

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**ESTUDIO DE LA BIOLIXIVIACIÓN DE Ni Y Co DE LATERITA
FERRUGINOSA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE CULTIVOS DE
Aspergillus niger EN MEDIOS DE SUBPRODUCTOS
AGROINDUSTRIALES**

Presentado Ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela para optar el Título
De Ingeniero Metalúrgico
Por las Brs. Díaz, Arlis
y Quiroga, Irene

Caracas, 2005

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

ESTUDIO DE LA BIOLIXIVIACIÓN DE NI Y CO DE LATERITA FERRUGINOSA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE CULTIVOS DE *Aspergillus niger* EN MEDIOS DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES

Tutor Académico: Prof. Di Yorio Carlo

Asesor: Dr. Dorta Blas

Presentado Ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela para optar el Título
De Ingeniero Metalúrgico
Por las Brs. Díaz, Arlis
y Quiroga, Irene

Caracas, 2005

ACTA

Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por el Consejo de la Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales, para examinar el Trabajo Especial de Grado titulado:

“ESTUDIO DE LA BIOLIXIVIACIÓN DE Ni Y Co DE LATERITA FERRUGINOSA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE CULTIVOS DE *Aspergillus niger* EN MEDIOS DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES ”

Presentado ante la ilustre **Universidad Central de Venezuela** por los Brs. Arlis C. Díaz L. e Irene Quiroga V., dejan constancia de lo siguiente:

Hemos leído este trabajo y participado en su discusión, encontrando que el mismo es suficiente en contenido, calidad y extensión para cumplir con todos los requerimientos establecidos para optar por el título de Ingeniero Metalúrgico.

En fe de lo cual se levanta la presente acta en Caracas a los dieciseis días del mes de noviembre de dos mil cinco.



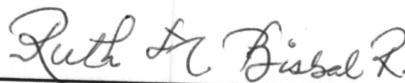
Prof. Carlo Di Yorio

Tutor



Prof. Maribel Suarez

Jurado



Prof. Ruth Bisbal

Jurado

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a nuestros padres, ya que ellos han estado siempre a nuestro lado guiándonos y apoyándonos en todo momento. Gracias por enseñarnos a afrontar cualquier situación que se presente y por su dedicación durante todos estos años.

Al Prof. Carlo Di Yorio, por la oportunidad de participar en este proyecto y por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Blas Dorta y a todas las personas que integran el Laboratorio de Procesos de Fermentación del Instituto de Biología Experimental de la U.C.V., en especial a Domenico Pavone y Luisa Mejias, por toda la colaboración prestada y su asesoramiento.

Al Prof. Edie Montiel de la escuela de Biología de la U.C.V. por su valioso aporte en la elaboración de este trabajo.

A la Prof. Olivia Brito donde quiera que este y al técnico y amigo Marcial Pérez del Laboratorio de Química Instrumental de la escuela de Metalurgia y Ciencia de los Materiales por prestarnos sus servicios y su atención y dedicación dentro y fuera del laboratorio durante todo este tiempo.

A nuestros compañeros del CIDEMEX por la ayuda prestada en todo momento y a nuestro excompañero Edgar Betancourt, por su colaboración al inicio de este trabajo.

A Marianela Díaz, Rubén Bigott, Dubravka Romero, Luis Maracara, Ricardo Rodríguez, Austín Martínez y Adriana Coronado, por su apoyo y amistad incondicional.

A Iván Zerpa por toda su comprensión, solidaridad y el esfuerzo realizado para lograr la culminación de este trabajo.

A José Angel Pérez por su colaboración incondicional en todo lo que estaba a su alcance en los momentos más duros y su invaluable apoyo moral

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron en la culminación de este trabajo.

RESUMEN

Díaz L, Arlis C; Quiroga V, Irene

ESTUDIO DE LA BIOLIXIVIACIÓN DE Ni Y Co DE LATERITA FERRUGINOSA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE CULTIVOS DE *Aspergillus niger* EN MEDIOS DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES

Tutor Académico: Prof. Carlo Di Yorio, Asesor: Dr. Blas Dorta. Trabajo Especial de Grado. Caracas. U.C.V. Facultad de Ingeniería. Escuela de Metalurgia y Ciencias de los Materiales. 2005. n° de pág. 152.

Palabras claves: biolixiviación, níquel, cobalto, subproductos, *Aspergillus niger*.

El mineral laterítico del estado Cojedes, es susceptible a la lixiviación biológica de níquel y cobalto empleando el hongo filamentosos *Aspergillus niger*. La viabilidad técnica de este proceso ha sido estudiada con anterioridad. Esto se atribuye a la capacidad de este hongo de producir ácido cítrico, el cual se ha sido empleado en la lixiviación química de dicho mineral.

En el presente trabajo se emplearon como posibles sustratos fermentables diversos subproductos de la producción industrial de almidón, aceite de maíz y melaza, los cuales son utilizados en la producción de ácido cítrico a nivel industrial. La optimización de un medio de cultivo de *Aspergillus niger* para la lixiviación indirecta de níquel y cobalto selectivamente a partir hierro, se llevó a cabo a través de un diseño estadístico multifactorial y las condiciones en las que se condujo los experimentos estuvieron dirigidas

hacia la maximización de la recuperación de níquel y cobalto, y la minimización de la disolución de hierro para alcanzar altos índices de selectividad.

Una vez obtenido el medio de cultivo, se realizaron estudios de biolixiviación indirecta a temperatura ambiente, en banco de prueba y a altas temperaturas (60 y 80°C), también se realizaron ensayos de biolixiviación directa. Se estudió el crecimiento del hongo así como también la producción de ácido cítrico, el cual es uno de los principales productos metabólicos responsable de la disolución de níquel y cobalto.

De acuerdo con los resultados obtenidos por el proceso de biolixiviación indirecta a temperatura ambiente se logró una recuperación de níquel de 16,25%, cobalto 32,48% y una solubilización del hierro de 0,48% a los 28 días, por lo que se puede señalar que el proceso es altamente selectivo con respecto al hierro. En la biolixiviación a 80°C se obtuvieron recuperaciones por el mismo orden que en el proceso anterior (16,3% Ni, 30% Co) en un tiempo de 4 horas. Con los ensayos de banco de prueba, se consiguió incrementar considerablemente la concentración de níquel en el licor cuando fue recirculado con mineral nuevo (42 % más de la concentración obtenida por biolixiviación indirecta a temperatura ambiente y a 80°C).

En la biolixiviación directa se obtuvieron recuperaciones de 13,76% de níquel, 34,53% de cobalto y 1,52% Fe a los 9 días de incubación, lo que es muy similar a la obtenida por el método indirecto. La precipitación selectiva no fue lograda con este tipo de soluciones a las condiciones de temperatura estudiadas. Mediante un estudio técnico-económico se determinó que el medio de cultivo utilizado, formulado con subproductos agroindustriales, es más económico que los medios convencionales optimizados para la producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* empleados en la biolixiviación de níquel y cobalto.

INDICE

GLOSARIO	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	3
2.1 Minerales de níquel	3
2.1.1 Lateritas	6
2.1.2 El níquel	7
2.1.3 El cobalto	7
2.2 Procesos de obtención del níquel y el cobalto	10
2.2.1 Proceso Pirometalúrgico	10
2.2.2 Proceso Hidrometalúrgico	12
2.2.2.1 Lixiviación	12
2.2.2.2 Tipos de lixiviación	13
2.3 Biolixiviación	17
2.3.1 Microorganismos	19
2.3.2 Clasificación de los microorganismos	20
2.3.3 <i>Aspergillus niger</i>	23
2.3.4 Producción fúngica del ácido cítrico	25
2.3.4.1 Tipos de fermentación	28
2.3.4.2 Condiciones de cultivo	30
2.3.4.3 Medios de cultivo	33
2.3.4.4 Procesos bioquímicos de la fermentación de ácido cítrico	38
2.3.4.5 Crecimiento microbiano	41
2.3.4.6 Ciclo del crecimiento microbiano	42
2.3.5 Biolixiviación de minerales oxidados	45
2.3.5.1 Mecanismo de acción	46
2.3.5.2 Métodos de biolixiviación	46
2.3.5.3 Influencia de los factores ambientales	47

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	50
3.1 Mineral	50
3.1.1 Recolección de muestras	50
3.1.2 Caracterización del mineral	51
3.1.2.1 Homogenización	51
3.1.2.2 Caracterización visual	52
3.1.2.3 Análisis químico cuantitativo	52
3.1.2.4. Difracción de rayos X	53
3.1.3 Preparación física de la muestra	53
3.1.3.1 Reducción de tamaño	53
3.1.3.1 Tamizaje	54
3.2 Microorganismos	55
3.2.1 Medios de cultivo	55
3.2.1.1 Agar nutritivo dextrosa papa	55
3.2.1.2 Cultivo sumergido para biolixiviación: diseño y optimización	57
3.2.2 Preparación de los inóculos	60
3.2.3 Estudio de la cinética de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en el medio de cultivo optimizado	62
3.2.3.1 Determinación del crecimiento micelial: biomasa	62
3.2.3.2 Determinación del pH y la acidez	64
3.2.3.3 Determinación de la concentración de ácidos orgánicos	65
3.3 Biolixiviación	66
3.3.1 Biolixiviación indirecta	66
3.3.1.1 Obtención de solución sobrenadante para lixiviar	66
3.3.1.2. Estudio de la cinética de biolixiviación indirecta a temperatura ambiente	67
3.3.1.3 Estudio de banco de prueba	67
3.3.1.4 Cinética de lixiviación a altas temperaturas	68
3.3.2 Biolixiviación directa	69
3.3.3 Precipitación	70

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS	71
4.1 Mineral	71
4.1.1 Caracterización del mineral	71
4.1.2 Análisis químico cuantitativo	73
4.1.3 Caracterización por rayos X	73
4.2 Microorganismos	75
4.2.1 Resultados del diseño multifactorial	75
4.2.2 Cinética de crecimiento de <i>A. niger</i>	85
4.2.2.1 Concentración de los ácidos orgánicos	89
4.3 Biolixiviación	91
4.3.1 Biolixiviación Indirecta	91
4.3.1.1 Obtención de sobrenadante	91
4.3.1.2 Cinética de lixiviación a temperatura ambiente	92
4.3.1.3 Estudio de banco de prueba	98
4.3.1.4 Lixiviación a altas temperaturas	104
4.3.2 Biolixiviación directa	107
4.3.3 Coeficientes de selectividad	110
4.3.4 Precipitación	112
4.3.5 Balance técnico-económico	113
4.3.6 Ruta biotecnológica recomendada	116
5. CONCLUSIONES	117
6. RECOMENDACIONES	119
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
APENDICES	125

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 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 CO₂ 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.

Biosolución: Metabolitos ácidos producidos biológicamente.

Enzimas: Catalizadoras proteicos 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.100

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

Quimiolitrofo: 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.

