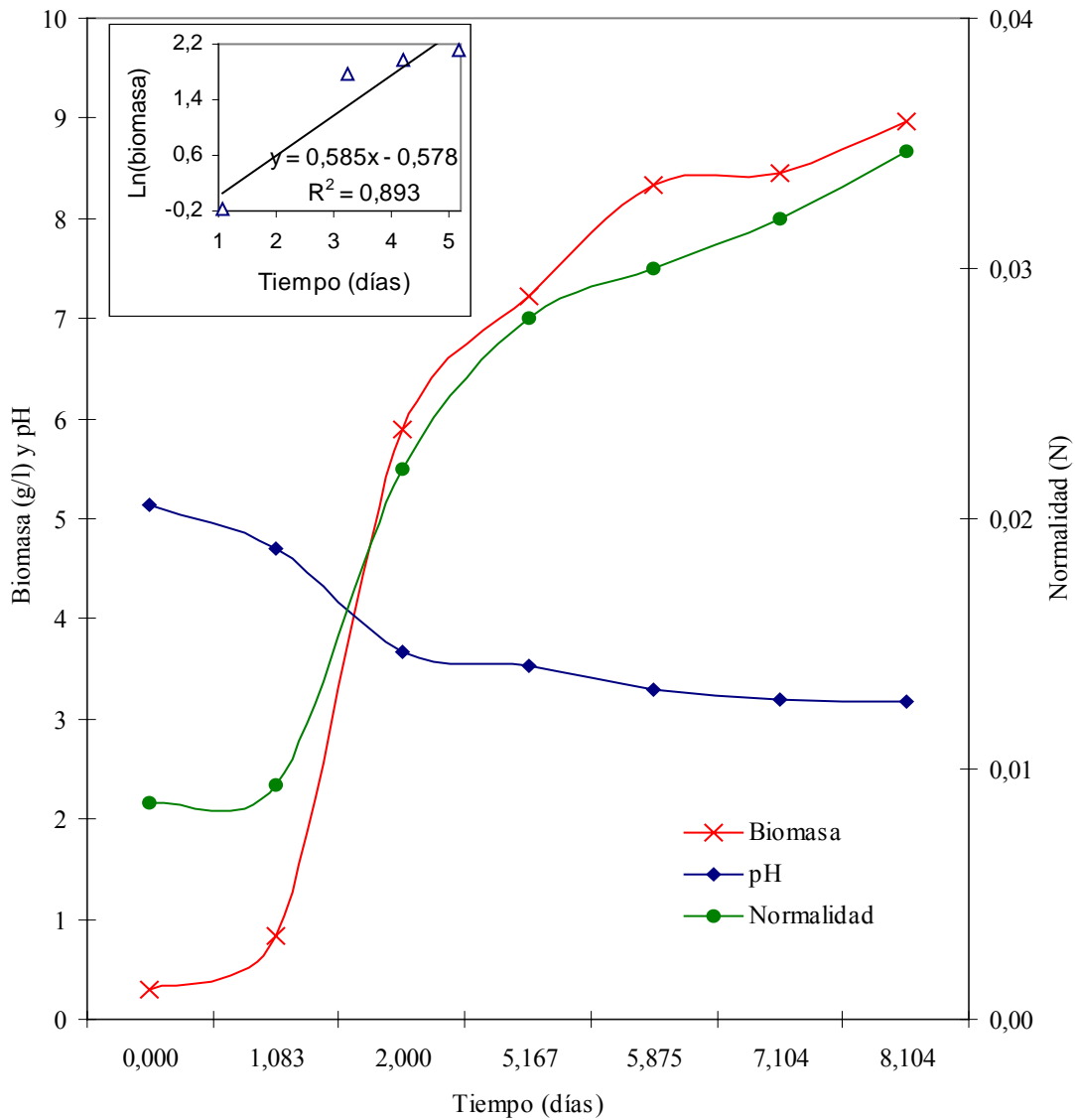
## 4.2. Microorganismo

La escogencia de *A. niger*, se basó en que numerosos estudios de biolixiviación de lateritas han demostrado la efectividad y selectividad de los productos metabólicos de *A. niger*, principalmente ácido cítrico, en la disolución de níquel [15,16,20]. Además, el aislado ATCC 1015 ha sido descrito como un buen productor de ácido cítrico, como lo señala Tremarias M [11], en su estudio relacionado con la producción de ácido cítrico por *A. niger* a partir de jugo de nepe.

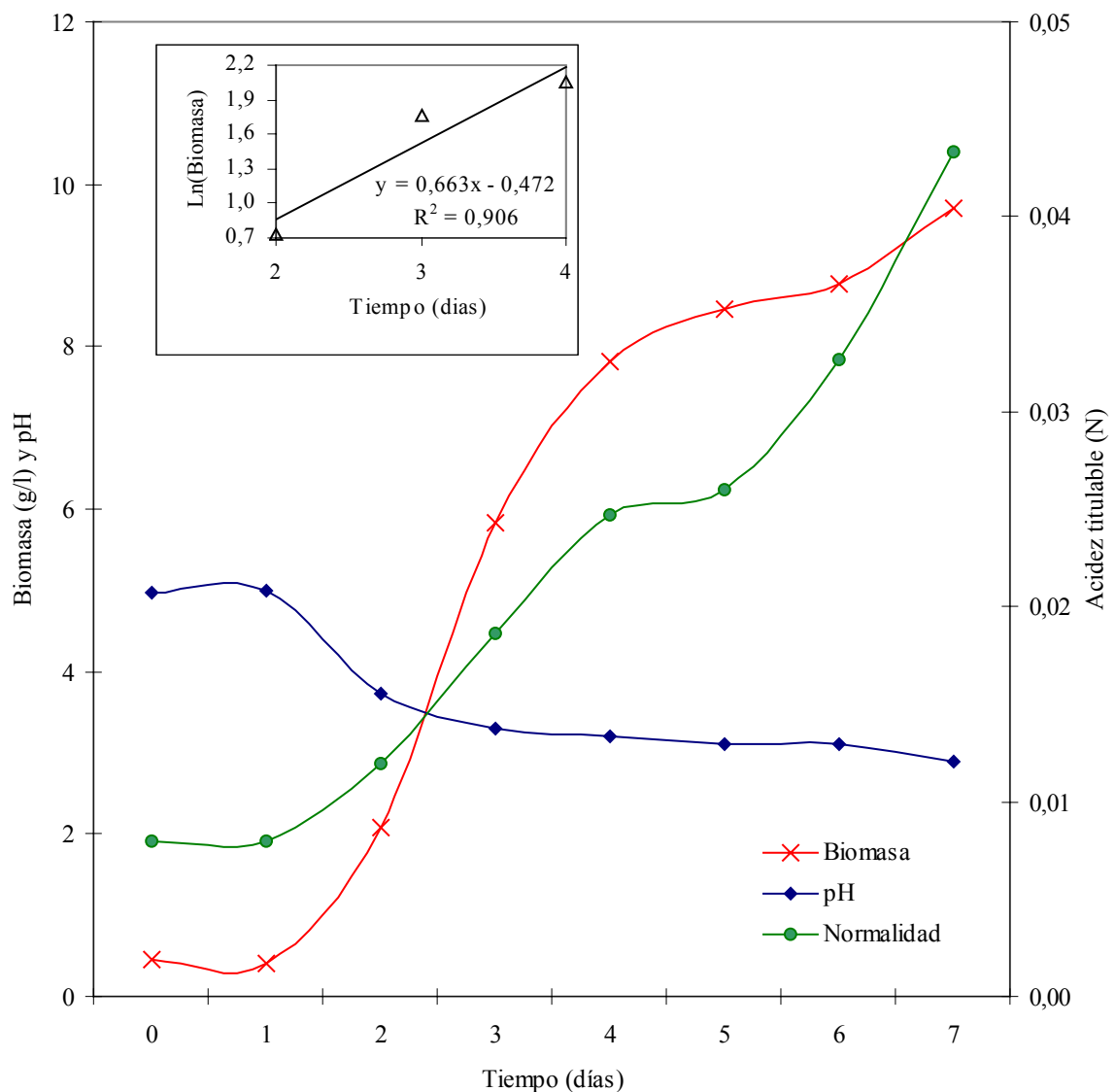
El estudio del microorganismo se basó en la evaluación y determinación de la cinética de crecimiento de *A. niger* en cultivos sumergidos, variando el medio nutritivo y

las condiciones de incubación. Además se evaluó la variación de la acidez, el pH y producción de ácidos orgánicos durante el periodo de crecimiento.

Los valores de biomasa, pH y acidez obtenidos en cultivos sumergidos en matraces erlenmeyer, se representan en los siguientes gráficos:



**Gráfico 4.4.a.** Cinética de crecimiento de *A. niger* en medio MS, los cultivos fueron desarrollados en matraces según se especifica en 3.2.3.1. El inserto corresponde a la regresión lineal del logaritmo natural de la concentración de biomasa sobre el tiempo, durante la fase exponencial de crecimiento.



**Gráfico 4.4.b.** Cinética de crecimiento de *A. niger* en medio MS, los cultivos fueron desarrollados en matraces según se especifica en 3.2.3.1. El inserto corresponde a la regresión lineal del logaritmo natural de la concentración de biomasa sobre el tiempo, durante la fase exponencial de crecimiento.

La Cinética de crecimiento en cultivos sumergidos en matraces se realizó por duplicado (graf. 4.4.a y b). En estos gráficos se observa una reproducibilidad en los valores, lo que garantiza una correcta caracterización del crecimiento de *A. niger* bajo estas condiciones.

Al final del crecimiento, la concentración de biomasa fue de  $9.3395 \text{ g/l} \pm 0.5182$  g/l, mientras que el pH se estabilizó aproximadamente a un valor de 3. La concentración de ácidos en el medio aumentó respecto al tiempo, durante el crecimiento.

En estos gráficos se observan tres fases del ciclo de crecimiento microbiano. Durante el primer día de crecimiento no se observa un aumento significativo en la concentración de biomasa, debido a que éste es el tiempo requerido por las esporas para la germinación y de esta forma dar paso a una fase de crecimiento exponencial. Esta última fase se caracteriza por el incremento rápido de biomasa, debido a que existe una óptima concentración de todos los nutrientes necesarios para el crecimiento. La fase exponencial culmina al agotarse el sustrato limitante, dando paso a la fase estacionaria.

Para la determinación del sustrato limitante en el medio MS, se procedió a calcular la relación Carbono/Nitrogeno del medio, según lo descrito por Blas Dorta [21], donde explica que la relación C/N de la biomasa es aproximadamente de 5, debido, a que la fórmula mínima de la biomasa promedio es  $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ , y, si la relación del medio excede este valor, el nitrógeno sería el sustrato limitante. En el caso del medio MS, el nitrógeno es el sustrato limitante, ya que dicha relación es superior a la de la biomasa.

En la fase estacionaria se observa una disminución de la velocidad de crecimiento debido al agotamiento del nitrógeno, y de esta manera la fuente de carbono (sacarosa) presente en el medio es asimilada por *A. niger* principalmente para la producción de ácidos orgánicos, razón por la cual, la acidez sigue aumentando en esta tercera fase de crecimiento.

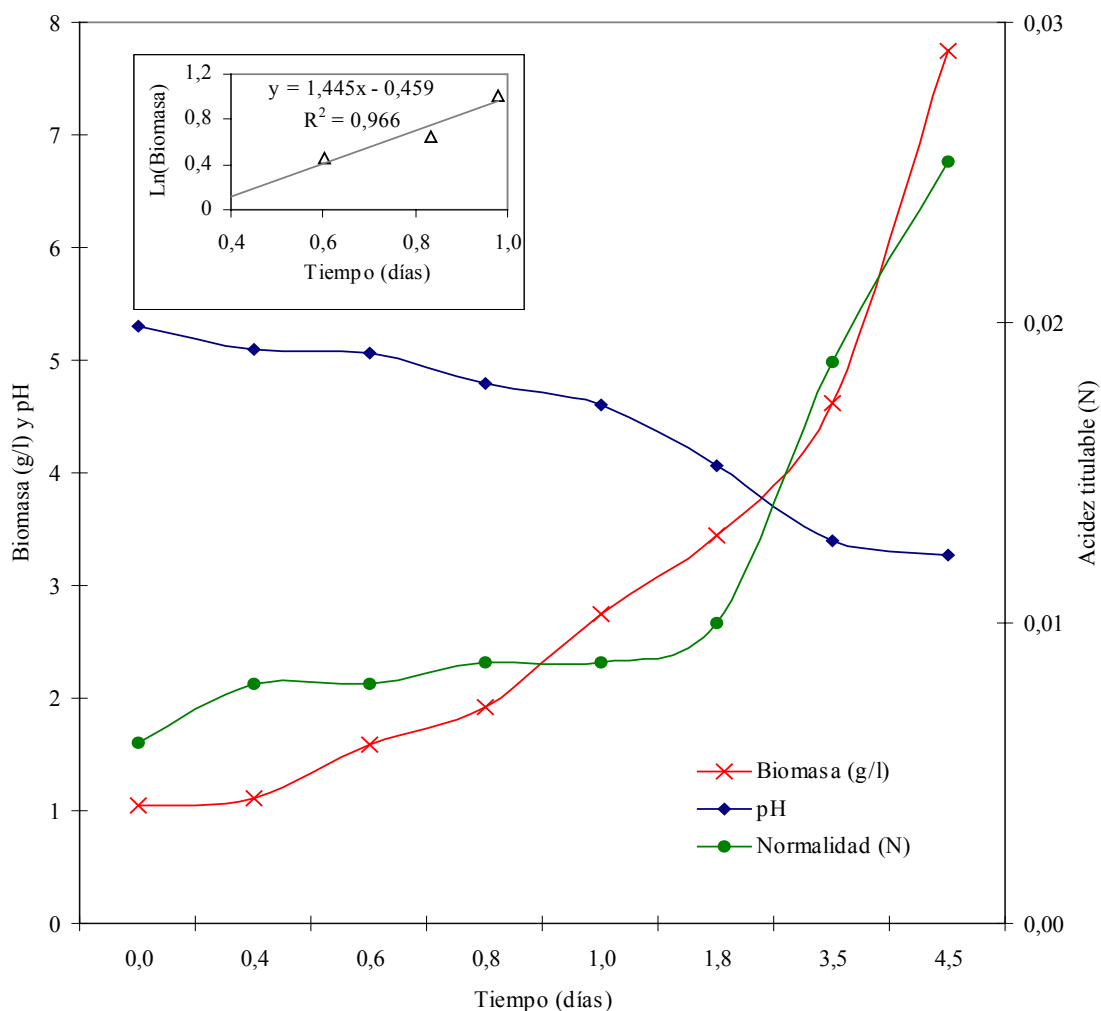
En el inserto de los gráficos anteriores, se observa la velocidad específica de crecimiento máximo, que esta representada por la pendiente de la recta obtenida. El corte de esta recta con el eje de las ordenadas representa el logaritmo natural de la concentración del inóculo, y por medio de la ecuación (11) se pudo estimar el tiempo de generación. Estos valores se expresan a continuación:

$$\mu_m = 0.624 \text{ días}^{-1} \pm 0.055 \text{ días}^{-1}$$

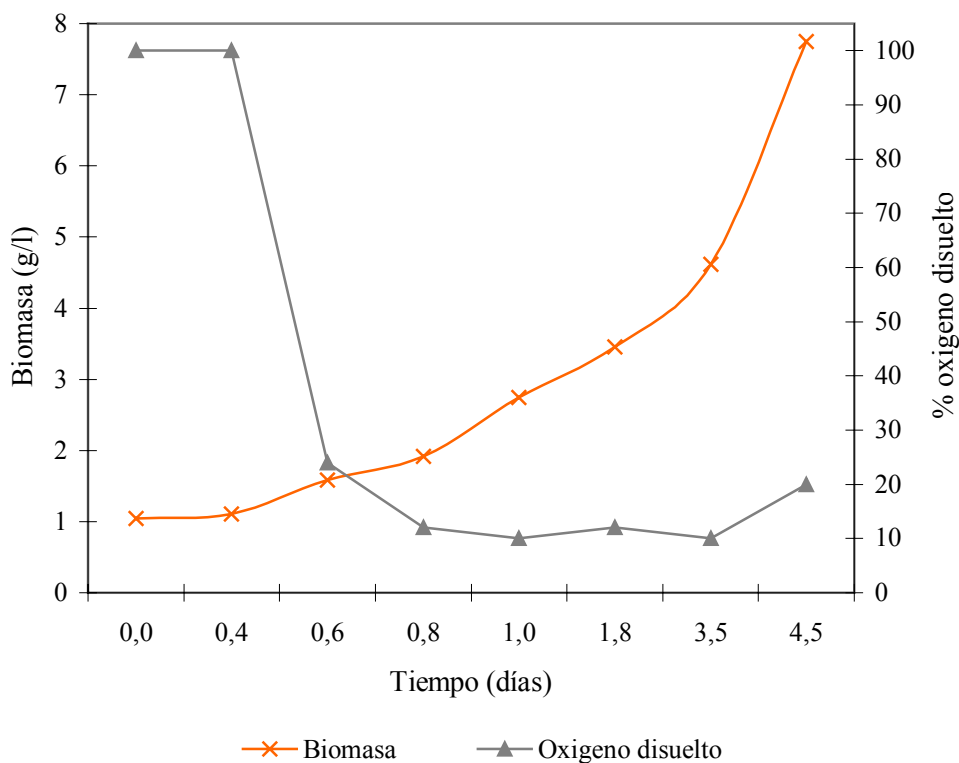
$$x_0 = 0.592 \text{ g/l} \pm 0.044 \text{ g/l}$$

$$t_g = 1.115 \text{ días} \pm 0.099 \text{ días}$$

El crecimiento de *A. niger* también fue estudiado en tanque de fermentación, utilizando medio MS y paralelamente medio MG, con la finalidad de optimizar las condiciones de incubación. Las variables medidas se representan a continuación:



**Gráfico 4.5.** Cinética de crecimiento de *A. niger* en medio MS, los cultivos fueron desarrollados en una unidad de fermentación New Brunswick BioFlo C30, según se especifica en 3.2.3.2. El inserto corresponde a la regresión lineal del logaritmo natural de la concentración de biomasa sobre el tiempo, durante la fase exponencial de crecimiento.



**Grafico 4.6.** Efecto de la variación del oxígeno disuelto durante el crecimiento de *A. niger* en una unidad de fermentación New Brunswick BioFlo C30 en medio MS, según se especifica en 3.2.3.2.

En el gráfico 4.5 se observa, que al final del crecimiento la concentración de biomasa fue de 7.744 g/l, mientras que el pH alcanzó aproximadamente un valor de 3 al final del crecimiento. La concentración de ácidos en el medio aumentó respecto al tiempo, durante el ciclo de crecimiento, sin embargo, durante el primer día de incubación este aumento no fue significativo, debido a, que en esta etapa no existe agotamiento del sustrato limitante, y el descenso del porcentaje de oxígeno disuelto (graf. 4.6), indica que la producción de ácidos está limitada. Después del primer día de incubación se observa la estabilización del porcentaje de oxígeno disuelto y un aumento de la acidez (graf. 4.5 y 4.6), lo que evidencia el comienzo del agotamiento del sustrato limitante, que conlleva a que el metabolismo se redirija a la producción de ácidos orgánicos (ácido cítrico). En el cuarto día de crecimiento el porcentaje de oxígeno disuelto aumenta de 10% a 20%, lo que indica el comienzo de la disminución de la velocidad de crecimiento.

Debido a la presencia de gran cantidad de biomasa, fue imposible la toma de muestras representativas a partir del quinto día de incubación, por lo que la fase estacionaria no pudo ser detectada. Si esta incubación se hubiese realizado por más de cinco días, se podría haber alcanzado un 100 % de oxígeno disuelto que indicaría el cese del crecimiento, y de esta manera se lograría alcanzar una mayor concentración de ácidos.

Además se observa que la fase de latencia solo dura diez horas, para luego dar paso a la fase exponencial del ciclo de crecimiento.

La velocidad específica de crecimiento máximo y la concentración del inóculo, se encuentran expresados en la ecuación de la recta ubicada en el inserto, y cuyos valores son:

$$\mu_m = 1.445 \text{ días}^{-1}$$

$$x_0 = 0.632 \text{ g/l}$$

$$t_g = 0.479 \text{ días}$$

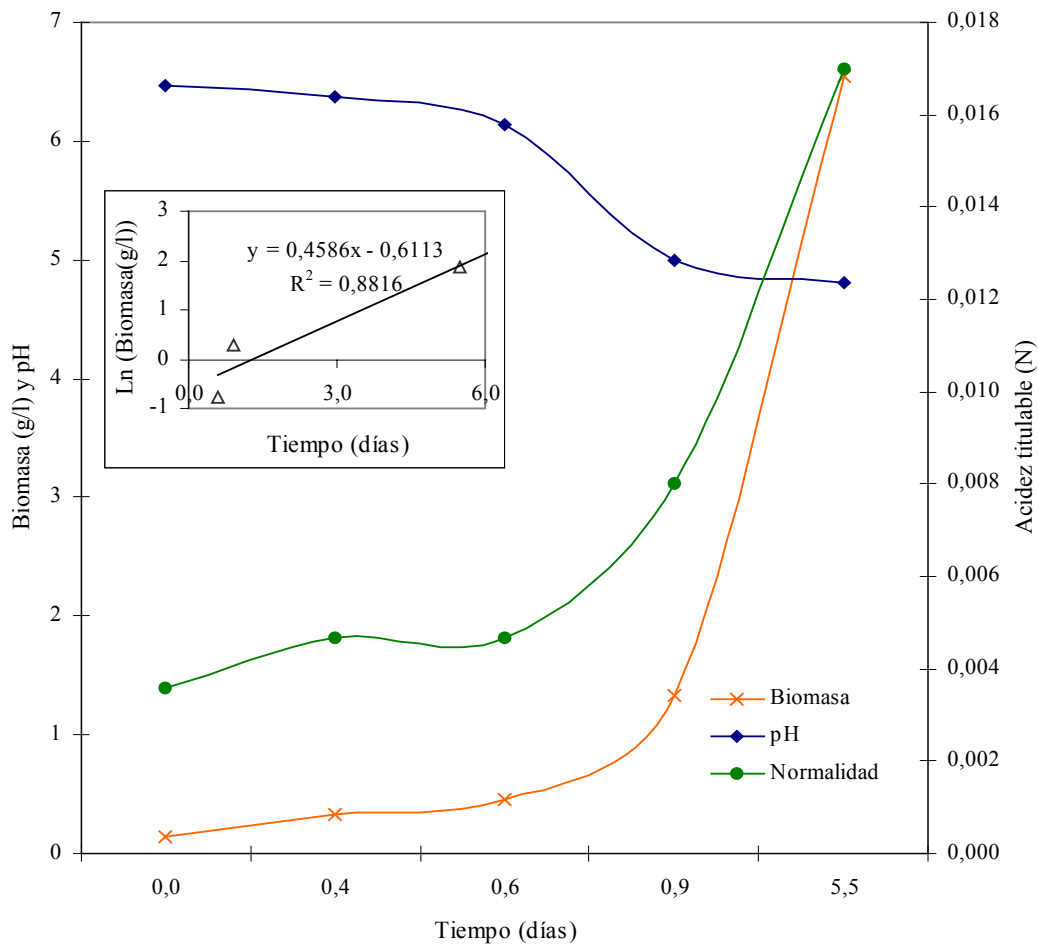
Al comparar estos valores con los obtenidos en la incubación con matraces, se deduce que la fermentación en tanque es más efectiva, ya que bajos pH y altas concentraciones de biomasa son alcanzados en menor tiempo, además la fase de latencia de *A. niger* es más rápida.

La principal diferencia entre los sistemas de incubación estudiados esta en las condiciones de aireación y agitación, donde el cultivo sumergido en matraces se encuentra limitado en oxígeno disuelto, mientras que en tanque de fermentación, las óptimas condiciones de aireación propician el agotamiento del sustrato limitante en menor tiempo, debido al aumento de la velocidad de crecimiento de biomasa, con lo que se obtiene, mayor concentración de ácidos en menos tiempo en comparación con los cultivos en matraces. Este efecto se evidencia en que la velocidad específica de crecimiento máximo en tanque de fermentación es aproximadamente el doble respecto a la alcanzada en matraces, y a su vez, el tiempo de generación es aproximadamente la mitad, es decir:

$$\mu_m (\text{tanque de fermentación}) = 2 * \mu_m (\text{matraces})$$

$$t_g (\text{tanque de fermentación}) = \frac{1}{2} * t_g (\text{matraces})$$

Por otro lado, el estudio del crecimiento de *A. niger* en medio MG se llevo a cabo debido a que se ha demostrado que este medio es óptimo para el crecimiento de diversos géneros fúngicos [22]. Además, es económico y se produce en grandes cantidades anuales, aproximadamente 300000 toneladas/año, ya que este es un subproducto generado luego del procesamiento del maíz para la extracción de aceite comestible, y, por presentarse como partículas sólidas, lo hace viable para su aplicación en procesos de gran escala.



**Grafico 4.7.** Cinética de crecimiento de *A. niger* en medio MG, los cultivos fueron desarrollados en una unidad de fermentación New Brunswick BioFlo C30, según se especifica en 3.2.3.2. El inserto corresponde a la regresión lineal del logaritmo natural de la concentración de biomasa sobre el tiempo, durante la fase exponencial de crecimiento.



En el gráfico 4.7 se observa, que al final del crecimiento la concentración de biomasa fue de 6.545 g/l, mientras que el pH alcanzó aproximadamente un valor de 4.8. La concentración de ácidos en el medio aumentó respecto al tiempo, durante el ciclo de crecimiento.

Además se observa que la fase de latencia solo dura quince horas, para luego dar paso a la fase exponencial del ciclo de crecimiento. Debido a gran presencia de sólidos (biomasa y germen), la fase estacionaria no pudo ser detectada, ya que resultó imposible tomar muestras representativas después del sexto día de crecimiento.

La velocidad específica de crecimiento máximo y la concentración del inóculo, se encuentran expresados en la ecuación de la recta ubicada en el inserto, cuyos valores son:

$$\mu_m = 0.458 \text{ días}^{-1}$$

$$x_0 = 0.611 \text{ g/l}$$

$$t_g = 1.513 \text{ días}$$

Al comparar estos valores con los obtenidos en la incubación con MS en tanque de fermentación, se deduce que la fermentación en medio MG, bajo estas mismas condiciones, es menos efectiva, ya que la velocidad específica de crecimiento máximo es menor y el tiempo de generación es mayor. En cuanto a valores de pH y acidez, estos fueron superiores e inferiores, respectivamente, durante todo el crecimiento, que los valores alcanzados con medio MS.

La mayor eficiencia que presenta el medio MS respecto al medio MG se debe a la disponibilidad y accesibilidad de nutrientes, principalmente la fuente de nitrógeno y de azúcar, siendo ésta última en el medio MS sacarosa y en el medio MG almidón. En el medio MG, el almidón debe ser hidrolizado por amilólisis para obtener la glucosa, la cual es asimilada por el hongo. En el caso de medio MS, sólo se requiere hidrolizar la sacarosa. En cuanto a la accesibilidad, en el medio MS los nutrientes se encuentran en solución,

mientras que en MG éstos se encuentran en forma de partículas sólidas en suspensión, por lo tanto en medio MG la asimilación de los nutrientes es mucho más lenta.