1. INTRODUCCIÓN

El agotamiento de los minerales sulfurosos de níquel de alto grado, los altos costos de combustible, las regulaciones ambientales más estrictas y los requerimientos energéticos de los procesos pirometalúrgicos han conducido a grandes esfuerzos en la recuperación de níquel de minerales lateríticos de bajo tenor.

La extracción de níquel y cobalto de laterita de bajo grado constituyen unos de los procesos más costosos, en gran parte debido al bajo grado de los metales presentes (típicamente entre 1-1,6% de níquel; 0,1-0,2% de cobalto), la composición mineralógica y distribución de níquel y cobalto dentro de la matriz del mineral, los cuales inhiben la aplicación de procesos de beneficio para concentración de los minerales. La importancia de las lateritas de bajo grado radica en que el 80% de las reservas de níquel y una proporción mayor de las reservas de cobalto se encuentran en minerales lateríticos, considerando ambos factores, junto con los apremios ambientales que se rigen actualmente, existe la necesidad de un proceso alternativo viable el cual podría tratar ambos aspectos: económico y ambiental asociados con el procesamiento de este mineral. La extracción biológica usando microorganismos heterotrópicos tiene el potencial de proveer un proceso de bajos costos.

Debido a que los ácidos excretados por microorganismos tienen un efecto favorable en la disolución de metales, desde hace algún tiempo se ha desarrollado el área de la biohidrometalurgia con el fin de implementar nuevas tecnologías a través de la lixiviación bacteriana. Una de las aplicaciones más significativa de esta rama de la hidrometalurgia es la recuperación de metales en minerales de bajo grado. La principal vía de obtención de níquel desde hace muchos años es la pirometalurgia, pero este método requiere un gran consumo de energía, un alto costo de minería y un gran impacto ambiental. Con base en esto la biolixiviación se presenta como un método de obtención de metales, como el níquel y el cobalto, económicamente rentable, de bajo impacto ambiental y de menor consumo energético.

Uno de los principales depósitos de lateritas que se encuentra en Venezuela es el de Loma de Níquel, ubicado en el Estado Aragua y el mismo esta siendo explotado en la actualidad por vía pirometalúrgica. Sin embargo, otros depósitos como el de Tinaquillo, Estado Cojedes no son explotados debido a su bajo tenor. Es ahí donde entra en juego la aplicación de la biohidrometalurgia.

En este trabajo, se realizó un estudio a escala de laboratorio, para determinar la factibilidad de recuperación de níquel y cobalto de laterita ferruginosa del estado Cojedes a través de biolixiviación indirecta con *Aspergillus niger*, y la utilización de subproductos del proceso industrial de producción de aceite, almidón de maíz y melaza en la formulación de un medio de cultivo para dicho microorganismo. Se empleará un diseño estadístico multifactorial con el fin de determinar las cantidades adecuadas de cada componente en el medio en función de la obtención de una biosolución apropiada para la lixiviación selectiva de níquel y cobalto. También se estudiará la biolixiviación directa y el efecto de la temperatura y la recirculación del licor, en la cinética y en la concentración de metales disueltos, respectivamente, en el proceso de biolixiviación indirecta. De acuerdo a los resultados obtenidos en las etapas anteriores se recomendará la ruta biotecnológica para la recuperación de níquel y cobalto.

2. FUNDAMENTO TEORICO

2.1 Minerales de Níquel

El níquel se encuentra en la naturaleza formando silicatos, óxidos, sulfuros, sulfatos, etc. La Garnierita $(\text{Ni,Mg})_6[(\text{OH})_8/\text{Si}_4\text{O}_{10}]$, es uno de los minerales más empleados en la extracción de este metal. El níquel se utiliza mayormente en la fabricación de aceros especiales como el acero inoxidable, y al igual que muchos otros minerales, puede ser explotado por ambos métodos: cielo abierto y subterráneo. Es un mineral de gran demanda en la industria (la siderúrgica por ejemplo), principalmente para la obtención de aceros de gran calidad y en muchísimas aleaciones con cobre, aluminio, plomo, cobalto, manganeso, plata y oro, ya que le proporciona a las aleaciones dureza, tenacidad y ligereza, así como cualidades anticorrosivas, eléctricas y térmicas ^[1].

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 $(\text{Ni, Fe})_3\text{S}_8$, y la otra en forma de lateritas donde los minerales de la mena principales son limonita niquelífera $((\text{Fe,Ni})\text{O}(\text{OH}))$ y garnierita $((\text{Ni,Mg})_3\text{H}_4\text{Si}_2\text{O}_{11})$, la cual es un silicato doble de níquel y magnesio que siempre contiene hierro y cobalto. También existen otros tipos de minerales asociados al níquel como son: millerita (NiS), niquelina (NiAs), gersdorffita (NiAsS), ullmanita (NiSbS), rammelsbergita (NiAs₂), cloantita (NiAs₂₋₃), annabergita $[\text{Ni}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$, forbesita $[(\text{Ni,Co})\text{HAsO}_4]$, maucherita (Ni₄As₃).^[2]

Por otro lado, se tiene que 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 Minnessota, 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 ^[3].

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].

En Venezuela los depósitos de níquel se asocian con rocas ultrabásicas serpentinizadas en la Cordillera de la Costa. Todos los depósitos y manifestaciones estudiadas son del tipo laterítico. Hasta el momento, en nuestro país no se han ubicado depósitos primarios de níquel asociados con sulfuros de origen magmático. Las rocas ultrabásicas en el norte de Venezuela forman dos fajas definidas a lo largo de la Cordillera de la Costa y Serranía del Interior. La faja norte se extiende desde Margarita pasando por el norte de Caracas hacia el oeste, al norte de las montañas de Puerto Cabello-Santa María (Estado Yaracuy); la segunda faja se extiende desde la Península de Araya-Paria, en dirección oeste pasando por la cuenca de Santa Lucía, Charallave, Loma de Níquel, Villa de Cura, San Juan de los Morros, Tinaquillo y Cabimba. Fuera de esta dos fajas, se encuentran peridotitas serpentinizadas en la Península de Paraguaná (Cerro Santa Ana) a lo largo del frente montañoso de la Serranía del Interior y al norte del valle río Yaracuy. Las grandes masas de Loma de Níquel y Tinaquillo son las únicas intrusiones que han sido estudiadas sistemáticamente para determinar reservas y tenor de las menas de níquel.

Estado Aragua, Región de Loma de Níquel: la masa de peridotita serpentinizada, aflora a unos 20 Km. al sur de Tejerías, formando un cuerpo continuo que se extiende por más de 21 Km. de distancia, en dirección N 70 E, desde unos 4 Km. al oeste del caserío de Tiara, hasta las proximidades de Tácata, con un ancho variable entre 1 y 5 Km.

En la zona de Loma de Níquel, el manto laterítico cubre una superficie de más de 600 hc y delimita la extensión del yacimiento niquelífero, cuyo espesor promedio es de

6,36 m. El yacimiento, producto de la alteración *in situ* de la peridotita es similar a los yacimientos explotados en Cuba, República Dominicana, Brasil, Guatemala, Nueva Caledonia, Islas Filipinas. De acuerdo a los trabajos evaluativos ejecutados a todo lo largo del área, se diferencian claramente las partes componentes de la masa laterítica de Loma de Níquel, el nivel laterítico fue dividido en cuatro zonas en base principalmente de sus características físicas y variación química, estas zonas son:

- Zona 1: La parte superior de la laterita es un manto arcilloso de color rojo, con pequeñas concreciones y costras de Goethita-Limonita. A pesar de ser muy poroso, el peso específico del material es elevado por el contenido de hierro que varía entre 35 y 45%.
- Zona 2: Esta zona, compuesta de laterita níquelífera, es de color amarillo rojizo. La laterita tiene un alto grado de humedad y bajo peso específico. El níquel se ha concentrado por precipitación iónica de las aguas de penetración, en forma de Garnierita (silicato hidratado de magnesio y níquel) en laterita.
- Zona 3: serpentinita níquelífera, es la parte comprendida entre la base de la laterita níquelífera y el contacto superior de la porción meteorizada de la masa de peridotita serpentinizada que sirve de base a todo cuerpo laterítico. Es una serpentina alterada de color verdoso claro, caracterizada por el desarrollo de sistemas de fracturas y alto grado de porosidad. La mena níquelífera se presenta en forma de laminaciones. El material es poroso, de bajo peso específico, alto contenido de níquel y magnesio, y bajo contenido de hierro.
- Zona 4: esta zona comprende la peridotita con un alto grado de serpentización más o menos variable. Posee el tenor inicial de níquel, característico de las peridotitas (0,25%). No se considera mena.

Estado Cojedes área de Tinaquillo: en esta zona se observa un enriquecimiento de níquel en lateritas producidas a partir de rocas ultrabásicas. La peridotita de Tinaquillo es una masa que aflora al este de la población homónima y está compuesta principalmente de peridotita, serpentinita y metagabro en contacto con diques ácidos, cuarcitas metamorfizadas y bandas de piroxinita y anfibolita. Se aprecia en esta área: material

laterítico arrastrado, material laterítico *in situ* con drenaje pobre, material laterítico *in situ* con buen drenaje, y serpentinitas ^[1].

2.1.1 Lateritas

El termino laterita se aplica a muchos suelos tropicales ricos en aluminio hidratado y óxidos de hierro. El nombre mismo derivado de una palabra en latín que significa “ladrillo”, sugiere el color característico producido en estos suelos por el hierro.

Las lateritas se pueden definir minerales enriquecidos en óxidos e hidróxidos de hierro, como consecuencia de la acumulación de estos componentes en respuesta a la meteorización química avanzada de rocas ricas en hierro, fundamentalmente rocas ígneas ^[5].

La meteorización incluye procesos de alteración físico-química de rocas y sus minerales (primarios), que ocurre en la superficie terrestre, en la interfase de la atmósfera, biosfera, hidrosfera y litosfera y la producción de nuevos minerales (minerales secundarios) que están en equilibrio con las condiciones de presión, temperatura etc., que predominan en esta interfase.

La laterita es un tipo particular de suelo, desarrollado en condiciones específicas: en climas tropicales, con temperaturas medias altas, y con alta pluviosidad. Presentan un contenido en Ni entre 0.3 % y 1.5 % y otros elementos de interés como Co, Cr y Al.

De las lateritas se extrae fundamentalmente hierro, las menas de lateritas niquelíferas se clasifican en dos tipos: las saprofitas (silicatos) y las limoníticas (óxidos) y son las principales reservas de Ni a nivel mundial ^[6].

2.1.2 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 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. 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, procesamiento de metales, aplicaciones médicas, industria química y petroquímica, sistemas de gasificación, etc.

En la tabla 2.1 se presentan las principales propiedades fisico-químicas del níquel [7].

2.1.3 El cobalto

El cobalto es un elemento metálico, magnético, de color blanco plateado, usado principalmente para obtener aleaciones, constituye el $2,3 \times 10^{-3}\%$ de la corteza terrestre,

ocupando el lugar 30 en abundancia entre los elementos de la corteza. 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.

Tabla 2.1 Propiedades físico-químicas del níquel [8].

Níquel	
General	
Nombre, símbolo, número	Níquel, Ni, 28
Serie química	Metal de transición
Grupo, periodo, bloque	10, 4, d
Densidad, dureza Mohs	8908 kg/m ³ , 4,0
Apariencia	Lustroso, metálico 
Propiedades físicas	
Estado de la materia	Sólido (ferromagnético)
Punto de fusión	1728 K
Punto de ebullición	3186 K
Entalpía de vaporización	370,4 kJ/mol
Entalpía de fusión	17,47 kJ/mol
Presión de vapor	237 Pa a 1726 K

El cobalto es un metal duro, quebradizo, muy parecido al hierro y níquel. 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 α (hexagonal) y β (cúbica), produciéndose la transición hacia los 400 °C [8]. 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.

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. Otros usos importantes son la síntesis de vitamina B12 y catalizadores.

En la industria química, el cobalto se utiliza en la catálisis homogénea y heterogénea para sintetizar combustibles

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, ingeniería y medicina nuclear, etc. [9].

Tabla 2.2 Propiedades físico-químicas del cobalto [8].

Cobalto	
General	
Nombre, símbolo, número	cobalto, Co, 27
Serie química	metal de transición
Grupo, periodo, bloque	9, 4, d
Densidad, dureza Mohs	8900 kg/m ³ , 5.0
Apariencia	metálico con tinte gris 
Propiedades físicas	
Estado de la materia	Sólido (ferromagnético)
Punto de fusión	1768 K
Punto de ebullición	3200 K
Entalpía de vaporización	376,5 kJ/mol
Entalpía de fusión	16,19 kJ/mol
Presión de vapor	175 Pa a 1768 K

2.2 Procesos de obtención del níquel y cobalto.

Los procesos implementados actualmente para la obtención de níquel y cobalto dependen de las características de la mena, en base a ello, existen dos vías para obtener estos metales: la Pirometalurgia y la Hidrometalurgia. Cada una de estas vías presenta ciertas condiciones que deben ser analizadas al momento de su aplicación con el fin de determinar la rentabilidad y la eficiencia del proceso a implementar.

2.2.1 Proceso pirometalúrgico

Es método de procesamiento de los minerales niquelíferos, tanto de óxidos como sulfuros, con formación de mata de níquel, que posteriormente 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%.

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 Boundovand 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 como se observa en la ecuación (3):



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 ferroníquel de una composición de 80-85% de Fe, 7 a 9% de Ni, 4 a 5% de SiO₂ y alrededor 1% de C. Durante este proceso, parte del hierro puede pasar a la escoria de acuerdo a la reacción (4):



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, 10].

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 permite el beneficio de los metales nobles 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 Ni(CO)₄ funde a 25 °C, ebulle a 45 °C y se descompone a 180 - 200 °C, según la reacción (5):



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 ^[10].

2.2.2 Proceso hidrometalúrgico

La hidrometalurgia, a diferencia de la pirometalurgia, es una técnica extractiva mucho más moderna, que consiste principalmente en el tratamiento de minerales, concentrados y otros materiales metálicos a través de métodos húmedos que producen la disolución de alguno de sus componentes y su posterior recuperación a partir de la disolución. Normalmente en un intervalo de temperaturas comprendido entre 25 y 250 °C. 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 ^[11].

2.2.2.1 Lixiviación

La lixiviación es la primera etapa de cualquier proceso hidrometalúrgico. Este es el término aplicado a la recuperación o disolución química de un metal a partir de un mineral utilizando el disolvente adecuado. En general, la lixiviación se aplica a los minerales que no pueden ser tratados con un beneficio económico equivalente con métodos convencionales más desarrollados a escala comercial como la concentración por flotación o la fusión.

La lixiviación es de un tipo o de otro en función de la reacción química que la provoca. Según esto, el ataque químico de un mineral sólo se puede realizar mediante cualquiera de las tres reacciones siguientes: ácido-base, redox, complejante.

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. Para ello es importante realizar las consideraciones de tipo termodinámico para comprobar las limitaciones de los procesos, definir las condiciones de precipitación de los metales a partir de los licores de lixiviación e incluso para explicar otros ámbitos de los materiales metálicos como su mineralización geológica y su corrosión. Los parámetros más importantes son el voltaje, relacionado con la energía libre, y el pH. Estas dos variables se representan en los diagramas de Pourbaix.

Por otra parte, la fisico-química de los sistemas de mineralización es de mucha utilidad, puesto que representa un gran compendio de reacciones de importancia para los sistemas hidrometalúrgicos. Debido a ello los factores cinéticos son determinantes ya que las reacciones tienen que ser lo suficientemente rápidas para que los procedimientos empleados tengan aplicación comercial.

Después de realizar el estudio fisico-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 ^[11].

2.2.2.2 Tipos de Lixiviación

La lixiviación tiene unas importantes implicaciones económicas, no sólo porque la recuperación del metal está controlada por el rendimiento de esta etapa sino también porque los consumos de reactivos dentro del proceso tienen en la lixiviación su capítulo más importante. Además, el método de lixiviación condiciona fuertemente las etapas

precedentes y posteriores. Ante tal situación, se ha tenido que desarrollar distintos procedimientos de trabajo que se acoplen al tipo de mena disponible y a las implicaciones económicas correspondientes. En este sentido se tienen: la lixiviación estática o por percolación y la lixiviación dinámica o por agitación ^[12].

➤ **Lixiviación estática o por percolación:** no existe movimiento relativo entre el sólido y la disolución de lixiviación, ya que el sólido permanece estático y la disolución lo percola a través de él. 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). La lixiviación estática se desarrolla a nivel comercial según tres modalidades distintas: lixiviación “in situ”, lixiviación en montones y lixiviación en estanques ^[11].

- Lixiviación “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.

El método puede aplicarse tanto a minas ya explotadas, pero en las que aún quedan masas mineralizadas de baja ley que no pagarían los costos de minería y de tratamiento en el exterior, como a yacimientos pobres, por lo general de tipo sedimentario, que no justifican económicamente un sistema de explotación convencional. Sin embargo, la velocidad del proceso es muy lenta (5 a 10 años) ^[10].

- Lixiviación en montones: en este tipo de lixiviación el mineral triturado hasta un tamaño adecuado, e incluso sin triturar, se apila en montones, formando un lecho estático a través de él se hace percolar la disolución lixivante que se añade al mineral de forma continua o discontinua, dependiendo del caso. La adición de la

disolución lixivante puede hacerse utilizando aspersores o inundando la superficie. 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., por lo que puede llegar a sobrepasar el millón de toneladas ^[11].

- **Lixiviación en estanques:** este método de lixiviación es una forma sencilla y eficiente de colocar el mineral en contacto con la disolución de lixiviación. Se utiliza el principio de trabajo en contracorriente, aunque con el mineral estático se diferencia de la mayoría de los métodos que operan de esta forma. El mineral es tratado sucesivamente con concentraciones crecientes de la disolución de lixiviación, esta puede ser añadida en forma continua o discontinua. El ciclo completo de trabajo contempla el llenado del estanque con la disolución, el empapado del sólido durante cierto tiempo y el vaciado del estanque. Entonces, la disolución drenada avanza al próximo estanque y el proceso se repite ^[11, 12].

- **Lixiviación agitada:** en este tipo de lixiviación, el mineral es reducido de tamaño a una granulometría muy fina (menor de 100-150 μ), para facilitar la transferencia de materia, el cual se encuentra en una pulpa formada con el agente lixivante. A diferencia de lo que ocurre con la lixiviación estática, en la lixiviación dinámica el mineral y la disolución de ataque están en movimiento relativo ^[13].

Finalmente, debido a estas condiciones de lixiviación, con minerales ricos, cinética rápida y rendimientos elevados de extracción, las disoluciones fértiles son muy concentradas y aptas para realizar, sin concentración previa, una precipitación del metal. La lixiviación agitada a presión atmosférica es el procedimiento más utilizado a escala industrial. Existen dos tipos de agitación: mecánica y neumática ^[11].

- **Agitación mecánica:** imprime al líquido un movimiento tal que la velocidad local del fluido sea superior a la de caída libre de las partículas, por lo que el líquido

arrastra las partículas impidiendo la sedimentación y favorece la transferencia de materia. Los reactores con este tipo de agitación consisten en una vasija cilíndrica y un dispositivo mecánico para generar la turbulencia adecuada en el sistema. Este dispositivo es un sistema motor que hace girar, a las revoluciones apropiadas, un eje en cuyo extremo inferior hay un sistema de paletas que producen la deseada turbulencia en la pulpa ^[11].

- **Agitación neumática:** la aplicación comercial de la agitación neumática se concreta en los tanques de Pachuca, en ellos el movimiento de la pulpa se obtiene por energía de expansión del aire comprimido inyectado en el vértice de la parte cónica inferior del reactor. El Pachuca no es realmente un reactor de mezcla perfecto sino más bien un sistema de recirculación ^[10].

En el caso de lixiviación de menas de níquel se han especializado en dos tipos de lixiviación, 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 ^[14].
- **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). 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 ^[15].

2.3 Biolixiviación

El empleo de sistemas biológicos en los procesos industriales, conocida como biotecnología, ha sido usado desde tiempos inmemoriales en la producción de vino, cerveza, pan, en la fabricación de antibióticos, en la industria de alimentos, entre otras aplicaciones. En el sector minero metalúrgico, la biotecnología ha sido utilizada como una herramienta en la disolución y recuperación de los valores metálicos contenidos en menas. Mayormente, los procesos microbianos han sido empleados en la lixiviación de cobre y uranio, en el mejoramiento de la extracción de metales preciosos contenidos en sulfuros refractarios, y en el tratamiento de aguas residuales ^[16]. Por lo tanto, en lo que sigue, la biolixiviación, también denominada lixiviación bacteriana, se entenderá como el ataque y solubilización de un mineral mediante la acción directa o indirecta de distintos microorganismos ^[11].

La biolixiviación también puede ser definida, como un proceso natural de disolución que resulta de la acción de un grupo de bacterias (principalmente del género *Thiobacillus*) con habilidad de oxidar minerales sulfurados, permitiendo la liberación de los valores metálicos contenidos en ellos. Por mucho tiempo, se pensó que la disolución o lixiviación de metales era un proceso netamente químico, mediado por agua y oxígeno atmosférico. El descubrimiento de bacterias acidófilas ferro-oxidantes y sulfo-oxidantes ha sido primordial en la definición de la lixiviación como un proceso catalizado biológicamente.