#### 4.2.1. Concentración de ácidos orgánicos producidos por *A. niger*

La concentración de ácidos orgánicos producidos por *A. niger* durante su crecimiento en cultivos sumergidos, descritos en 4.2, se representa en la tabla 4.4:

**Tabla 4.4.** Concentración de ácidos orgánicos producidos por *A. niger*

Incubación / medio de cultivo	Tiempo (días)	Concentración (mM)	
		Ácido cítrico	Ácido oxálico
En matraces / MS	8	1.684	1.666
	8	1.660	1.705
En tanque F / MS	4.5	2.413	0.832
En tanque F / MG	5.5	N.D.	5.418

La determinación de la concentración de los ácidos orgánicos producidos por *A. niger*, se limitó a la cuantificación del ácido cítrico y del ácido oxálico. En la tabla 4.4, se observan la concentración de estos ácidos al final del crecimiento de *A. niger*. Al comparar los sistemas de incubación utilizados con el medio MS, se observa que en tanque de fermentación se alcanza una mayor concentración de ácido cítrico respecto a la incubación en matraces. Esto se debe, a que en tanque de fermentación las condiciones de aireación favorecen a la producción de ácido cítrico, mientras que en matraces la aireación está limitada, por lo cual la concentración de estos ácidos es similar.

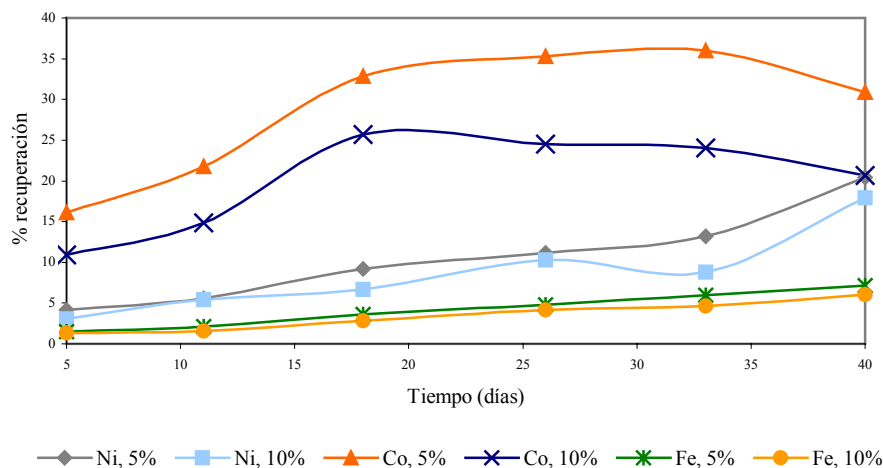
El efecto del medio nutritivo sobre la producción de ácidos, se observa al comparar la incubación en tanque de fermentación con distintos medios (MS y MG). En cultivos sumergidos en medio MS, la producción de ácido cítrico se ve favorecida, ya que, los

nutrientes presentes en este medio, principalmente la fuente de carbono (sacarosa), son fácilmente asimilados por *A. niger*, mientras que en medio MG la producción de ácido cítrico se ve limitada, debido a la poca disponibilidad y accesibilidad de nutrientes presentes en este medio.

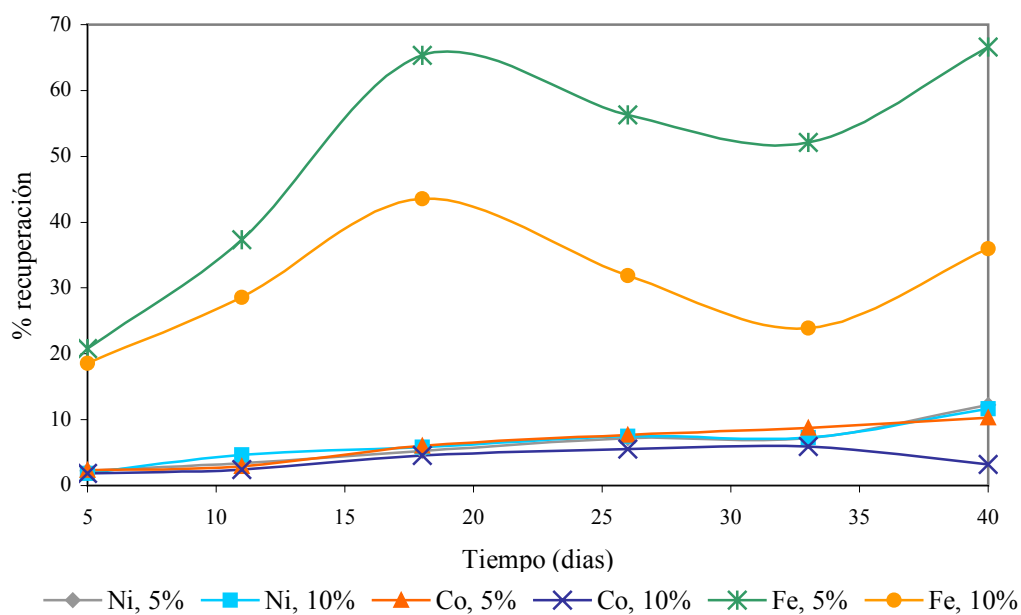
### 4.3. Lixiviación química con ácidos orgánicos comerciales

Para determinar el efecto de los productos intermedios o finales del metabolismo de *A. niger* (ácidos orgánicos), en la extracción de níquel y cobalto, la lixiviación química se llevó a cabo usando ácido cítrico y paralelamente ácido oxálico [12,23]. La concentración, para ambos ácidos fue fijada en 0.5 M, ya que ésta representa el máximo de concentración que se puede encontrar en soluciones de lixiviación biológica o en fluidos fermentados [23]. Este proceso se llevó a cabo a dos densidades de pulpa (5% y 10%) para evaluar el efecto de esta variable en la recuperación de estos metales. Se utilizó un tamaño de partícula cien por ciento pasante de malla 200, debido a que el mineral presenta gran cantidad de finos.

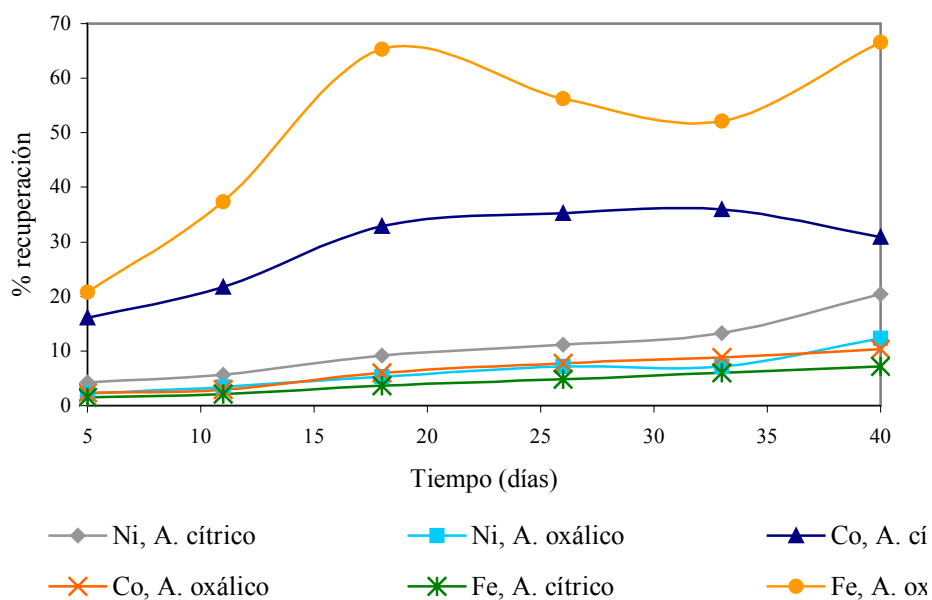
Los valores de recuperación están representados a continuación en las siguientes gráficas:



**Gráfico 4.8.** Cinética de lixiviación química con ácido cítrico 0.5 M, variando la densidad de pulpa (5% y 10%)



**Gráfico 4.9.** Cinética de lixiviación química con ácido oxálico 0.5 M, variando la densidad de pulpa (5% y 10%)



**Gráfico 4.10.** Gráfico comparativo del efecto del ácido cítrico 0.5 M y ácido oxálico 0.5 M sobre la recuperación de los metales, para una densidad de pulpa de 5%.

En los gráficos 4.8 y 4.9, se representa el efecto de la densidad de pulpa sobre la recuperación de los metales, siendo este efecto similar en la extracción de los metales para ambas soluciones lixiviantes. Se observa que, para la densidad de pulpa de 5 % los porcentajes de extracción son superiores respecto a los obtenidos para una densidad de 10%. Estudios previos sobre mineral laterítico, reflejan que un incremento en la densidad de pulpa produce un efecto negativo sobre la disolución de laterita [15,24].

En el gráfico 4.10, se compara el efecto de los ácidos cítrico y oxálico en la disolución de los metales para una densidad de pulpa de 5%. En éste se ve reflejada, en primer lugar, la selectividad del ácido cítrico en la disolución de níquel y cobalto, respecto al hierro, y en segundo lugar, la selectividad del ácido oxálico para la disolución de hierro.

En el estudio realizado por P.G. Tzeferis y col. [23], sobre la lixiviación de níquel y hierro de minerales niquelíferos no sulfurados griegos por ácidos orgánicos, se expresa que los ácidos orgánicos operan a través de dos mecanismos durante la disolución: en primer lugar, los iones  $H^+$  pueden desplazar los cationes de metal de la matriz del mineral, y en segundo lugar, los ácidos orgánicos pueden formar complejos solubles con el metal (quelatos). Estos autores plantearon una reacción equilibrada sobre la formación de quelatos por el ácido cítrico:



donde:

$i = 2,3$

$H_4Cit$  = ácido cítrico

$M$  = especie de metal ( $Ni^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ )

$MH_{4-i}Cit^{2-i}$  = quelato

Además, Calderón [25], en su guía sobre el uso de los quelatos, publicada en la web, expresa que los metales con una valencia igual o superior a +2 forman quelatos en presencia de ligandos.

Según lo planteado por estos autores [23,25], se puede inferir que la disolución de estos metales se debe a la acción de estos dos mecanismos. La menor disolución de níquel y hierro en comparación con el cobalto, usando el ácido cítrico como agente lixivante, se puede deber, según lo descrito por O. Coto [3], a que estos metales se encuentran estrechamente unidos al enrejado cristalino del mineral, por lo que su movilización es muy escasa por estos mecanismos.

Por otro lado, P.G. Tzeferis y col. [23], atribuyen la selectividad del ácido oxálico en la disolución de hierro, al proceso reductivo por el ácido oxálico y la subsiguiente solubilización de  $\text{Fe}^{+2}$ :



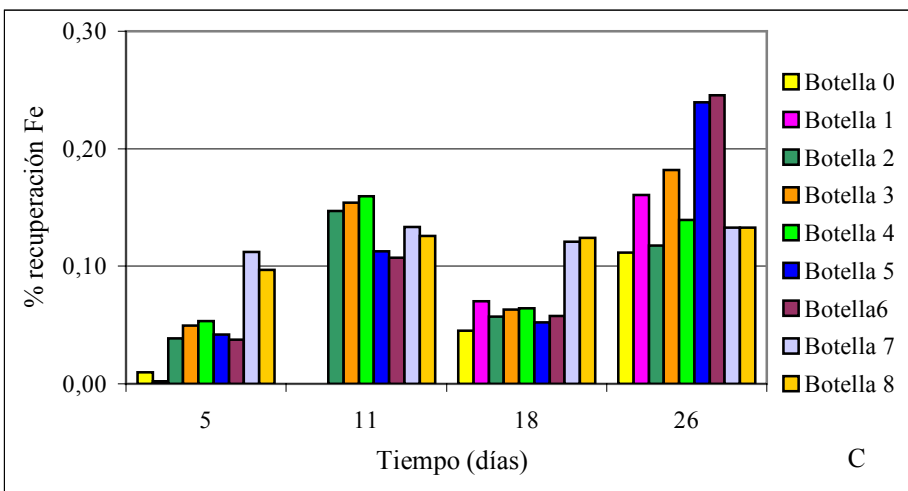
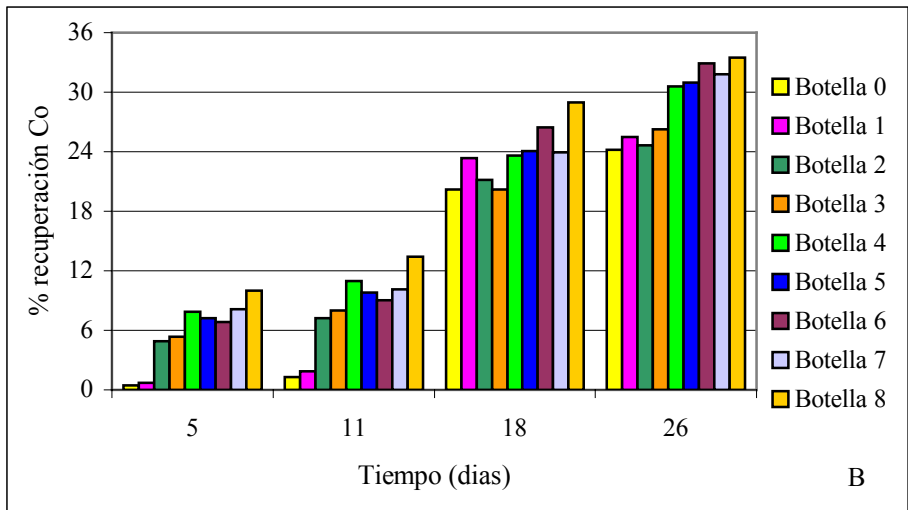
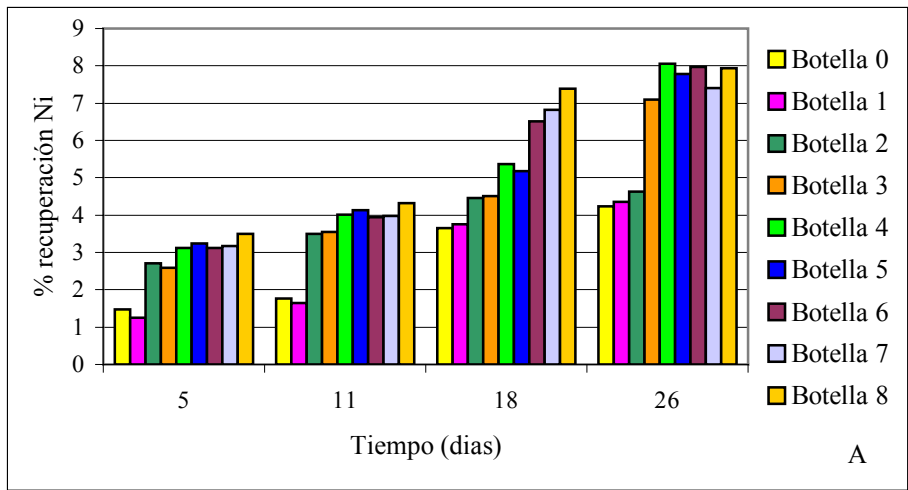
Según lo descrito por I.M. Castro y col [20] y por P.G. Tzeferis y col [23], la baja disolución de níquel y cobalto con ácido oxálico, puede explicarse por la formación de oxalatos de estos metales, los cuales, bajo condiciones de bajo pH (6-3.5) y bajas concentraciones de ácido, son parcialmente solubles.

Tomando en cuenta lo planteado anteriormente, el ácido oxálico puede ser excluido de los procesos de recuperación de níquel, pero puede ser utilizado para procesos de disolución y remoción de hierro.

#### **4.4. Biolixiviación**

##### **4.4.1. Biolixiviación indirecta**

El estudio de la biolixiviación indirecta, se basó en evaluar la utilización de extractos libres de células obtenidos bajo distintas condiciones de incubación y con distintos medios nutritivos.



**Gráfico 4.11.** Cinética de biolixiviación indirecta usando como agente lixiviante el sobrenadante obtenido por día en matraces, según lo descrito en 3.2.3.1.

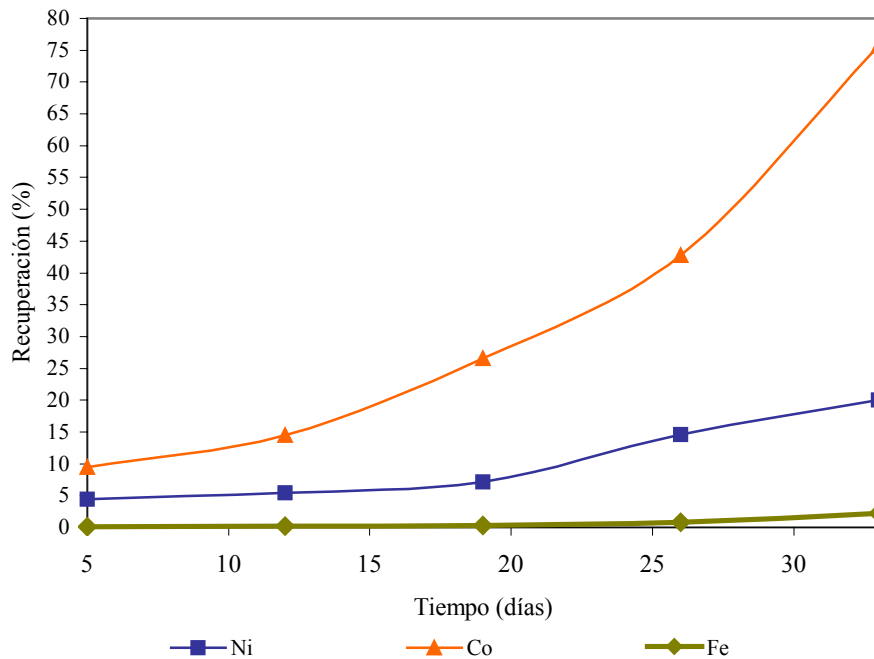
En los gráficos 4.11 A, B y C, se observa que la máxima recuperación se obtuvo a los 26 días de lixiviación con los sobrenadantes obtenidos en los días 7 y 8 de incubación de *A. niger*, ya que la máxima acidez, durante el crecimiento microbiano, se alcanza en estos dos días (graf. 4.4a, b). Por lo tanto es necesario, para la biolixiviación indirecta, que el crecimiento de *A. niger* se realice por un mínimo de siete días de incubación, ya que de esta manera se obtiene un sobrenadante rico en ácidos orgánicos.

Por otro lado, se observa una marcada selectividad del proceso indirecto en la recuperación de níquel y cobalto en relación al hierro, siendo ésta mayor para el cobalto. Además, en estos gráficos se observa que la disolución de níquel y hierro sigue estando limitada. Este comportamiento es similar al presentado en la lixiviación química con ácido cítrico comercial, sin embargo, el sobrenadante obtenido en matraces, usado como agente lixivante, presentó concentraciones similares de ácido cítrico y oxálico, por lo tanto, la disolución de los metales es producto de la acción combinada de estos ácidos.

El porcentaje de extracción debe presentar un comportamiento ascendente, en relación a la acidez obtenida por día de incubación, es decir, que para cualquier tiempo de lixiviación, a mayor acidez se debe alcanzar una mayor recuperación. Por ejemplo, con el sobrenadante obtenido al sexto día del crecimiento microbiano (botella 6), se debe lograr una menor recuperación, que con el sobrenadante obtenido al séptimo día de incubación (botella 7). Este comportamiento no fue observado en todos los matraces (graf. 4.11), debido a que cada sobrenadante fue obtenido de una fiola distinta, por lo que el sistema de incubación se hace más susceptible a las condiciones de manejo.

Para eliminar esta heterogeneidad, se procedió a realizar la biolixiviación indirecta con sobrenadante obtenido en un tanque de fermentación con MS, como se describe en 3.2.3.2. Los resultados obtenidos se representan a continuación:





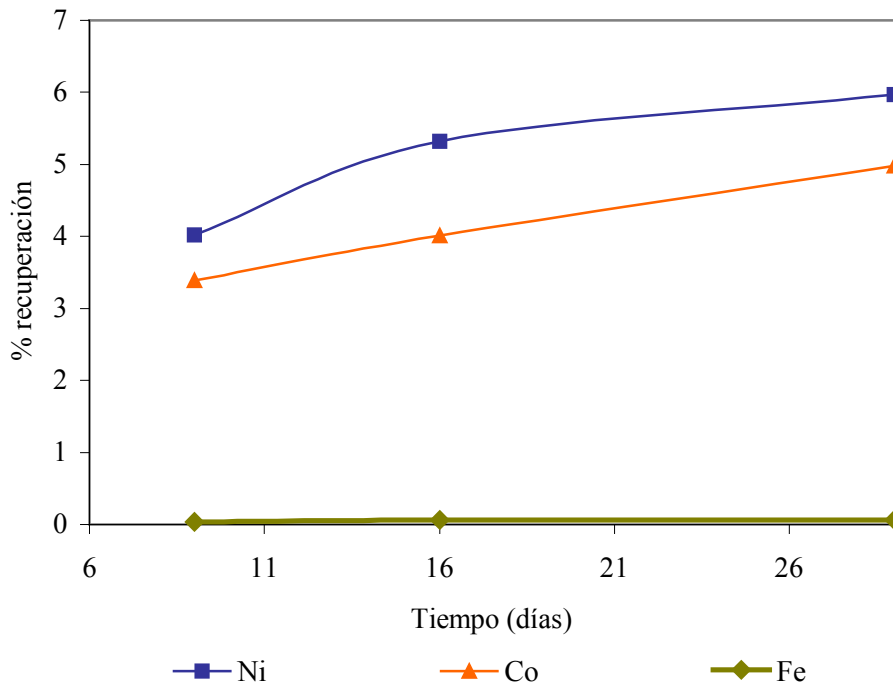
**Gráfico 4.12.** Cinética de biolixiviación indirecta usando como agente lixivante el sobrenadante obtenido en tanque de fermentación según lo descrito en 3.2.3.2, en medio MS.

En el gráfico 4.12 se observa, una gran selectividad en la recuperación de níquel y cobalto respecto al hierro, similar al comportamiento representado en el gráfico 4.11.

Comparando los valores de extracción de los metales, representados en los gráficos 4.11 y 4.12, se tiene que para 26 días de lixiviación, el sobrenadante obtenido por tanque de fermentación, es un agente lixivante más efectivo respecto al obtenido por fiolas. Esto se debe a que las condiciones de incubación en tanque de fermentación son superiores en cuanto a la aireación y agitación, de acuerdo a lo discutido en 4.2, lo cual trae como consecuencia una mayor producción de ácidos cítrico (tabla 4.4).

También se puede apreciar, que luego de 26 días de lixiviación se produce un aumento en la recuperación, siendo éste más significativo en el caso del cobalto, que aumenta de 43% a 76% a los 33 días de lixiviación. Sin embargo, no se puede asegurar que los valores alcanzados a los 33 días sean los máximos, ya que no se observó una estabilización en la recuperación de estos metales.

Con la finalidad de seguir estudiando el efecto del medio MG sobre el crecimiento de *A. niger*, y de esta manera sobre la biolixiviación, se procedió a realizar el método indirecto utilizando el sobrenadante obtenido en un tanque de fermentación con MG, como se describe en 3.2.3.2. Los valores alcanzados se representan en la siguiente gráfica:



**Gráfico 4.13.** Cinética de biolixiviación indirecta usando como agente lixivante el sobrenadante obtenido en tanque de fermentación según lo descrito en 3.2.3.2, en medio MG.

Los valores representados en el gráfico 4.13, son muy inferiores a los obtenidos con sobrenadante generado en tanque de fermentación en medio MS, bajo las mismas condiciones (graf. 4.12). Esto es consecuencia de la inferior acidez alcanzada en medio MG durante la incubación (graf. 4.7). Además, en este medio la producción de ácido cítrico se ve limitada, mientras que se evidenció la presencia de ácido oxálico en el sobrenadante (tabla 4.4), el cual es el responsable de la disolución de los metales.

Para completar el estudio del efecto del medio MG en la disolución de estos metales, éste será evaluado posteriormente en el proceso directo.

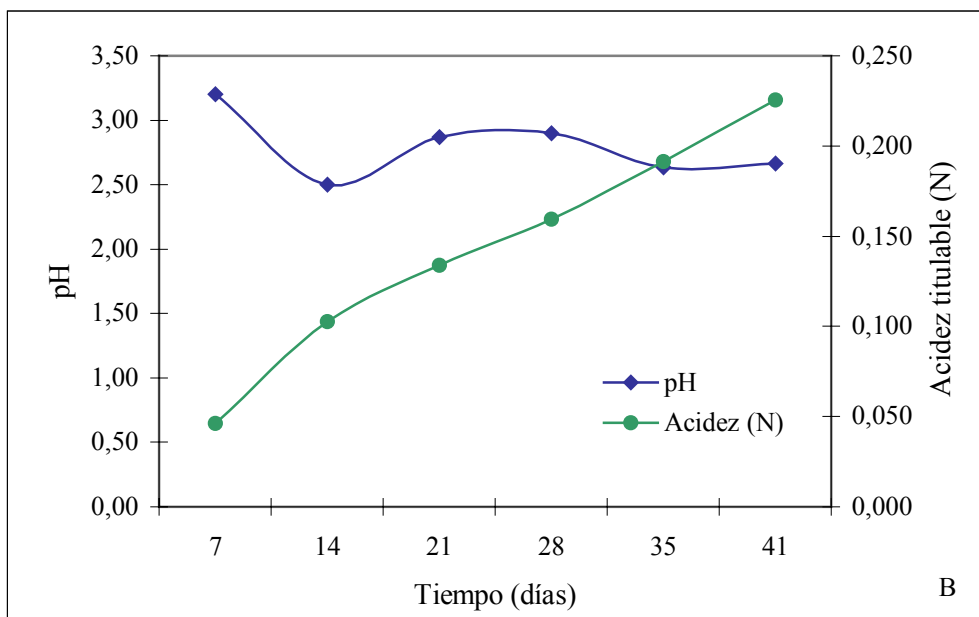
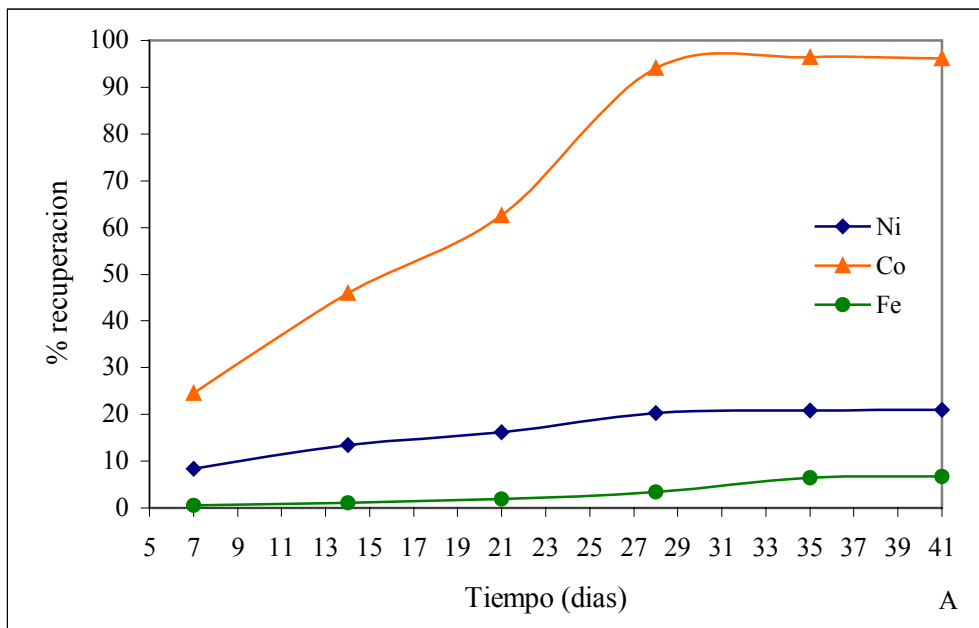
## **4.4.2. Biolixiviación directa**

### **4.4.2.1. Directa en cultivo sumergido**

El proceso directo se realizó con la finalidad de estudiar el crecimiento de *A. niger* en presencia de mineral, así como también la producción de ácidos, y de esta manera poder evaluar la efectividad de este proceso en la recuperación de los metales. Para determinar el efecto del medio nutritivo sobre la disolución de los metales de interés, se procedió a realizar la biolixiviación directa con medio MS y medio MG, como se describe en 3.4.1.1. A la vez, se midió la variación del pH y la acidez del medio durante el período de lixiviación.