En términos más globales, se puede señalar que la biolixiviación es una tecnología que emplea bacterias específicas para lixiviar, o extraer, un metal de valor como uranio, cobre, zinc, níquel y cobalto presente en las menas o en un concentrado mineral. El producto final de la biolixiviación es una solución ácida que contiene el metal valor en su forma soluble ^[16].

Los microorganismos que participan en la degradación de los minerales se caracterizan por su capacidad para resistir ambientes extremos. El hábitat en que se

desarrollan se caracteriza 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. En la tabla 2.3 se mencionan los principales microorganismos involucrados en la lixiviación ^[17]:

Tabla 2.3 Microorganismos involucrados en la lixiviación de minerales ^[17].

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>	Heterótrofos	Óxidos
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Penicillium simplicissimum</i>		
<i>Penicillium expansum</i>		
<i>Penicillium glaucum</i>		
<i>Bacillus circulans</i>		
<i>Cephalosporium sp</i>		

La tecnología microbiana presenta ventajas sobre los métodos no biológicos, entre los que podemos encontrar ^[11]:

- Requiere poca inversión de capital (las bacterias pueden ser aisladas a partir de aguas ácidas de minas).

- Bajos costos de operación necesarios para las operaciones hidrometalúrgicas en comparación con los procesos convencionales.
- Relativa ausencia de producción de contaminación ambiental durante el proceso.
- Posibilidad de tratamientos de metales pobres y productos residuales, que de otra forma no podrían beneficiarse.
- Ausencia de contaminación ambiental por SO₂.
- Bajo consumo de reactivos, ya que estos son producidos por los microorganismos.
- Fácil separación de los subproductos del proceso.

Sin embargo, también presenta una serie de desventajas tales como un crecimiento lento de los microorganismos implicados, lo que se traduce en bajas velocidades de reacción durante el proceso. La obtención de soluciones altamente diluidas dificulta la obtención directa del metal a partir de las mismas. Por último la adopción de nuevos procesos extractivos requiere asumir varios riesgos, principalmente económicos, que debido a la situación actual de la metalurgia extractiva no son del todo viables ^[16].

2.3.1 Microorganismos

Un microorganismo, también llamado *microbio* u *organismo microscópico*, es un ser vivo que sólo puede visualizarse con el microscopio. La ciencia que estudia a los organismos que son muy pequeños (menores de 0,1 mm.) es la microbiología ^[18].

Son organismos 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 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 ^[19].

Todas las células contienen determinados tipos de componentes químicos complejos: proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos. Entre los microorganismos se encuentran organismos unicelulares procariotas, como las bacterias, eucariotas, como los protozoos, una parte de las algas y los hongos, e incluso los organismos de tamaño ultramicroscópico, como los virus ^[18].

2.3.2 Clasificación de los microorganismos

Los organismos vivos se pueden dividir en dos grupos: eucariotas y procariotas, tal como se presenta en la tabla 2.4. La diferencia entre ellos depende principalmente de si los cromosomas están contenidos en un núcleo bien definido. Los procariotas contienen un solo cromosoma, en tanto que los eucariotas contienen muchos cromosomas en una estructura unida a una membrana, el núcleo ^[20].

Tabla 2.4 Clasificación de los microorganismos ^[19].

Procarióticos	Eucarióticos
Archaea	Eukarya:
	Algas
Bacteria	Hongos
	Protozoos

Las procariotas representan las células más pequeñas del reino protista, el cual consiste en bacterias y algas verde-azules. El resto, algas, levaduras, hongos y protozoarios, son eucariotas. Las células bacterianas se presentan como bastones, esferas, cadenas y

espirales, que en general son más pequeñas que las levaduras y los mohos. La composición de las bacterias muestra que contiene más proteínas y menos lípidos o carbohidratos que las levaduras y los mohos. En la tabla 2.5 se presentan algunas características físicas de las células microbianas ^[20].

Tabla 2.5 Características físicas de las células microbianas ^[20].

Característica	Bacterias	Levaduras	Mohos
Forma de las células	Bastón, esferas, espirales.	Elipsoides, esferas, micelios, cadenas.	Micelios, esferas.
Tamaño de las células	0,5-3 μm	1-5 μm	5-15 μm
Presencia de esporas	<i>Bacillus</i> (aerobio), <i>Clostridium</i> (anaeróbico)	En algunas	En algunos

Dentro de las bacterias 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 O₂) como los anóxicos o anaerobios (que no contienen O₂), pueden ser habitados por distintas especies de bacterias.

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 a 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 fototofía. 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 ^[19].

Por otro lado, los microorganismos se pueden clasificar según ciertos aspectos ^[19]:

- 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 entre 45 y 80 °C.

- 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).

- 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.

- Fuente Carbono:

- Autótrofo: Biosintetiza todo el material celular a partir del CO₂, como única fuente de carbono.
 - Heterótrofo: Requiere compuestos orgánicos como fuente de carbono.
- 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.

2.3.3 *Aspergillus niger*

El género *Aspergillus* corresponde a un grupo de mohos que se encuentran alrededor del mundo y que están ampliamente distribuidos en la naturaleza (frutas, vegetales o cualquier otro sustrato que le sirva de alimento), y tienen importancia económica en muchas industrias de la fermentación que requieren la producción de ácido cítrico y glucónico. Se designa bajo el término de mohos a todos los hongos filamentosos, de tamaño pequeño, generalmente pluricelulares y que crecen en forma de masa enmarañada ^[21]. Los mohos son capaces de desarrollarse en condiciones más difíciles que el resto de los microorganismos. El género incluye aproximadamente ciento ochenta y cinco (185) especies, de las cuales veinte (20) han sido reportadas como agentes casuales oportunistas en el hombre. El principal hábitat de las especies de *Aspergillus* es el suelo, desde donde sus conidias son dispersadas por el viento para posarse en los diferentes sustratos ^[21].

Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus*, se clasifican en base a las características de sus colonias y a la morfología microscópica en el medio. El *Aspergillus niger* (Van Thieghem, 1867), es un microorganismo que pertenece al género fúngico, división: Eumycota, subdivisión: Deuteromycotina, clase: Hyphomycetes, orden:

Moniliales y familia: Moniliaceae. Microscópicamente las colonias son inicialmente blancas, posteriormente negras con un reverso amarillo. A nivel microscópico, los conidióforos son hialinos, pigmentados en su parte superior, lisos y de pared gruesa. La vesícula es grande y globosa. Las fiálides son biseriadas y cubren completamente la vesícula. Las conidias son pigmentadas, unicelulares, globosas, de pared gruesa y equinuladas ^[22].

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 llaman 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. 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 ^[19].

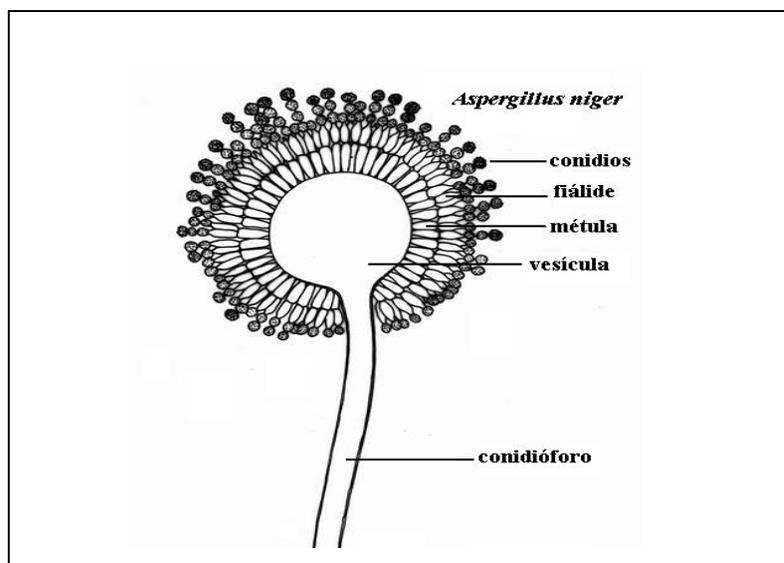


Figura 2.1 Morfología del *Aspergillus niger* ^[23].

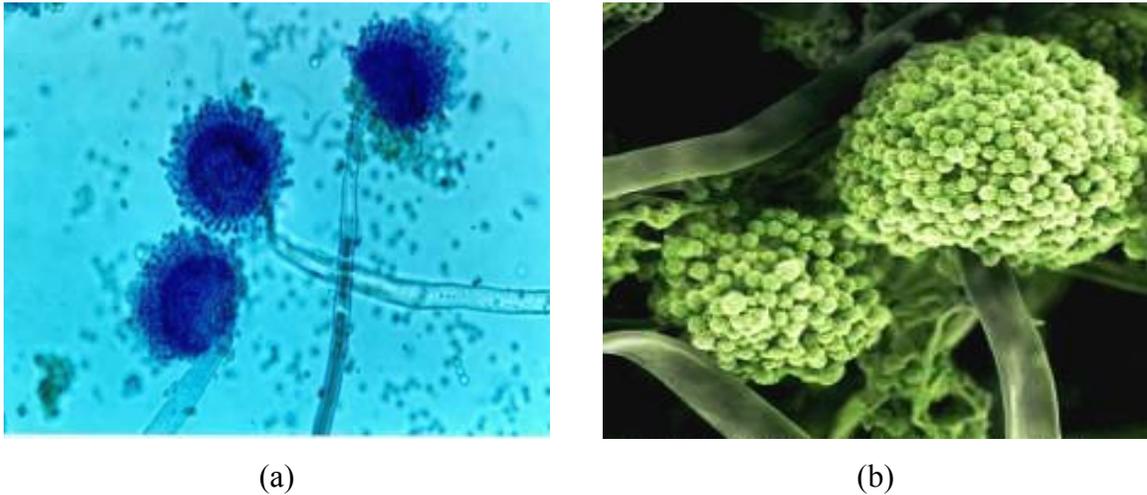


Figura 2.2. Morfología microscópica del *Aspergillus niger*: (a) Fotomicrografía a 40x^[24], (b) Fotomicrografía a 800x^[25].

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^[17].

2.4.3 Producción fúngica del ácido cítrico

El ácido cítrico es un ácido tricarboxílico con seis átomos de carbono el cual fue aislado inicialmente a partir del jugo de limón y cristalizado por Scheele en 1784. Es un componente natural de muchas frutas cítricas. Aunque desde 1983 Wehmer había mostrado que ciertos mohos del género *Penicillium* y *Mucor* podían producir ácido cítrico en un medio de sacarosa, hasta los inicios del siglo XX el ácido cítrico se producía principalmente a partir del jugo de limón^[20]. La fórmula química del ácido cítrico es $C_6H_8O_7$, es un sólido blanco que se emplea como conservante y antioxidante natural en el

envasado de muchos alimentos como las conservas vegetales enlatadas. El nombre del ácido cítrico es ácido 2-Hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico ^[26].