La concentración de biomasa durante la biolixiviación no pudo ser estimada por el método de extracción y determinación de proteínas de sustrato sólido fermentado, debido a la gran interferencia del mineral en las medidas realizadas. Las medidas realizadas, tanto a las muestras como a los estándares, en presencia de mineral, no presentaron un comportamiento que permitiera el cálculo de un factor de corrección, lo que imposibilita la utilización de este método para la estimación de la biomasa durante el método directo.

Los valores de recuperación de los metales, la variación de pH y acidez del medio durante la biolixiviación directa en medio MS, se representan en el siguiente gráfico:



**Gráfico 4.14.** Biolixiviación directa con *A. niger*: utilizando medio de cultivo MS: (A) Cinética de biolixiviación. (B) Variación del pH y acidez del medio.

En el gráfico 4.14.A, se evidencia la alta selectividad de este proceso en la recuperación de cobalto respecto al hierro. En el caso del níquel también es selectivo pero en menor grado. Este comportamiento fue observado en todos los procesos de lixiviación anteriormente estudiados en este trabajo.

El máximo de recuperación fue alcanzado a los 28 días de lixiviación, obteniéndose un 20% Ni y un 95% Co. En días posteriores la disolución de estos metales se estabiliza, es decir, el tiempo óptimo de lixiviación es de 28 días.

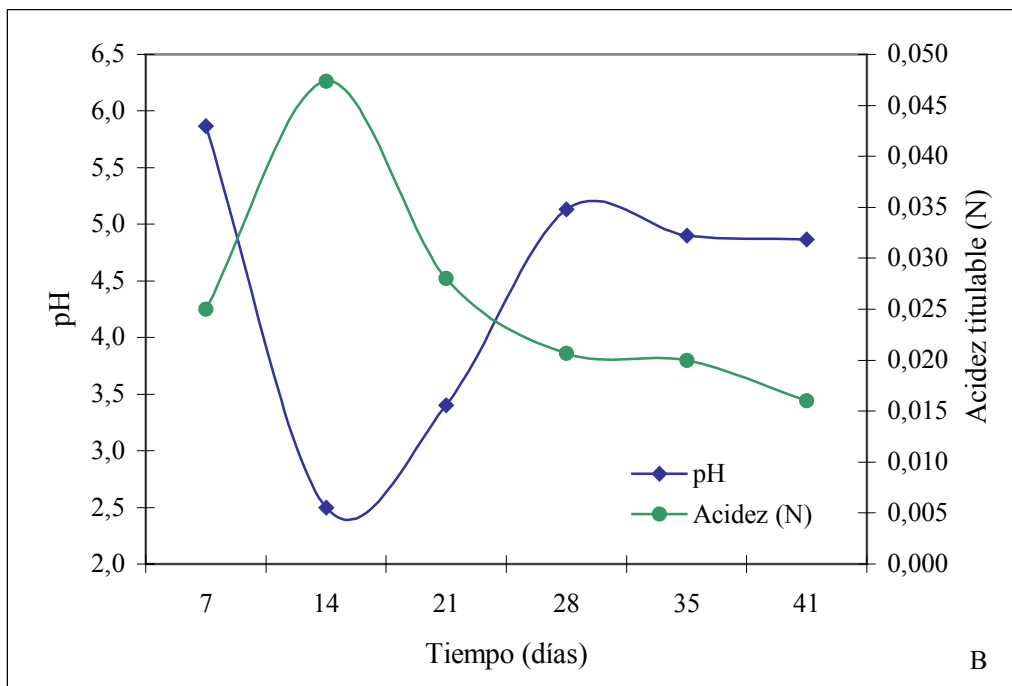
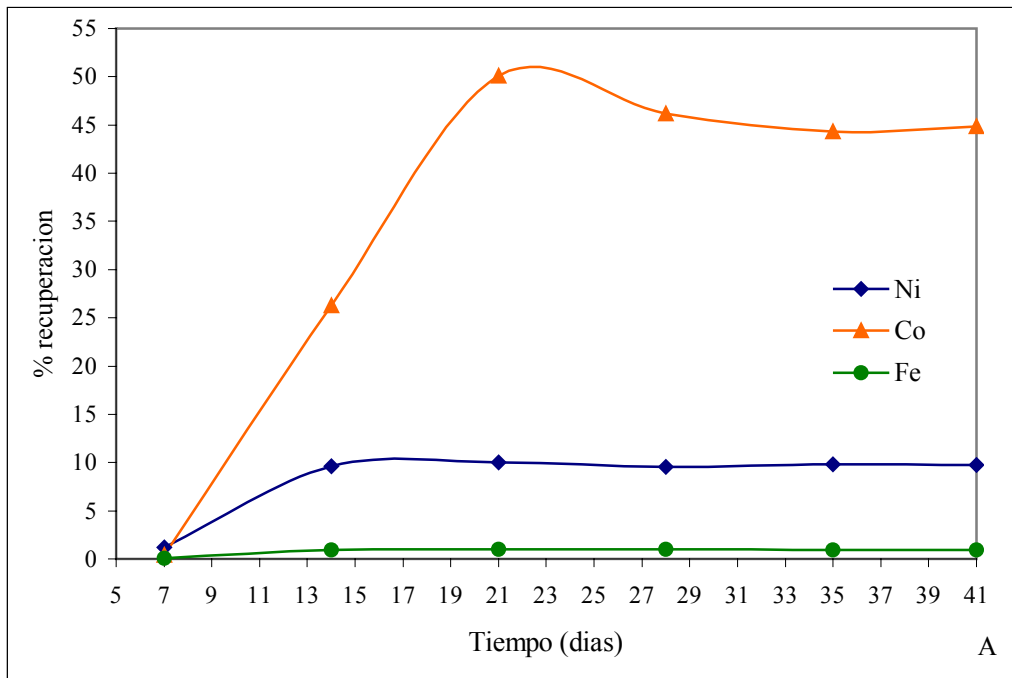
La disolución de níquel sigue estando limitada por la baja solubilidad de las fases en que se encuentra en el mineral, de acuerdo a lo discutido en 4.3.

En el gráfico 4.14.B se observa, que la acidez de la solución aumenta con el tiempo durante la biolixiviación, mientras que el pH varió muy poco durante este tiempo. La estabilización del pH, a un valor aproximado de 2.5, se puede deber, a que el consumo de  $H^+$  durante la disolución es similar a la producción de éstos durante la formación de quelatos (ecuación (23)). De esta manera se puede intuir que los dos mecanismos bajo los cuales operan los productos microbiales (ácidos orgánicos), son responsables en igual proporción de la disolución de estos metales.

También se puede notar, que a pesar, que la cinética de lixiviación se estabiliza en el día 28, la acidez sigue aumentando (graf. 4.14), lo que quiere decir, que la producción de ácidos por *A. niger* es mayor que el consumo de estos.

Al comparar el proceso directo con el proceso indirecto utilizando medio MS, se observa que la biolixiviación directa es más efectiva en la disolución de los metales, demostrándose la no-toxicidad del mineral sobre el crecimiento de *A.niger*. La mayor recuperación alcanzada con el método directo se debe a la constante producción ácidos por *A. niger* durante el período de lixiviación.

Por otro lado, los valores obtenidos en el estudio de la biolixiviación directa en medio MG se visualizan en el siguiente gráfico:



**Gráfico 4.15.** Biolixiviación directa con *A. niger*: utilizando medio de cultivo MG: (A) Cinética de biolixiviación. (B) Variación del pH y acidez del medio.

La recuperación obtenida con el medio MG (graf. 4.15.A), sigue el mismo comportamiento en cuanto a la selectividad, que la obtenida para el medio MS (graf.

4.14.A). La recuperación máxima obtenida con este medio (MG), fue de 10% de níquel y 50% de cobalto, a los 21 días de lixiviación. Estos valores son aproximadamente  $\frac{1}{2}$  de los máximos alcanzados con medio MS, esto indica que la producción de ácidos por *A. niger* es menos efectiva en MG, debido a las limitaciones que presenta en la disponibilidad y accesibilidad de nutrientes.

En líneas generales, en el gráfico 4.15.B se observa, que la acidez y pH de la solución estuvieron por debajo y por encima, respectivamente, a los obtenidos en medio MS (graf. 4.14.B). Este comportamiento en la acidez sustenta lo explicado anteriormente sobre la efectividad de este medio. Además, la poca variación de la acidez y del pH, luego de 28 días, evidencia la disminución de la producción de ácidos por *A. niger*.

Por otro lado, la mayor variación de la acidez y el pH ocurrió entre los días 7 y 21, lo cual coincide con la etapa de mayor cinética de lixiviación. En este período de tiempo se evidencia la acción de los mecanismos de los productos metabólicos para la disolución de estos metales.

Al comparar el proceso directo con el proceso indirecto utilizando medio MG, se observa que la biolixiviación directa es más efectiva en la disolución de los metales. Este medio no puede ser descartado para ser utilizado en la biolixiviación directa, debido a que los valores de recuperación alcanzados no son despreciables, además, este es un medio económico, por lo tanto se deben realizar estudios posteriores para su optimización.

#### 4.4.2.1.1. Concentración de ácidos orgánicos producidos por *A. niger* en presencia de mineral

**Tabla 4.5.** Concentración de ácidos orgánicos durante la biolixiviación directa:

Medio de cultivo	Tiempo (días)	Concentración (mM)	
		Ácido cítrico	Ácido oxálico
MS	28	22.452	21.456
	41	38.046	25.010
Control MS	41	23.507	23.503
MG	21	N.D.	11.565
	41	0.381	11.597
Control MG	41	0.238	7.694

La determinación de la concentración de los ácidos orgánicos durante la biolixiviación directa, se limitó a la cuantificación del ácido cítrico y del ácido oxálico, en el día donde se alcanzó la mayor recuperación y al final del proceso. Además, se determinó la concentración de estos ácidos a controles constituidos por cultivos de *A. niger* en ausencia de mineral, para ambos medios, con la finalidad de evaluar la toxicidad del mineral sobre la producción de ácidos por *A. niger*.

En la tabla 4.5, se observa que el mineral no inhibe la producción de ácidos orgánicos por *A. niger*, ya que, la concentración de estos ácidos en los controles fue similar a la alcanzada el último día del proceso. En la biolixiviación en medio MS se observó un aumento en la concentración de ácido cítrico, una vez alcanzada la estabilización de la disolución de los metales, lo cual evidencia, que existe una constante producción de este ácido por *A. niger*. Además, la menor concentración de ácido cítrico alcanzada en el día de máxima recuperación evidencia el consumo de este ácido para la disolución.



Por otro lado, la concentración de ácido oxálico durante este proceso fue similar, lo que evidencia que este se consume en menor grado, en comparación con el ácido cítrico, para la disolución de los metales.

En la biolixiviación en medio MG, se observa que la producción de ácido cítrico es inferior al consumo de este para la disolución, ya que, en el día de máxima recuperación no se detecta la presencia de este ácido, sin embargo, una vez alcanzada la estabilización en la disolución, se observa un aumento en la concentración del mismo. La concentración de ácido oxálico durante este proceso fue similar, lo que evidencia que este se consume en menor grado, en comparación con el ácido cítrico, para la disolución de los metales.

De acuerdo con lo descrito anteriormente, se tiene que el medio MS favorece la producción de ácido cítrico por *A. niger* durante la biolixiviación, lo cual trae como consecuencia un mayor porcentaje de recuperación de los metales, respecto al medio MG, en el cual, debido a la baja disponibilidad y accesibilidad de nutrientes, se ve limitada la producción de ácido cítrico.

#### 4.5. Coeficientes de selectividad

Con la finalidad de realizar un análisis cuantitativo de la selectividad de la biolixiviación indirecta y directa, se determinaron los índices de selectividad de níquel y cobalto respecto al hierro, en el tiempo de mayor recuperación.

**Tabla 4.6.** Coeficientes de recuperación de Ni/Fe ( $\alpha_1$ ) y Co/Fe ( $\alpha_2$ ) para el tiempo de mayor recuperación.

Método de biolixiviación	$\alpha_1$	$\alpha_2$	% recuperación máxima		
			Ni	Co	Fe
IMST	9.2	34.6	20.021	75.692	2.188
IMGT	97.9	81.7	5.969	4.981	0.061
DMS	5.9	27.7	20.245	94.983	3.431
DMG	9.9	49.8	9.991	50.084	1.005

Donde,

IMST = Biolixiviación indirecta usando como solución lixivante el sobrenadante obtenido Cultivos Sumergidos en Tanque de Fermentación con medio MS.

IMGT = Biolixiviación indirecta usando como solución lixivante el sobrenadante obtenido Cultivos Sumergidos en Tanque de Fermentación con medio MG.

DMS = Biolixiviación directa en medio en medio MS.

DMG = Biolixiviación directa en medio en medio MG.

En la tabla 4.6, se puede notar que la biolixiviación con *A. niger* es un proceso selectivo, lo cual es ideal en los procesos de lixiviación. De manera puntual, se puede observar que el proceso de biolixiviación indirecta es más selectivo que el proceso directo, además para ambos procesos se detecta la influencia del medio nutritivo, ya que con medio MG se obtiene una mayor selectividad.

En base a los coeficientes de selectividad y a los valores de recuperación obtenidos, se tiene que los procesos más efectivos para la extracción de estos metales son: IMST, DMS y DMG. A pesar, de que los coeficientes de selectividad para el proceso IMGT fueron los mayores, al observar los bajos valores de recuperación obtenidos (6% Ni, 5% Co y 0.06% Fe, en 29 días), se puede decir que este método bajo las condiciones estudiadas no es recomendable para la extracción de estos metales.

De los métodos directos se puede decir que, en medio MS se obtienen mayores porcentajes de recuperación (20% Ni, 95% Co y 3.4% Fe, en 28 días) respecto al medio MG (10% Ni, 50% Co y 1% Fe, en 21 días), sin embargo, el proceso con medio MG es más selectivo.

Debido a que el medio MG es más económico y sencillo de obtener, en comparación con el medio MS, éste sería ideal para procesos de biolixiviación a mayor escala, por lo tanto es recomendable realizar estudios para la optimización del mismo, con

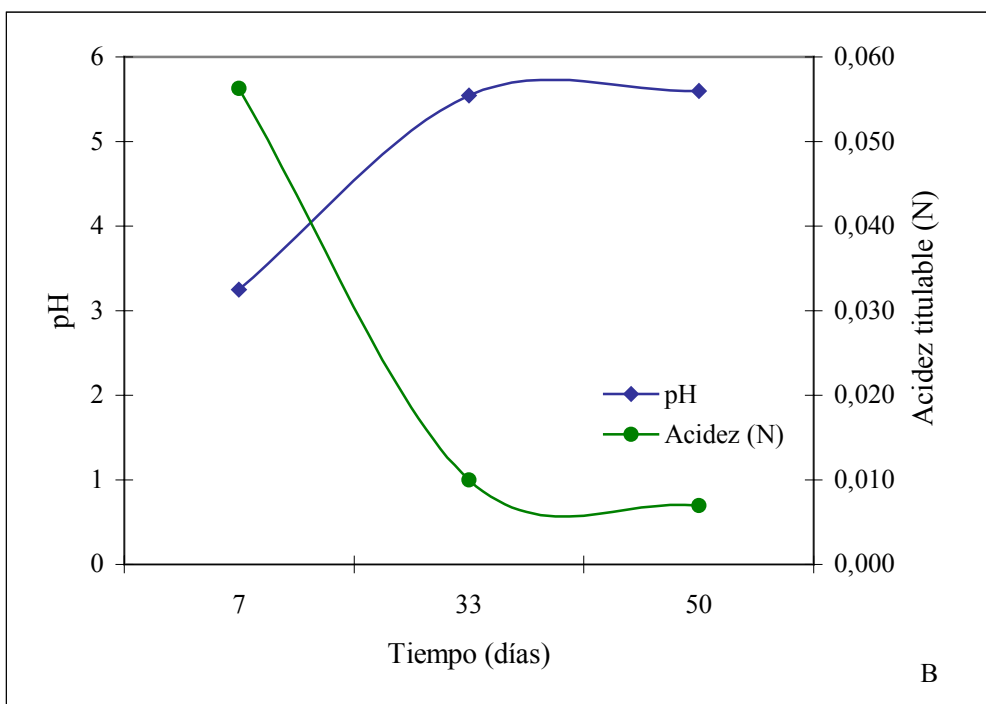
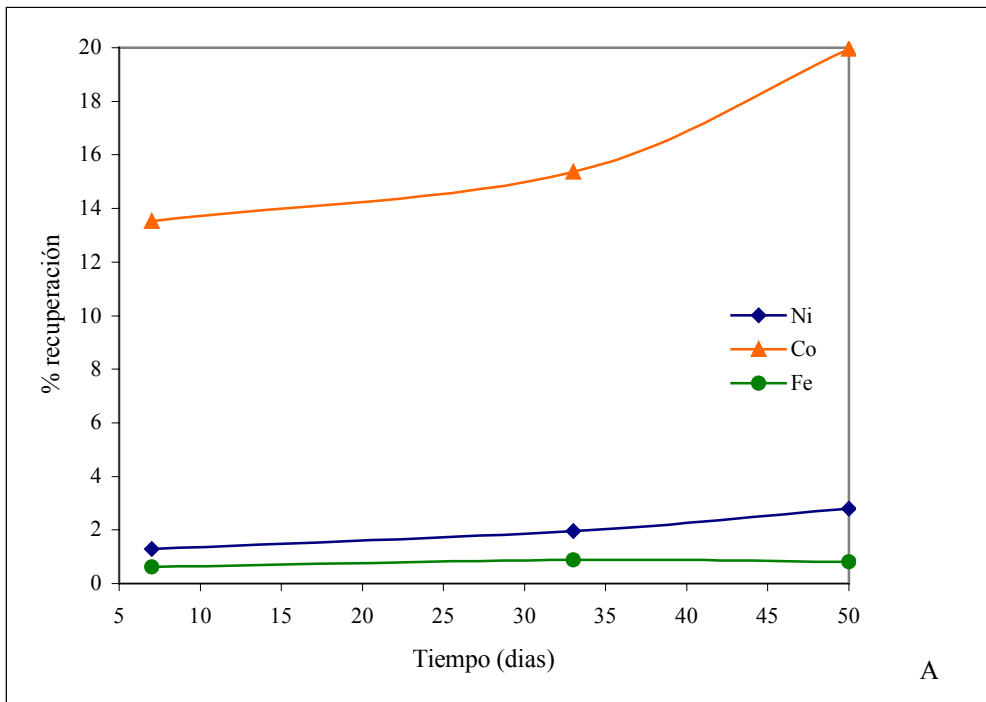
la finalidad de alcanzar valores de recuperación, similares o mayores, que los logrados en el proceso DMS.

Al comparar los valores de la tabla 4.6, con los valores obtenidos por Betancourt E. y Vivas R. [19], se tiene que la mayor recuperación de níquel que obtuvieron fue de 50% con una selectividad de 17.21, bajo las siguientes condiciones: relación ácido/mineral = 0.2, temperatura de tostación = 750 °C. Con una relación ácido/mineral de 0.05 y una temperatura de tostación = 600 °C obtuvieron la máxima recuperación de cobalto, la cual fue de 65% con una selectividad de 9.48, mientras que la máxima recuperación con la biolixiviación, fue alcanzada con el método directo en medio MS, obteniéndose un 20% de níquel con una selectividad de 5.9 y un 96% de cobalto con una selectividad de 27.7. Al observar estos valores, se tiene que la biolixiviación directa es un proceso más selectivo para el caso de cobalto, sin embargo, la cinética de lixiviación es más lenta, en comparación con la lixiviación ácida en columnas. En relación al níquel, se logra una menor selectividad con la biolixiviación directa, sin embargo, se pueden obtener mayores recuperaciones aplicando un pretratamiento al mineral.

## **4.6. Ensayo exploratorio**

### **4.6.1. Biolixiviación directa en fermentación sólida**

Se realizaron ensayos exploratorios de biolixiviación directa en fermentación sólida, como se describe en 3.5.1., para evaluar la efectividad de cultivos de *A. niger* con medio nutritivo MGC en la extracción de los metales de interés, ya que este, es un medio económico y de fácil aplicación en procesos de mayor escala. Medidas de la variación del pH y la acidez del medio fueron tomadas durante el período de lixiviación. Los valores obtenidos se representan en los siguientes gráficos:



**Gráfico 4.16.** Biolixiviación directa con *A. niger*: utilizando medio de cultivo MGC: (A) Cinética de biolixiviación. (B) Variación del pH y acidez del medio.

La recuperación obtenida con el medio MGC (graf. 4.16.A), es menor a la alcanzada por el proceso directo en cultivos sumergidos. Esto se debe principalmente a la mayor limitación en cuanto a la disponibilidad y accesibilidad de nutrientes que presenta la fermentación sólida en comparación con los cultivos sumergidos. Además, la aireación en fermentación sólida se ve limitada, lo que trae como consecuencia que el metabolismo del hongo se redirija hacia la producción de biomasa, y está bien establecido que para favorecer la síntesis de ácido cítrico, el crecimiento del hongo debe estar restringido[11]. Otro factor que pudiese estar influyendo en la efectividad de la disolución, es que la cinética de la lixiviación estática es más lenta que la de la lixiviación agitada.

En el gráfico 4.16.B, se observa un drástico descenso de la acidez a partir del séptimo día, es decir, que el consumo de ácido para la disolución supera la producción del mismo por *A. niger*, lo cual a su vez, afecta la cinética de lixiviación.

## 5. CONCLUSIONES

1. El cobalto presente en la laterita es altamente susceptible a la biolixiviación con cultivos de *A. niger*, mientras que el níquel presente en el mineral es poco susceptible.
2. La biolixiviación con *A. niger*, directa e indirecta, es un proceso altamente selectivo en la extracción de níquel y cobalto en relación al hierro, obteniendo mayor recuperación con el proceso directo.
3. Con la biolixiviación directa en medio MS se obtuvo el máximo de recuperación, siendo estos valores 20% Ni y 96% Co a los 28 días del proceso.
4. En los procesos de biolixiviación estudiados, el principal responsable de la disolución de los metales es el ácido cítrico.
5. En la lixiviación química, el ácido cítrico fue el más efectivo de los ácidos orgánicos en la extracción de níquel y cobalto.
6. Un incremento en la densidad de pulpa produce un efecto negativo en la disolución del mineral laterítico.
7. El medio nutritivo MS es el más eficiente para el crecimiento de *A. niger* y para la producción de ácido cítrico.
8. *A. niger* requiere de un tiempo de incubación mínimo de siete días en matraces con medio MS, para alcanzar las mínimas condiciones de concentración de ácidos orgánicos, requerida para la biolixiviación indirecta.
9. La disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo es un factor limitante del crecimiento microbiano, y por ende, de la producción de ácidos orgánicos.

10. La incubación de *A. niger* en tanque de fermentación proporciona las condiciones más favorables para su crecimiento y producción de ácido cítrico.
  
11. La biolixiviación en fermentación sólida, bajo las condiciones estudiadas, fue la menos efectiva en la recuperación los metales de interés.

## 6. RECOMENDACIONES

1. Es necesario realizar una caracterización más profunda del mineral, mediante microscopía electrónica, con la finalidad de determinar todas las fases presentes y los cambios químicos durante los procesos.
2. Es recomendable el pretratamiento del mineral con la finalidad de aumentar la susceptibilidad del níquel a la biolixiviación.
3. Es necesario realizar un estudio de lixiviación química con una combinación de ácido cítrico y oxálico, así como también una combinación de éstos con ácido sulfúrico.
4. Para optimizar la biolixiviación indirecta se recomienda realizar este proceso variando la temperatura.
5. La biolixiviación directa con medio MG debe ser optimizada, ya que este medio presenta características apropiadas para ser utilizado en procesos a gran escala.
6. Es necesaria la búsqueda de métodos que permitan estimar el crecimiento de *A. niger* en el proceso de biolixiviación directa.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. AMERICAN SOCIETY, ASM HANDBOOK, Properties Selection: Nonferrous Alloys and Special-Purpose Materials. Volumen 2. 1990, p. 428.
2. <http://www.prodigyweb.net.mx/degcorp/Quimica/Niquel.htm>. Consultado: 15-09-03.
3. Coto Orquídea, Blas Dorta. Perspectivas y Desafíos de la Biotecnología en la Industria Minera-Metalúrgica. Universidad Central de Venezuela. 2002.
4. AME MINERAL ECONOMICS. Nickel. May 2001.
5. [http://www.adi.uam.es/docencia/elementos/spv\\_21\\_sinmarcos/elementos/co.html](http://www.adi.uam.es/docencia/elementos/spv_21_sinmarcos/elementos/co.html). Consultado: 15-09-03.
6. Szhygiel Z; Torres A. *Metalurgia no ferrosa*. Editorial Limusa, 1984 p. 210.
7. Wright J.K. The segregation process. Min. SCI. Engng. Vol. 5. N° 2. 1973.
8. Opratko V. Bell J.E. Acid leaching of lateritic ore. Canadian patent 922903, (1970).
9. Canon M.H. *Fundamentals and practical factors in ammonia. Leaching of nickel and cobalts ores*. JMetls, New York. Vol. 2. 1950, p.67.
10. Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker, *Biología de los Microorganismos*. España. Prentice hall, 8ª ed. 1998 p 2-16, 135-137, 150-158, 488-501, 774-776.
11. Maria M. Tremarias S. Producción de Acido Cítrico por *A. niger* a partir de Jugo de Nepe, (1997). Trabajo Especial de Grado no publicado. Universidad Simón Bolívar, Caracas.
12. J. E. Pedraza, M. Parra, Recuperación del Níquel Laterítico por Lixiviación Bacterial, Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 5, N° 2, 1985.
13. J. A. Muñoz, F. González, M.L. Blazquez, A. Ballester, A study of the bioleaching of a Spanish uranium ore. Part I, II, III, Hydrometallurgy, 38, 1995.
14. I. Tarasova and N. Khavski, Biohydrometallurgical Technologies, (1993), 357.