Al disociarse en agua, este ácido es capaz de ceder tres iones hidrógenos, por esta razón entra en el grupo de los ácidos tripróticos, pero se le considera un electrolito débil, es decir, al disolverse en agua la molécula de ácido cítrico no se disocia por completo sino que tiende al equilibrio, volviendo a la formación de la molécula en vez de la formación del ión. Además, este ácido posee un grupo carbonilo (CO) y otro hidroxilo (OH), por esta razón se le llama en química orgánica ácido tricarboxílico por poseer tres enlaces (COOH) de esta naturaleza. El ácido cítrico se encuentra en diferentes proporciones en plantas, animales y bacterias, ya que es un producto intermedio del metabolismo. En bioquímica aparece como una molécula intermediaria en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, proceso realizado por la mayoría de los seres vivos. A este proceso se le llama ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs, gracias al bioquímico británico H. Krebs, que descubrió esta descomposición en 1937 ^[27]. En la tabla 2.6 se presenta algunas propiedades físicas del ácido cítrico y en la figura 2.3 se observa su estructura química.

Tabla 2.6. Propiedades del ácido cítrico ^[27].

Propiedades fisico-químicas del ácido cítrico	
Peso molecular (g/mol)	192,12
Temperatura de ebullición (°C)	153
Solubilidad en agua a 20 °C (g/100ml)	169
Densidad (Kg./ m ³)	1,665×10 ³
Gravedad específica	1542
Constante de acidez 1	7,4x10 ⁻⁴
Constante de acidez 2	1,7x10 ⁻⁵
Constante de acidez 3	4,0x10 ⁻⁷

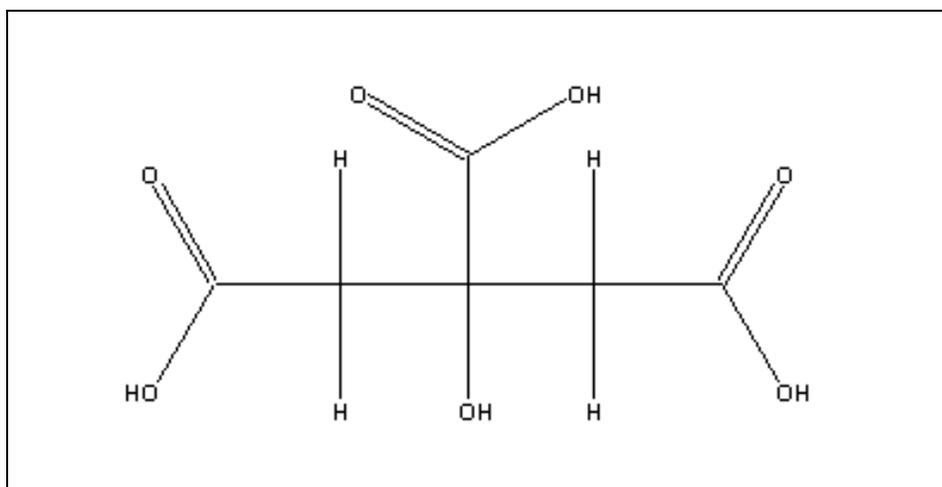


Figura 2.3. Estructura química del ácido cítrico ^[26].

El ácido cítrico tiene un doble efecto en la disolución de metales, suministra los iones hidrónios para favorecer la acidólisis del mineral y permite el acomplejamiento de los metales debido a su capacidad de formar quelatos. Estos quelatos resultan de la combinación de iones metálicos con la base del ácido orgánico, a través de las fuerzas electrostáticas entre los iones metálicos y los ligandos o quelatos en los orbitales de energía de los átomos. Su formación origina los ligandos polidentados o agentes quelatantes, que son cadenas de quelatos en una misma estructura. Los cuales dependiendo del grado de covalencia de los iones metálicos forman geometrías octaédricas o tetraédricas planas y confinan a los mismos al interior del agente quelatante. Estos quelatos pueden ser usados en la agricultura como fertilizantes, en la industria farmacéutica como cosméticos, en la industria química como antiespumantes, en la industria alimenticia en jugos y dulces y en la industria metalúrgica como agentes lixiviantes ^[27].

En la actualidad, el ácido cítrico se produce mediante fermentaciones fúngicas. Aunque es posible la síntesis química no se ha creado ningún proceso comercial basado en ella, que sea más eficaz que las fermentaciones. La producción de ácido cítrico se ha incrementado considerablemente en años recientes debido a su fácil biodegradabilidad. El

90% de la producción de ácido cítrico es realizada por la Unión Europea, Estados Unidos y China. Venezuela importa la totalidad del ácido cítrico que se consume ^[20]

Aunque se han seleccionado un gran número de bacterias, levaduras y hongos superiores para la producción de ácido cítrico, *Aspergillus niger* ha sido el organismo de elección por casi 80 años (Currie, 1917). Existe 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 sí el más representativo ^[22].

2.4.3.1 Tipos de fermentación

Existen tres técnicas básicas de procesos de fermentación para el ácido cítrico a nivel industrial:

- **Cultivo de *Penicillium* y *Aspergillus* estacionario o de superficie:** consiste en un medio estéril con azúcar que fluye en recipientes de acero inoxidable o de aluminio, arreglados en fila en cámaras de fermentación estériles, la mayoría de las cámaras controlan la temperatura, la humedad relativa y la circulación de aire. El medio se inocula con esporas de *A. niger* a una temperatura constante de 28–30 °C con una humedad relativa de 40–60 % durante 8-12 días. El organismo crece y se extiende sobre la superficie acidificando el medio.

Al final de la fermentación, seguida mediante la medición del pH del medio, el licor se drena y el ácido se cristaliza. El micelio puede reutilizarse adicionando medio nuevo. Este es el método más antiguo y, Aunque aún se utiliza, ha sido reemplazado en gran medida por los procesos sumergidos ^[20]. En la figura 2.4 se observa un esquema de un cultivo en superficie.

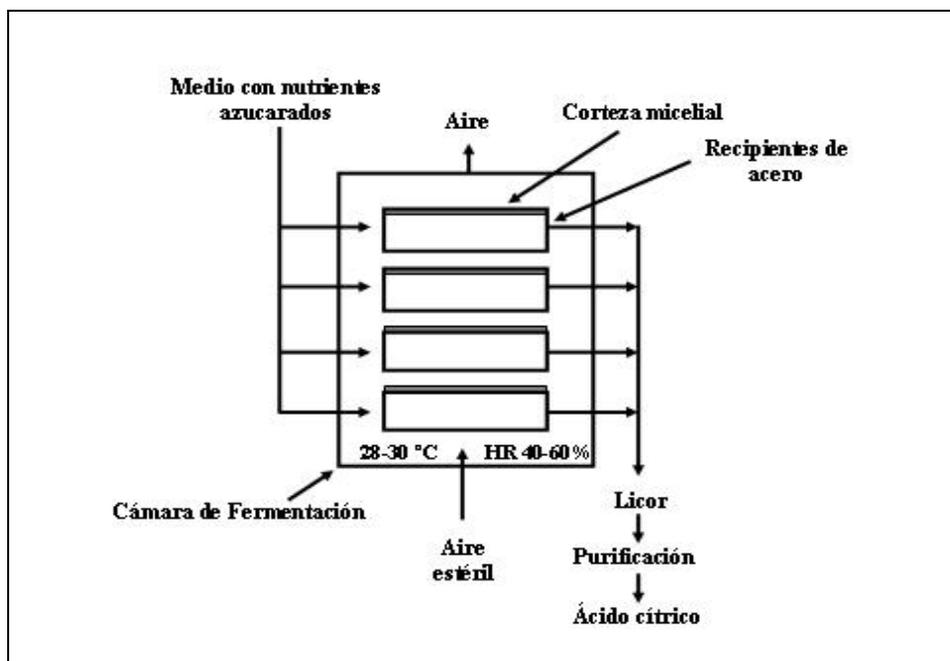


Figura 2.4 Cultivo de superficie de *Aspergillus niger* para la producción de ácido cítrico^[20].

- **Fermentación en estado sólido:** este proceso fue descrito inicialmente por Cahn en 1935, pero a pesar de su potencial no se ha empleado industrialmente a ningún grado importante debido a su laboriosidad. El medio de fermentación se impregna de materiales porosos como el bagazo de caña de azúcar, pulpa de papa o de remolacha, pulpa de piña, etc., en una proporción apropiada se esteriliza e inocula con una suspensión de esporas. La masa se incuba en recipientes a 25-30 °C durante 6-7 días y luego se extrae con agua, se concentra y se extrae el ácido cítrico^[20].
- **Proceso sumergido:** éste es el principal proceso en uso en el que se inocula el medio seguido por la agitación y aeración vigorosa y controlada en grandes fermentadores. El período de fermentación se reduce bastante (3-5 días) a 25-30 °C. Después, el licor se drena para la extracción del ácido cítrico y el micelio se puede reutilizar. Una modificación de este método tiene un proceso en dos etapas en los cuales inicialmente el medio se inocula primero con esporas, después de 3 o 4 días, el micelio se separa y

readiciona al medio de producción. Luego de 3 o 4 días más a 25-30 °C con oxigenación se extrae el ácido cítrico [20]. En la figura 2.5 se presenta un bosquejo de un cultivo sumergido.

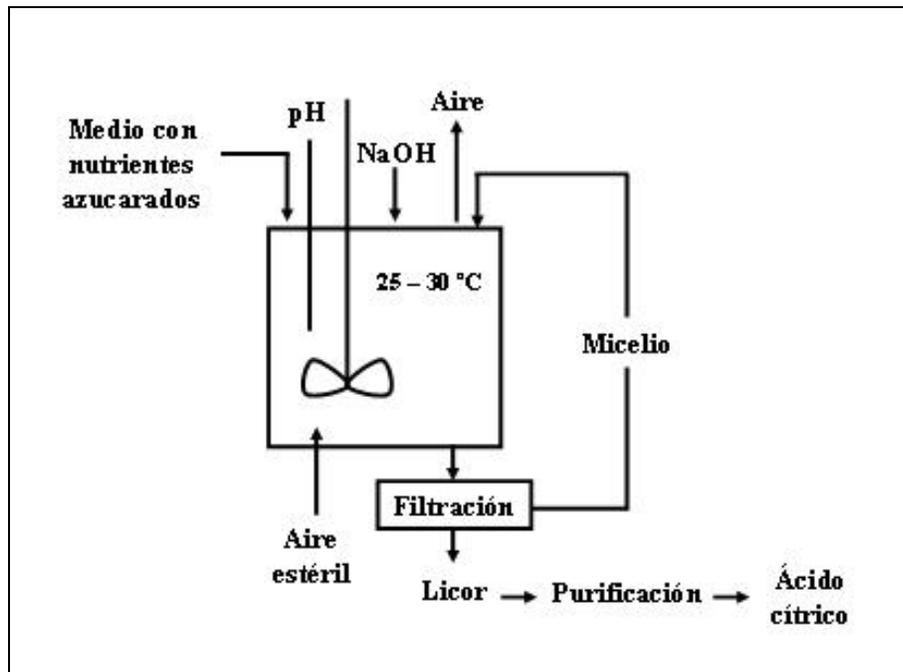


Figura 2.5 Cultivo sumergido de *Aspergillus niger* para la producción de ácido cítrico [20].