15. O. Coto, N. Bruguera, L. Abin, J. Gamboa, Y. Gomez, Bioleaching of Cuban nickeliferous serpentinite, Part I, *Biohidrometallurgy*, 2001.
16. L.B. Sukla, K.M. Swamy, K.L. Narayana, R.N. Kar, V.V. Panchanadikar, Bioleaching of Sukinda laterite using ultrasonics, *Hydrometallurgy*, 37, 1995.
17. K. Bosecker, FEEM Microbial review. Elsevier, 20 (1997), 591.
18. De La Cuadra, Antonio. *Nueva Tendencia en los Proceso de Obtención de Metales*. Guayaquil. 1995. p. 79-94.
19. E. Betancourt, R. Vivas, Estudio de la Extracción de Ni y Co en Lateritas por medio de Lixiviación Ácida en Columnas, (2003), Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela. Caracas.
20. I.M. Castro, J.L.R. Fietto, R.X. Vieira, M.J.M. Tropa, L.M.M. Campos, E.B. Paniago, R.LL Brandao, Bioleaching of zinc and nickel from silicates using *Aspergillus niger* cultures, *Hydrometallurgy*, 57, 39-49, 2000.
21. B. Dorta, Fermentación en Estado Sólido de Subproductos de la Industria Arrocería, para el Crecimiento y Espuralación del Hongo Entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, (1991), Trabajo de Tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
22. D. Pavone, Fermentación en Estado Sólido de Subproductos Agroindustriales para el Crecimiento y Espuralación del Hongo Entomopatógeno *Verticillium lecanii*, (1998), Trabajo especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
23. P.G. Tzeferis, S. Agatzini-Leonardou, leaching of nickel and iron from greek non-sulphide nickeliferous ores by organics acids, *hydrometallurgy*, 36, 345-360, 1994.
24. L.B. Sukla, V.V. Panchanadikar, Bioleaching of lateritic nickel ore using a heterotrophic micro-organism *Hydrometallurgy*, 32, 373-379, 1993.
25. Calderon, Todo sobre los quelatos, disponible: <http://www.informed.sld.cu/revistas/h.h/vol16-3-09/nih9300.htm>. Consultado: 04-10-03.

## GLOSARIO

**Aerobio:** Organismo que crece en presencia de oxígeno, el cual lo utiliza en la respiración.

**Almidón:** Polisacárido formado por restos de glucosa unidos por un enlace  $\alpha$ -glucosídico entre los carbonos 1 y 4; su sillar estructural es la maltosa. Está formado por dos componentes: la amilosa, soluble en agua, y la amilopectina, insoluble, la primera esta formada por cadenas lineales de restos de glucosa.

**Anaerobio:** Organismo que se desarrolla en ausencia de oxígeno y cuyo crecimiento puede ser inhibido por el oxígeno.

**Archaea:** Un grupo de procariotas filogenéticamente relacionados y distinto del grupo bacteria

**Autótrofos:** Un organismo capaz de biosintetizar todo el material celular a partir del CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono.

**Bacteria:** Grupo de procariotas relacionadas filogenéticamente (dominio bacteria), diferentes al dominio Archaea.

**Biomasa:** Nombre aplicado a la masa de todos los seres vivos (cantidad total de materia viva) presente en una extensión determinada de corteza terrestre, masa acuosa, sistema cerrado, etc.

**Enzimas:** Catalizadoras proteicas que funcionan acelerando las funciones las reacciones químicas.

**Espora:** Término general utilizado para designar estructuras resistentes de reposo que forman numerosos procariotas y hongos.

**Eucariota:** Una célula que posee núcleo encerrado en una membrana nuclear, y normalmente otros orgánulos.

**Eukaraya:** Todos los organismos eucarióticos.

**Gram negativa:** Un tipo de célula procariota cuya pared contiene relativamente poca cantidad de peptidoglicano, pero contiene una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y otras macro moléculas complejas.

**Gram positiva:** Un tipo de célula procariota cuya pared está compuesta básicamente por peptidoglicano y carece de membrana externa.

**Heterótrofos:** Un organismo que requiere compuestos orgánicos como fuente de carbono.

**Lisis:** Ruptura de una célula que produce la pérdida del contenido citoplasmático.

**Micelio:** Cuerpo vegetativo de los hongos formado por hifas entrelazadas.

**Microorganismo:** Organismo microscópico consistente en una célula o grupos de células. Por razones prácticas este término incluye también los virus, que no son seres celulares.

**Polisacáridos:** Polímeros de unidades de azúcar unidas por enlaces covalentes.

**Procariota:** Célula u organismo que carece de núcleo y otros orgánulos rodeados por membranas, generalmente con su DNA en una única molécula circular.

**Quitina:** Polisacarido de sostén, de molécula lineal, compuesta por muchas unidades de acetilglucosamina. Se encuentra en algunos hongos y especialmente en los artrópodos.

**Quimiolitotrofo:** Microorganismo capaz de oxidar compuestos inorgánicos como fuente de energía.

**Quimioorganotrofo:** Un organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos orgánicos.

**Quelatos:** Tipo de compuesto de coordinación en el cual un átomo central, generalmente un metal, se une por enlaces covalentes a uno o más átomos distintos de 1 o más molécula o iones distintos, de modo que se forman anillos heterocíclicos con el metal como parte de cada anillo.

# **ANEXOS A**

### **A.1. Extracción y determinación de proteínas de sustrato sólido fermentado**

Se hace una extracción con SDS al 2% a 100 °C durante 5 minutos. Luego se centrifuga a 12000 g por 5 minutos. Por último, se mide la densidad óptica en un espectrofotómetro a dos longitudes de onda (228.5 nm y 234.5 nm), y el contenido de proteínas del sobrenadante se determina mediante la fórmula de Ehresmann y colaboradores, la cual se expresa a continuación:

$$\text{Prot. (mg/ml)} = (\text{DO}_{228.5} + \text{DO}_{234.5}) * C$$

El coeficiente C se determina usando una solución de albúmina sérica bovina 0.01 mg/ml en SDS al 2%. Estándares de albúmina a distintas concentraciones, son utilizados para determinar la curva de calibración. El valor promedio de C es de alrededor de 0.35 mg/ml.

Esta determinación se realiza para una cantidad conocida de micelio puro, con la finalidad de determinar el porcentaje de proteínas que contiene.

La posible interferencia del mineral en la determinación de proteínas, se determina preparando una muestra del método directo con una cantidad conocida de uno de los estándares de albúmina preparados, a la cual se le determina la cantidad de proteínas. Si al restar la concentración de proteínas de la muestra con la concentración del estándar agregado es igual a la concentración de este estándar medido por la curva de calibración, no hay interferencia. Si esto no ocurre, existe interferencia, por lo que se debe calcular un factor de corrección:

$$F = [\text{Prot.}]_{\text{Ei(medido)}} / [\text{Prot.}]_{\text{Estándar (agregado)}}$$

donde,

$$[\text{Prot.}]_{\text{Ei(medido)}} = [\text{Prot.}]_{\text{Muestra+Estándar}} - [\text{Prot.}]_{\text{Estándar}}$$

## A.2. Medida de glucosamina en sustratos sólidos fermentados

### Hidrólisis de la muestra

Reactivos:

- a) KOH conc. (120 gr + 100 ml de agua)
  - b) Etanol 75 % v/v
  - c) Etanol 40 % v/v
  - d) Suspensión de Celite (1g + 20 ml de b), dejar 2 minutos y tomar el sobrenadante.
- b), c) y d) deben estar a 4 °C

Técnica:

La muestra finamente molida y tamizada se pesa dentro de los tubos corex de 15 ml de volumen, luego se trata con 3 ml de a) a 130 °C durante 1 hora con agitación frecuente (cada 10-15 min.). Se enfría en baño de agua-hielo, se agregan 5 ml de b) frío, se agita en vortex hasta lograr una fina emulsión y se deja 15 minutos en baño de agua-hielo. Posteriormente se agrega 1 ml de d) en la superficie y se centrifuga (6000 rpm, 10 min, 2 °C), se descarta el sobrenadante y el residuo se lava con 5 ml de c) y se centrifuga nuevamente (6000 rpm, 10 min, 2 °C). Se repite el lavado con agua helada dos veces más. Por último, el residuo se resuspende en 1.5 ml de agua.

### Colorimetría

Reactivos:

- a) NaNO<sub>2</sub> al 5 % p/v (2 g en 40 ml)
- b) KHSO<sub>4</sub> al 5 % p/v (2 g en 40 ml)
- c) Sulfamato de amonio al 12.5%(1.88 g en 15 ml)
- d) MBTH al 0.5 % (75 mg en 15 ml, preparar diariamente)
- e) FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O al 0.83 % (124 mg en 15 ml)

Técnica:

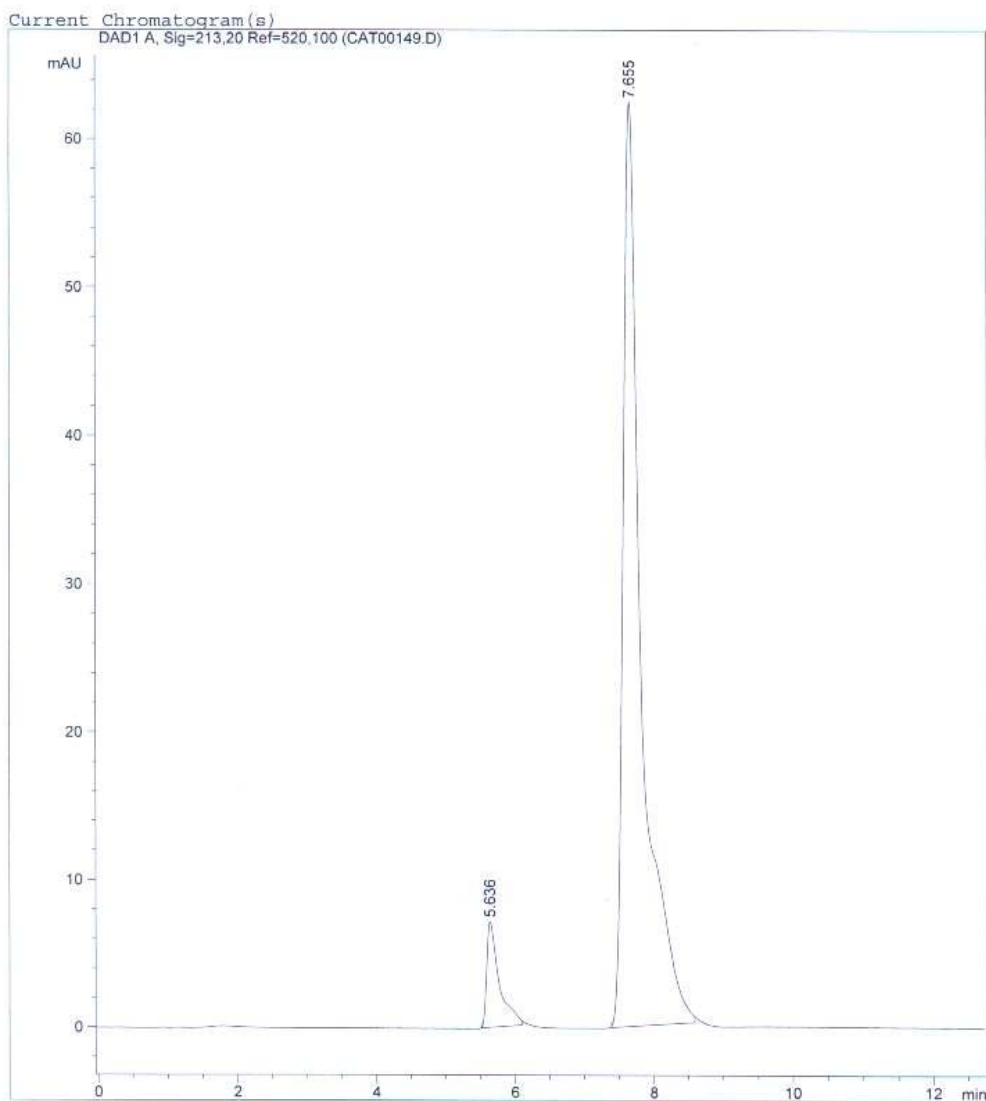
El residuo de la hidrólisis alcalina (1.5 ml) y la curva de glucosamina (1.5 ml), más 1.5 ml de a) más 1,5 ml de b. Agitar durante 15 minutos y centrifugar (6000 rpm, 10 ml, 2 °C. Luego se toman 1.5 ml de sobrenadante y se agregan 0.5 ml de d), se hierve la mezcla por 5 minutos, se deja enfriar y se agregan 0.5 ml de e. Por último se deja reposar 30 minutos y se mide la densidad óptica a 650 nm en un espectrofotómetro.



## **ANEXOS B**

Print of window 38: Current Chromatogram(s)  
acido citrico 500 ppm  
diluido(12.5/25) microlitros

=====  
Injection Date : 10/7/03 11:25:53 AM  
Sample Name : acido citrico Vial : 1  
Acq. Operator : Manuel Ugueto Inj Volume : Inj prog  
Acq. Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\LUIS.M  
Last changed : 10/7/03 11:21:55 AM by Manuel Ugueto  
(modified after loading)  
Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\LUIS.M  
Last changed : 10/14/03 1:22:53 PM by Manuel Ugueto  
(modified after loading)



=====  
Integration Results  
=====

Signal 1: ADC1 A, ADC1 CHANNEL A  
Integrated with enhanced integrator!

No peaks found

Signal 2: DAD1 A, Sig=213,20 Ref=520,100  
Integrated with enhanced integrator!

Peak #	Time [min]	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.636	BB	90.21524	7.19036	0.1824	5.509	6.095
2	7.655	BB	1148.62939	62.47644	0.2665	7.389	8.589

Signal 3: DAD1 B, Sig=254,16 Ref=360,100  
Integrated with enhanced integrator!

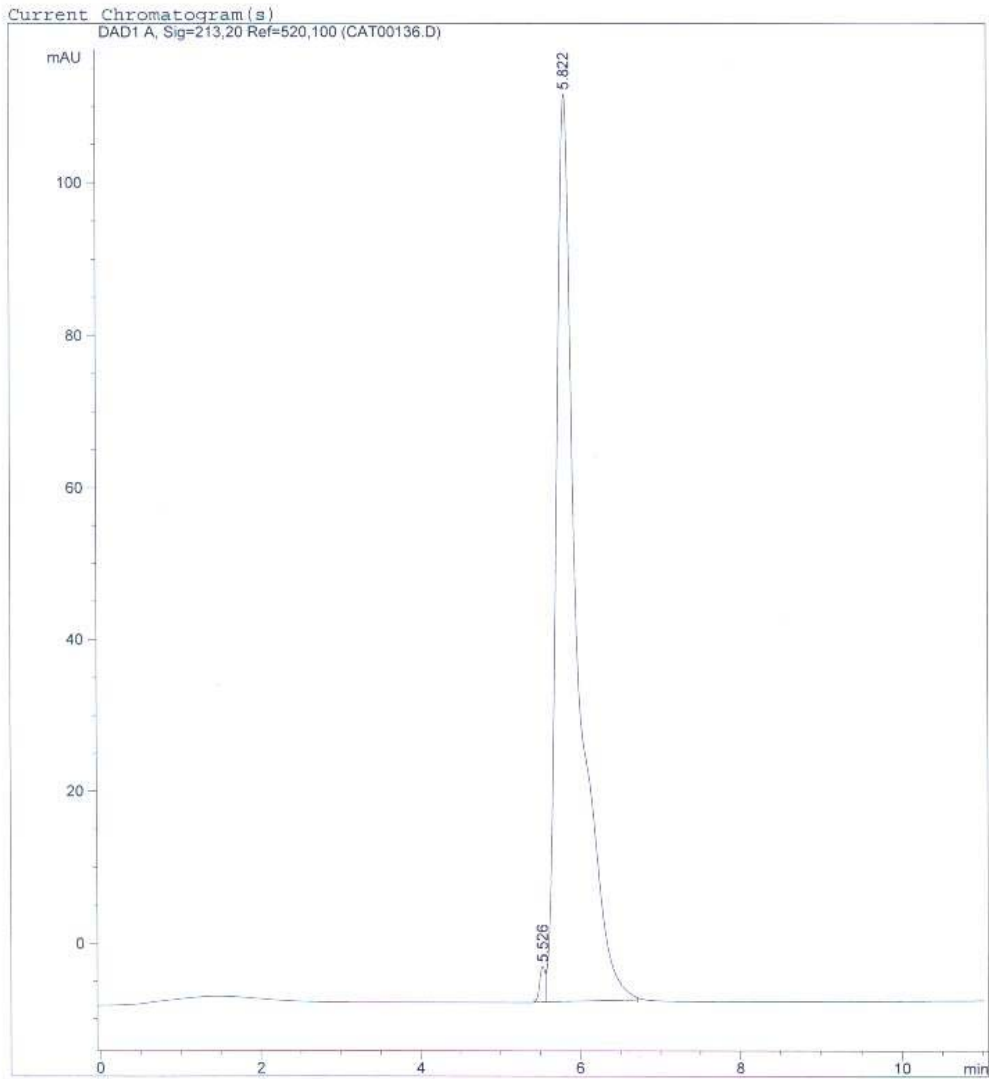
No peaks found

Signal 4: FLD1 A, Ex=zero, Em=zero  
Integrated with enhanced integrator!

No peaks found  
=====

Print of window 38: Current Chromatogram(s)  
oxalico 100 ppm

-----  
Injection Date : 10/6/03 11:33:34 AM  
Sample Name : oxalico 100ppm Vial : 1  
Acq. Operator : Manuel Ugueto Inj Volume : 25 µl  
Acq. Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\LUIS.M  
Last changed : 10/6/03 11:32:52 AM by Manuel Ugueto  
(modified after loading)  
Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\LUIS.M  
Last changed : 10/14/03 2:49:28 PM by Manuel Ugueto  
(modified after loading)



=====  
Integration Results  
=====

Signal 1: ADC1 A, ADC1 CHANNEL A  
Integrated with enhanced integrator!

No peaks found

Signal 2: DAD1 A, Sig=213,20 Ref=520,100  
Integrated with enhanced integrator!

Peak #	Time [min]	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.526	BV	22.15663	4.74062	0.0705	5.424	5.565
2	5.822	VB	2194.79932	119.32155	0.2646	5.565	6.715

Signal 3: DAD1 B, Sig=254,16 Ref=360,100  
Integrated with enhanced integrator!

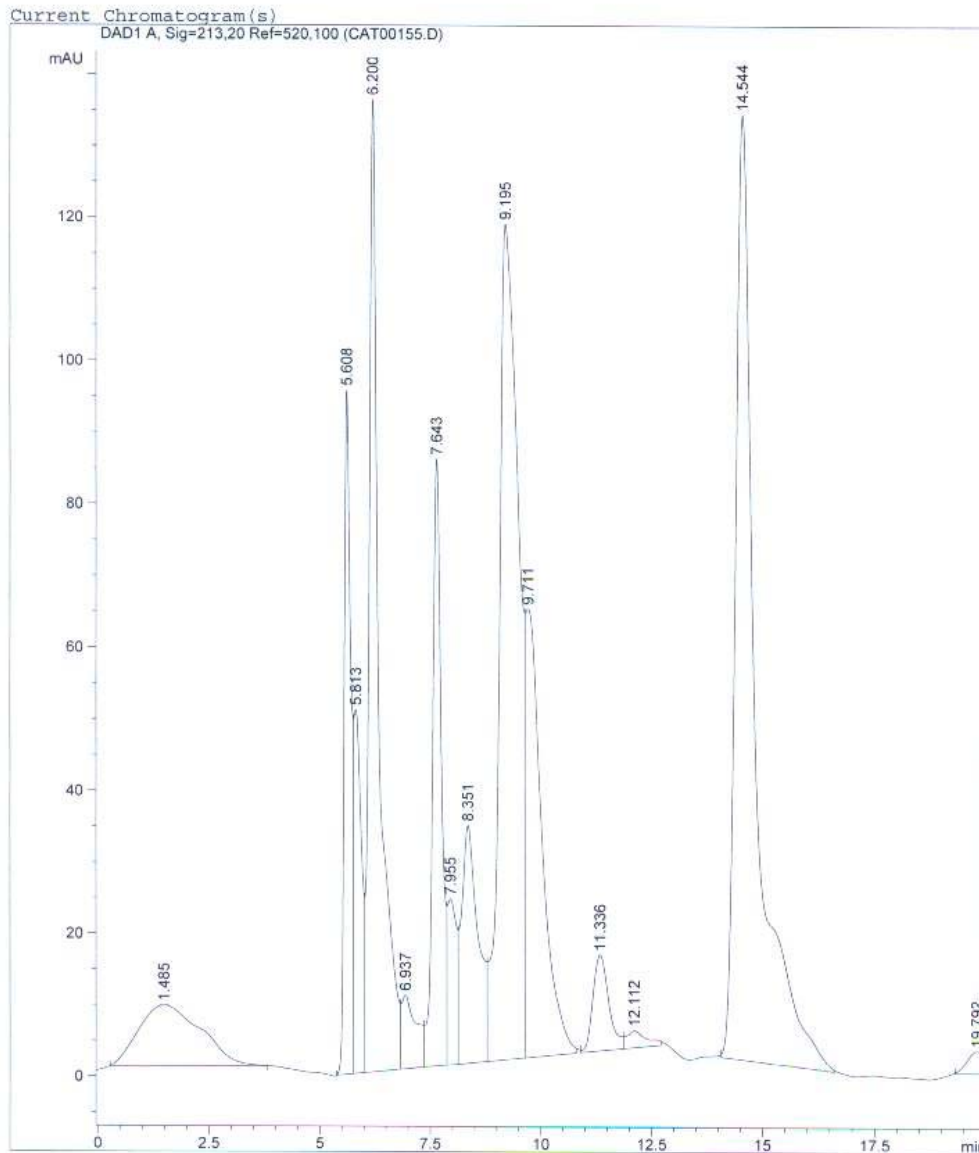
Peak #	Time [min]	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.822	PB	90.99380	5.37397	0.2455	5.562	6.289

Signal 4: FLD1 A, Ex=zero, Em=zero  
Integrated with enhanced integrator!

No peaks found

Print of window 38: Current Chromatogram(s)

-----  
Injection Date : 10/7/03 1:42:21 PM                   Seq. Line : 3  
Sample Name : T-2   Vial : 3  
Acq. Operator : Manuel Ugueto                           Inj : 2  
  Inj Volume : 25 µl  
  
Acq. Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\LUIS.M  
Last changed : 10/7/03 1:40:52 PM by Manuel Ugueto  
   (modified after loading)  
Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\LUIS.M  
Last changed : 10/14/03 1:22:53 PM by Manuel Ugueto  
   (modified after loading)



```

=====
                        Integration Results
=====

```

Signal 1: ADC1 A, ADC1 CHANNEL A  
Integrated with enhanced integrator!

No peaks found

Signal 2: DAD1 A, Sig=213,20 Ref=520,100  
Integrated with enhanced integrator!

Peak #	Time [min]	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	1.485	BB	836.81488	8.60800	1.1582	0.282	3.809
2	5.608	PV	989.64362	95.55919	0.1508	5.382	5.760
3	5.813	VV	617.22974	50.90937	0.1774	5.760	6.016
4	6.200	VV	2218.40137	135.88100	0.2285	6.016	6.830
5	6.937	VV	244.11867	10.38653	0.3122	6.830	7.357
6	7.643	VV	1181.06482	84.72828	0.2066	7.357	7.876
7	7.955	VV	327.69522	23.18437	0.2029	7.876	8.130
8	8.351	VV	873.64630	33.26625	0.3644	8.130	8.787
9	9.195	VV	3526.04761	116.69313	0.4685	8.787	9.641
10	9.711	VB	1622.73938	62.64480	0.3722	9.641	10.802
11	11.336	BV	337.09045	13.45182	0.3884	10.896	11.865
12	12.112	VB	74.90317	2.38875	0.4238	11.865	12.709
13	14.544	BB	4178.07520	131.98619	0.4573	14.069	16.602
14	19.792	BBA	78.37620	3.15612	0.3757	19.309	19.955

Signal 3: DAD1 B, Sig=254,16 Ref=360,100  
Integrated with enhanced integrator!

Peak #	Time [min]	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.598	BV	526.28436	58.57277	0.1348	5.449	5.732
2	5.832	VV	472.60757	34.23632	0.1990	5.732	6.082
3	6.181	VB	171.87814	11.16492	0.2156	6.082	6.689
4	9.224	PV	106.64336	4.08084	0.3929	8.869	9.552
5	9.813	VB	173.16281	5.16138	0.4814	9.552	10.595
6	11.295	PB	305.87372	13.59543	0.3425	10.896	11.942
7	14.549	PB	115.35996	5.07353	0.3493	14.129	15.202

Signal 4: FLD1 A, Ex=zero, Em=zero  
Integrated with enhanced integrator!

No peaks found





```

=====
                        Integration Results
=====

```

Signal 1: ADC1 A, ADC1 CHANNEL A  
 Integrated with enhanced integrator!

No peaks found

Signal 2: DAD1 A, Sig=213,20 Ref=520,100  
 Integrated with enhanced integrator!

Peak #	Time [min]	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.593	BV	4736.38428	361.61539	0.1848	5.375	5.964
2	6.357	VB	3.01068e4	1715.92444	0.2487	5.964	7.455
3	7.622	BB	173.77034	6.30523	0.3675	7.455	8.349
4	9.800	BP	88.76749	3.27956	0.3798	9.269	10.789
5	11.969	BV	838.18842	31.27727	0.4087	11.462	12.323
6	12.588	VB	648.78644	18.30360	0.5135	12.323	13.762
7	14.161	PB	126.22540	6.69191	0.2921	13.821	14.642
8	16.400	PB	279.28339	7.91391	0.5277	15.809	17.275

Signal 3: DAD1 B, Sig=254,16 Ref=360,100  
 Integrated with enhanced integrator!

Peak #	Time [min]	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.602	PV	491.48859	32.22035	0.2080	5.423	5.986
2	6.358	VB	1619.77820	93.96503	0.2371	5.986	7.162
3	11.964	PB	143.80580	3.33690	0.5788	11.255	12.842

Signal 4: FLD1 A, Ex=zero, Em=zero  
 Integrated with enhanced integrator!

No peaks found