Los procesos sumergidos y de superficie son los más usados para la producción a gran escala y se deben emplear las condiciones apropiadas para la cepa fungal en particular empleada [20].

2.3.4.2 Condiciones de cultivo

La producción de ácido cítrico ocurre en medios sintéticos simples. En medios complejos a menudo, los rendimientos son bajos debido a la influencia de los metales y

otros componentes. Entre los factores que intervienen en los rendimientos de obtención en la producción de ácido cítrico están:

- **Fuente de carbono:** las condiciones de cultivo varían de cepa a cepa y es importante determinar el mejor sustrato puesto que las cepas que crecen eficientemente sobre una fuente de carbono con buena producción de ácido cítrico, a menudo no lo harán en otra ^[20]. Solamente aquellos azúcares que pueden ser asimilados por el hongo (glucosa, fructosa, sacarosa), permiten una producción alta de ácido cítrico. En la mayoría de los casos, la sacarosa o una fuente más económica de esta como lo es la melaza, constituyen las fuentes de carbono más empleadas ^[22].

Las melazas constituyen el licor residual que queda después de la cristalización de la sacarosa, pero una desventaja que todas ellas poseen es su alto contenido de cenizas que inhiben la producción de ácido cítrico. Frecuentemente la melaza se pretrata para remover metales pasándola a través de resinas de intercambio iónico. Puesto que la producción del ácido con *A. niger* necesita una etapa de crecimiento y otra etapa de producción, así como el balance de los distintos componentes del medio, en particular el nitrógeno, fósforo, azufre y varios elementos traza ya que tienen un pronunciado efecto sobre el rendimiento de la producción del ácido ^[20].

- **Elementos traza:** aunque *A. niger* requiere varios cationes divalentes para el crecimiento y la producción de ácido cítrico (Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , y Mg^{+2}), la concentración relativa de estos iones metálicos es probablemente el único factor importante que determina la producción de ácido cítrico. La concentración de estos iones metálicos varía ampliamente con diferentes cepas, por lo que es necesario ajustar la composición del medio para evitar los efectos inhibitorios generados cuando estos cationes se presentan en concentraciones tóxicas ^[22]. El Mg^{+2} se requiere para varias reacciones enzimáticas, la concentración óptima para obtener la máxima producción es de 0,02-0,025% ^[20].

Debido a la sensibilidad de la producción de ácido cítrico a la presencia de iones metálicos, esta última debe ser controlada cuidadosamente, en particular cuando se emplean sustratos complejos de composición variable mal definidos como las melazas. La eliminación completa de estos elementos es prácticamente imposible, sin embargo, es común usar dos aproximaciones. La primera es el pretratamiento del medio con productos químicos o resinas de intercambio iónico para reducir la concentración de los elementos de traza. La segunda es el desarrollo de cepas miceliales capaces de producir ácido cítrico en presencia de altas concentraciones de iones metálicos ^[20].

- **Aireación y agitación:** la fermentación del ácido cítrico es un proceso esencialmente aerobio y por lo tanto necesita una oxigenación apropiada. El grado de aireación y agitación depende del organismo, el tamaño del fermentador y el medio. En general se acepta que la demanda de oxígeno del cultivo es mayor que la rapidez de transferencia de masa de oxígeno hacia el medio de cultivo a partir de la fase gaseosa. El oxígeno se necesita no sólo para el crecimiento sino también para la excreción adecuada del ácido cítrico ^[20].

Así el régimen aireación-agitación ayuda a que la difusión del ácido cítrico se aleje de las paredes miceliales, donde la acumulación daría por resultado la inhibición de la producción. 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 bien establecido que para favorecer la síntesis de ácido cítrico, el crecimiento del hongo debe estar restringido ^[28].

- **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.

La etapa del crecimiento del hongo requiere un pH ligeramente mayor que la etapa de producción ^[20].

- **Inóculo:** el inóculo para la fermentación puede ser ya sea esporas o micelio. Si se usan esporas, se prepara una suspensión de esporas adicionando Tween 80 al 0,1% a un cultivo esporulante y se añade suficiente cantidad de esta suspensión al fermentador para dar una concentración inicial de 10^5 - 10^7 esporas/ml. Después de terminada la fermentación el micelio se puede reutilizar en lugar de reinocular con esporas. La edad de las esporas es importante puesto que las de más de 8 días de edad con frecuencia germinan pobremente, causando bajos rendimientos en la producción del ácido ^[20].

- **Viscosidad del medio:** la adición de sustancias viscosas al medio de fermentación en cultivos sumergidos, incrementa la producción del ácido, ya que las sustancias viscosas actúan protegiendo al micelio del daño fisiológico que se genera debido a la agitación y en consecuencia se produce un incremento significativo en la producción del ácido cítrico ^[29].

- **Aditivos:** algunos compuestos como el metanol y el etanol estimulan la producción del ácido cítrico mediante *A. Niger* en cultivos de superficie, sumergidos o estáticos. Cuando se añade metanol al medio de cultivo a una concentración de 3-4% antes de la inoculación, ocasiona un retardo en el crecimiento, retrasa la esporulación y aumenta el rendimiento de la producción. Se piensa que el metanol aumenta la tolerancia de los hongos hacia algunos iones metálicos e incrementa la permeabilidad del micelio para permitir la excreción del ácido cítrico ^[20].

2.3.4.3 Medios de cultivo

Mucho trabajo en microbiología depende de la capacidad de los microorganismos para crecer y mantenerse en las condiciones de laboratorio, ello sólo es posible si se poseen

medios de cultivos adecuados. Los cultivos son poblaciones microbianas crecidas bajo condiciones definidas en ambientes artificiales a nivel de laboratorio. Un cultivo puro es aquel donde solo se encuentra un microorganismo particular aislado (cepa) en la mayoría de los cultivos de microorganismos forman colonias discretas en medio sólido (agar). El crecimiento en medio sólido permite observar las características morfológicas de las colonias.

Desde el punto de vista de su composición los medios de cultivo pueden ser indefinidos, los cuales son muy ricos en nutrientes debido a que en su composición se utiliza hidrolizados de proteínas u otros compuestos orgánicos naturales que proveen fuentes de nitrógeno, aminoácidos y además también contienen uno o más carbohidratos que suministran energía y fuente de carbono, sales inorgánicas para satisfacer las necesidades de iones y también extracto de levadura, que satisfaga las posibles necesidades vitamínicas. La selección de un medio de cultivo particular dependerá del propósito que se persiga con un cultivo dado. En forma resumida, se puede decir, que los medios de cultivo son medios donde los microorganismos pueden crecer y mantenerse en condiciones de laboratorio. Deben cubrir todos los requerimientos nutricionales del microorganismo para la síntesis de su material celular y para la generación de energía. El diseño de un medio de cultivo debe basarse en los principios fisiológicos del microorganismo y el hábitat. Los macrocomponentes de un medio de cultivo son: una fuente de C y N, sales inorgánicas que proporcionan S, P, K, Ca, Mg y Fe ^[30]. Con el fin de obtener un medio complejo para una fermentación industrial se debe considerar los siguientes criterios ^[11]:

- Los requerimientos de nutrientes específicos.
- La composición exacta de los nutrientes industriales y las posibles modificaciones durante el almacenamiento.
- Las propiedades de los nutrientes en términos de almacenaje y manejo.
- Costo de los nutrientes.

Los microorganismos son extraordinariamente diversos con respecto a la clase y número de compuestos orgánicos que pueden usar como fuente principal de carbono y

energía, tanto que virtualmente no hay compuestos orgánicos que no pueda ser utilizado por algunos microorganismos. Entre ellos están la xilosa, la glucosa, la sacarosa, lactosa, maltosa, almidón, etanol, metanol, metano, dextrina y muchos otros.

El azúcar (sacarosa) es probablemente una de las materias primas más fácilmente fermentables, puesto que, tanto desde el punto de vista microbiológico como tecnológico, los problemas que involucra su uso son menores. En microbiología aplicada se tiene una vasta experiencia en lo que se refiere al crecimiento microbiano cuando se emplea azúcar como sustrato.

Por otra parte la gran mayoría de las especies empleadas y reconocidas como fuente de biomasa utilizan este hidrato de carbono con facilidad y rendimientos elevados. Los requerimientos de transferencia de oxígeno al fermentado y enfriamiento del cultivo son relativamente menores que los de otros sustratos. Sin embargo, el precio del azúcar en el mercado internacional hace que se incrementen los costos del proceso ^[30].

La sacarosa es el sustrato principal para la fermentación del ácido cítrico, pero se agrega principalmente como melazas ya sea a partir de remolacha o caña de azúcar. Además de azúcares, las melazas contienen un 30% de materia seca que consiste en compuestos nitrogenados que pueden ser de valor. Por su parte el almidón es una reserva importante de carbohidratos en las plantas y se usa puro o como un componente de las papas, trigo, avena, cebada, maíz y muchos otros ^[11].

Diversos tipos de desechos o subproductos industriales han sido utilizados en la producción de ácido cítrico por *A. niger*, tales como conchas de papa, suero de soya, desechos de naranja, borra de café, melaza, desechos de algodón y jugo de nepe entre muchos otros. Hasta ahora la melaza proveniente de la caña de azúcar se ha considerado como el mejor sustrato. A continuación se mencionan las características de algunos de los desechos o subproductos industriales utilizados ^[31]:

- **La melaza:** es un subproducto de la industria azucarera. Básicamente, es el licor residual que queda después de la cristalización de la sacarosa a partir del jarabe de caña concentrado y corresponde al azúcar que no se puede cristalizar debido a su gran riqueza salina. Es una excelente fuente de carbono ya que contiene carbohidratos solubilizados que aumentan la disponibilidad de nutrientes. Contiene hasta 70 % de azúcares, de los cuales 35-50% es sacarosa y el resto hexonas (glucosa, dextrosa, levulosa) ^[20].

La melaza es una fuente reconocida y utilizada en diversas fermentaciones (para producir alcohol, proteína microbiana y ácido cítrico, etc.). La composición química y las propiedades físicas de las melazas varían de acuerdo con: factores agrícolas, condiciones climatológicas durante el crecimiento de la caña y, principalmente, con las condiciones de procesamiento del jugo de caña durante la producción de azúcar. Así, puede ocurrir que distintas muestras de melazas producidas en el mismo ingenio y durante la misma época tengan composiciones químicas diferentes.

La composición promedio de las melazas se ve en la tabla 2.7; se observa que los azúcares totales se constituyen 70% del peso seco, aunque son los demás componentes y sus porcentajes en la composición los que hacen que determinadas melazas resulten mejores materias primas para el crecimiento microbiano ^[30].

- **Germen desgrasado de maíz:** es un subproducto generado luego del procesamiento del maíz para la obtención de aceite comestible, a través de un proceso de extracción por solvente. También es una fuente importante de carbohidratos principalmente almidón, que proporciona la fuente de carbono.

Se ha demostrado que es un medio óptimo para el crecimiento de diversos géneros fúngicos y además es económico y se produce en grandes cantidades al año ^[32]. El esquema de la obtención del germen desgrasado de maíz se presenta en la figura 2.6.

Tabla 2.7 Análisis de la melaza de caña de azúcar ^[30].

Porcentaje (%)	Mínimo	Máximo	Promedio
Humedad	16	23	19
Materia seca	77	84	81
Azúcar (como glucosa)	52	65	56
Nitrógeno total	0,4	1,5	0,7
Cenizas	7	11	9
Fósforo	0,6	2,0	0,9
Calcio	0,1	1,1	0,5
Magnesio	0,03	0,1	0,07
Potasio	2,6	5,0	3,6

- **Agua de maceración de maíz:** es un subproducto de la producción industrial de almidón de maíz. Se obtiene en el proceso de separación del germen de maíz del resto de los constituyentes del grano. Es una solución rica en fosfatos, nitratos. Constituye la fuente de nitrógeno ^[32].
- **Concentrín:** básicamente es el producto de la mezcla del germen desgrasado de maíz y el agua de maceración de maíz, que constituyen la fuente de carbono y nitrógeno. El esquema del proceso de obtención del concentrín se puede apreciar en la figura 2.7.

Es necesario mencionar que el grano de maíz se acondiciona en tanques de maceración donde es sumergido en agua durante 44 horas aproximadamente, a una temperatura entre 48-50 °C con dióxido de azufre para evitar su germinación, en este proceso se extraen del grano sus elementos solubles, minerales y proteínas que pasan al agua ^[32].



Figura. 2.6 Esquema del proceso de obtención del germen desgrasado de maíz ^[31]

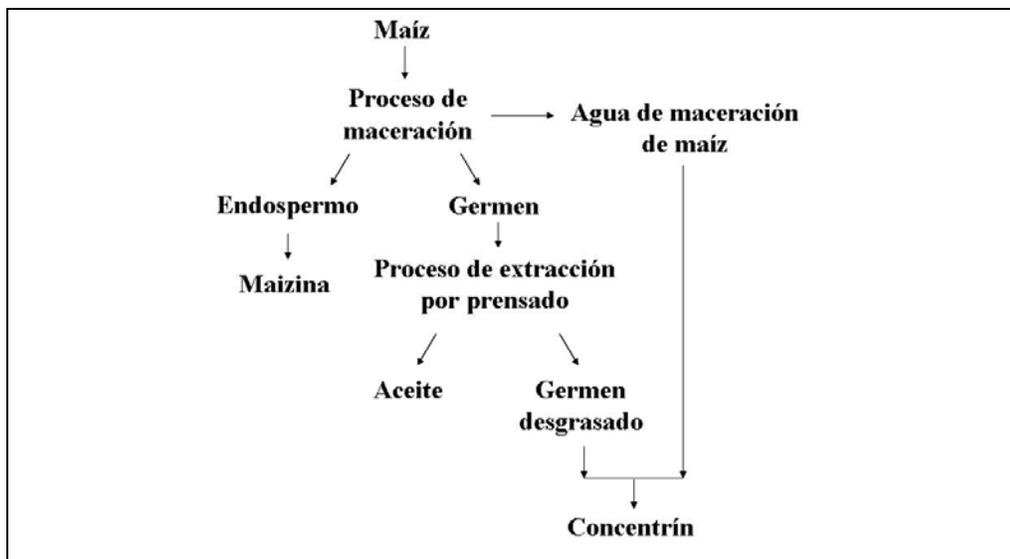


Figura 2.7 Esquema del proceso de obtención del concentrín ^[31].

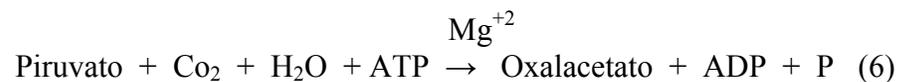
2.3.4.4 Procesos bioquímicos en la fermentación del ácido cítrico

El ácido cítrico es un intermediario estándar del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y se produce como un producto de exceso debido a una operación incorrecta del mismo. Dos

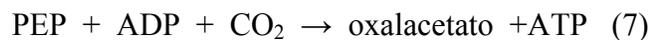
enzimas claves son importantes en la fermentación del ácido cítrico, la aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa.

Las actividades de estas enzimas disminuyen a niveles muy bajos durante la etapa de producción, en tanto que aumenta la actividad de la enzima citrato sintasa. Puesto que para la síntesis del ácido cítrico se necesita la condensación de una unidad de acetilo con oxalacetato, es necesario generar aceptor suficiente (oxalacetato) para que la producción continúe. Esto incluye cuatro mecanismos:

1. La carboxilación directa del piruvato catalizada por la enzima málica, esta reacción produce malato, el cual se oxida fácilmente a oxalacetato.
2. La carboxilación del piruvato catalizada por el piruvato carboxilasa según la siguiente reacción:



3. La carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) catalizada por la enzima PEP carboxinasa:



4. la vía del glioxalato que utiliza las enzimas clave isocitrato liasa y malato sintasa.

La aconitasa es una de las dos enzimas clave, ya que es sensible a los iones metálicos como el Fe^{+2} en altas concentraciones, la restricción de la actividad de esta enzima es la clave para tener éxito en la fermentación de ácido cítrico. Sin embargo, la producción de ácido cítrico y su excreción por las células son dos problemas completamente separados.

Así, es importante no solamente regular la actividad de las enzimas clave del ciclo de los ácidos tricarboxílicos por medio de los elementos de traza, sino también hacer permeables a las membranas para que la concentración intracelular de ácido cítrico permanezca baja, previniendo así la retroinhibición de su síntesis y facilitar la extracción del producto ^[20].

A continuación se presenta en la figura 2.8 el ciclo del ácido cítrico.

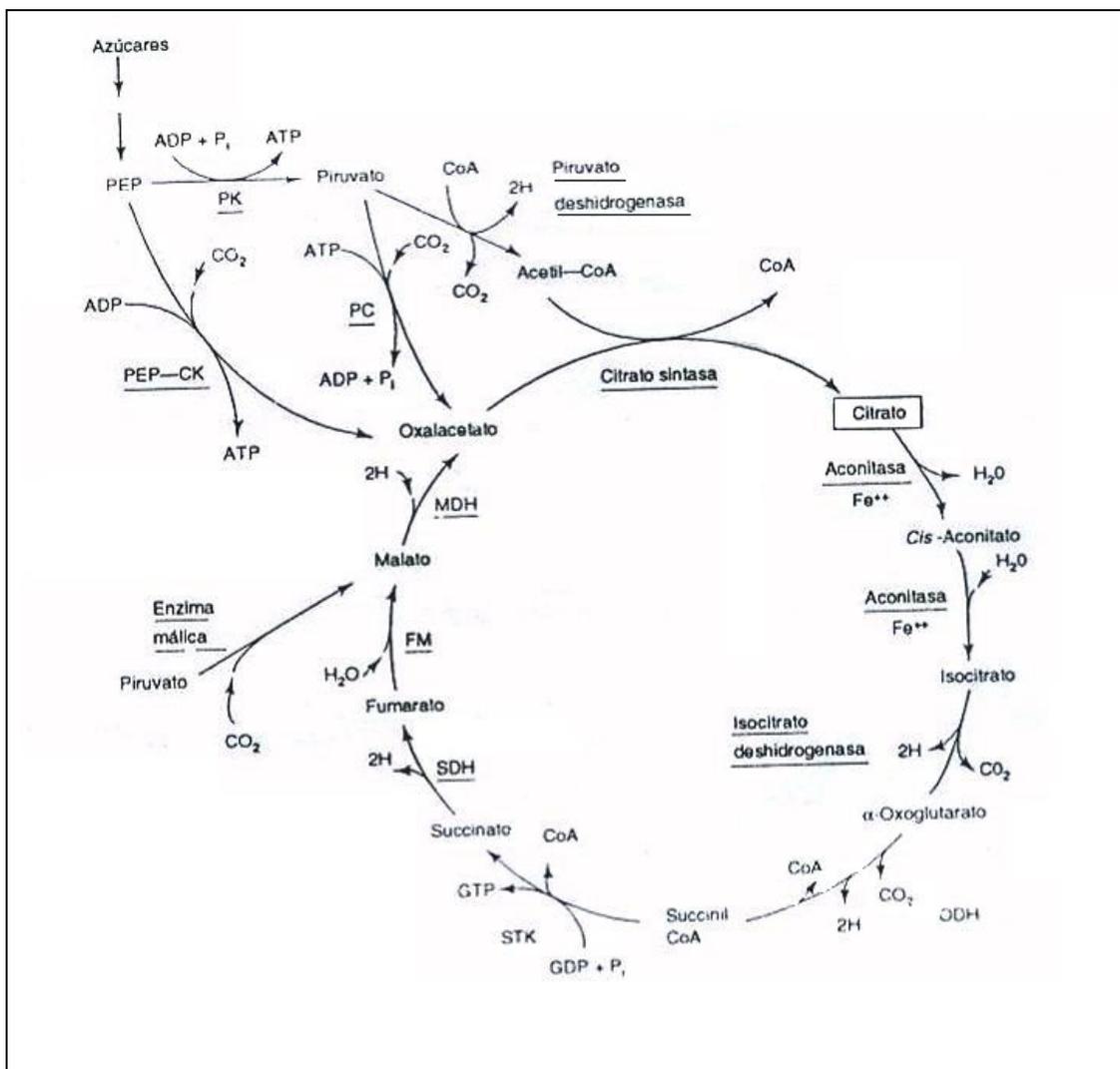


Figura 2.8 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos ^[20].

2.3.4.5 Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano se define como el aumento ordenado de todos los componentes bioquímicos de un organismo ^[32]. También se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo, lo cual, para los organismos unicelulares, conduce a un aumento en el número de individuos de la población. Se puede considerar el crecimiento a nivel de individuos dentro de una población (ciclo celular) o el crecimiento de poblaciones celulares (ciclo de crecimiento). El crecimiento de las poblaciones celulares se puede subdividir en sistemas cerrados, como el cultivo intermitente y en sistemas abiertos como el cultivo alimentado por lotes o el cultivo continuo ^[11].

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 ^[17].

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]. El crecimiento de las poblaciones de células microbianas puede medirse también mediante diversas técnicas como lo son el método del peso seco celular, absorción, peso húmedo, volumen de células empacadas, número de células, masa de un componente celular y mediciones físicas tales como la medición de la generación de calor ^[11]

2.3.4.6 Ciclo del crecimiento microbiano

Cuando un medio de crecimiento adecuado se inocula con células, tiene lugar una secuencia de eventos, esta característica es llamada ciclo de crecimiento. El ciclo de crecimiento se puede dividir en varias fases distintas ^[11]:

- **Fase de latencia:** inmediatamente después de la inoculación no es posible que ocurra crecimiento aparente durante algún tiempo. La duración de la fase de latencia es variable y depende de los antecedentes previos de crecimiento de las células. Representa un período de adaptación para el crecimiento en un medio nuevo y significa la síntesis de las enzimas requeridas para la evolución en este medio.
- **Fase exponencial o fase logarítmica:** frecuentemente se habla de ésta fase como la fase de “crecimiento equilibrado”, donde la síntesis de todos los constituyentes celulares aumenta a una rapidez constante, de modo que la población de células se duplica y continúa duplicándose a intervalos regulares y viene dada por la relación:

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

Donde μ_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 igual, concentración del inóculo), quedando:

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

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

Graficando $\ln x$ contra el tiempo, se tiene una recta de pendiente μ_m , cuya ordenada al origen es el logaritmo natural de la concentración del inóculo, tal como se aprecia en la figura 2.9. Ésta no es una verdadera fase de crecimiento equilibrado o estado estacionario, ya que los nutrientes son consumidos continuamente (la

concentración del sustrato varía con el tiempo) y los productos finales del metabolismo se acumulan. En consecuencia el medio cambia continuamente [2, 11].

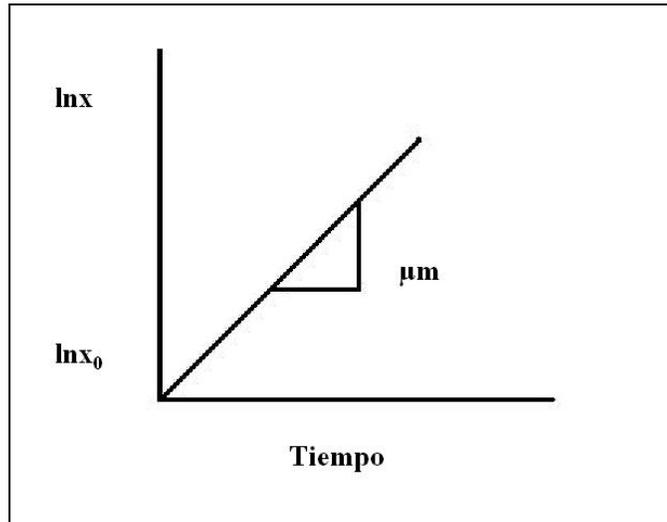


Figura 2.9 Regresión lineal durante la fase exponencial de crecimiento [17].

A partir de la ecuación (10) se puede calcular el tiempo de generación del microorganismo (t_g), que representa el período promedio de división celular, aunque pueden ocurrir excepciones en donde una fracción de la población de células no es viable.

Como el crecimiento microbiano unicelular es autocatalítico, se tiene que la velocidad de crecimiento es proporcional a la concentración de células ya presentes. Así cuando $x = 2x_0$, la ecuación (10) se transforma en [11]:

$$t_g = \ln 2 / \mu m \quad (11)$$

- **Fase estacionaria:** durante ésta fase no se observa ningún crecimiento neto. De hecho, el crecimiento puede estar ocurriendo, pero está equilibrado por la rapidez de muerte o lisis celular. Las células pueden permanecer viables por períodos largos en

esta fase con existencia de metabolismo endógeno, oxidación y almacenamiento de polímeros, proteínas, etc. Es común que la población entre en la fase estacionaria como resultado de la disminución de algún nutriente esencial, formación de productos tóxicos o de un cambio en medio físico.

- **Fase de muerte o declinación:** durante la fase estacionaria la rapidez de desaparición (muerte) puede volverse más alta que la rapidez de crecimiento, e cuyo caso disminuye la densidad de células. Esta fase esta caracterizada por la pérdida de viabilidad celular y la autólisis.

En la figura 2.10 se puede apreciar las distintas fases del ciclo de crecimiento microbiano.

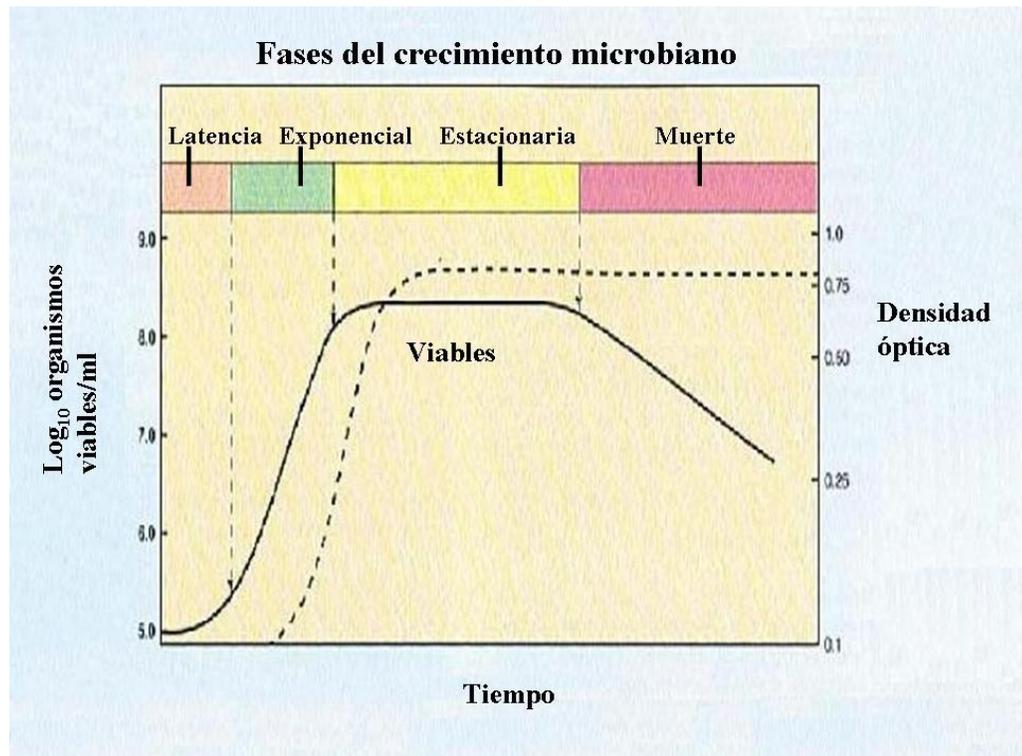


Figura 2.10 Curva de crecimiento típica para una población microbiana ^[11].

2.3.5 Biolixiviación de minerales oxidados

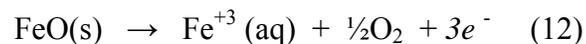
Los minerales oxidados como silicatos, carbonatos y fosfatos son lixiviados principalmente por microorganismos heterótrofos, los cuales excretan ácidos orgánicos que operan mediante dos mecanismos que pueden ocurrir simultáneamente o no.

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.

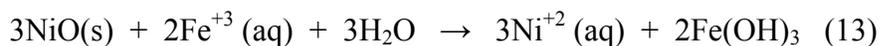
Posteriormente los ácidos orgánicos secuestran los metales a través de un mecanismo de quelación, formándose complejos solubles. Este mecanismo es aplicable tanto a minerales silicatos como no silicatos.

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 ^[17].

Algunos estudios 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 (Fe^{+3}) que bajo ciertas condiciones producen. Los microorganismos se ven en la necesidad de catalizar la oxidación de minerales ferrosos presentes ^[33]. La acción bacterial puede representarse por ^[34]:



El óxido de níquel reacciona directamente con iones férricos disueltos, producidos en la reacción (12), para solubilizar el níquel de acuerdo a ^[34]:



2.3.5.1 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. Dentro de ellos se destaca la especie *Aspergillus niger*, debido a su habilidad de excretar grandes cantidades de ácidos orgánicos. 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: $M^+ (\text{mineral})^-$ es el mineral inicial, $H^+ (\text{mineral})^-$ es el mineral desgastado, Me^+ es el catión en solución.

Desde hace 30 años, se comenzó 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 ^[17].

2.3.5.2 Métodos de biolixiviación

Existen dos métodos que se pueden emplear en la biolixiviación de minerales: el método directo y el método indirecto. En el mecanismo indirecto, el microorganismo actúa a través de las sustancias producidas en su propio metabolismo. Consiste en la obtención de ácidos orgánicos a través del crecimiento del microorganismo en el sustrato libre de mineral. Posteriormente los ácidos orgánicos obtenidos (libres de células) se utilizan como

agente lixivante. 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.

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 la acción enzimática ^[17].

2.3.5.3. Influencia de los factores ambientales

Es bien conocido que 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. Entre algunos factores ambientales se tiene ^[2]:

- **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.

La fuente carbonada sobre la cual se desarrollan los microorganismos influye decisivamente en el tipo de ácido a producirse. Un ejemplo de lo anterior es que ciertos estudios 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 ^[2].

- **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) [2].

- **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. Esto depende de la cepa y del mineral a tratar [2]. En 1986 se 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 [35]. 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.

- **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. 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 [2].

- **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 la recuperación del metal. 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 y así influir negativamente en la disolución de los metales. 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 ^[17].

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 ^[35].

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Mineral

El mineral es proveniente del área de Tinaquillo estado Cojedes. En esta zona se observa un enriquecimiento de níquel en lateritas producidas a partir de rocas ultrabásicas. El depósito de Tinaquillo es una masa que aflora al este de la población homónima y está compuesta principalmente de peridotita, serpentinita y metagabro en contacto con diques ácidos, cuarcitas metamorfozadas y bandas de piroxinita y anfibolita. Se aprecia en esta área: material laterítico arrastrado, material laterítico *in situ* con drenaje pobre, material laterítico *in situ* con buen drenaje, y serpentinitas ^[1].

3.1.1 Recolección de muestras

Se extrajeron muestras de mineral de diferentes sitios y alturas del depósito para ser analizadas y elaborar un mapa de la composición del mismo. El yacimiento está clasificado en dos frentes: Damica y Arnesen. Las muestras fueron recolectadas del frente Damica, el cual a su vez presenta tres niveles. Al nivel más bajo, se le denominó cota 0, al nivel intermedio cota 1, y 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 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.

Se recolectaron muestras de cada uno de los niveles del frente Damica ya que de allí se puede obtener una muestra representativa del depósito, además de ser las zonas más grandes del depósito, tienen un buen contenido de níquel. La toma de muestras se realizó removiendo 10 cm. aproximadamente de la capa superficial del depósito, se extrajo mineral suficiente para la realización de los ensayos.

La apariencia del depósito se puede apreciar en la figura 3.1 a continuación:



Figura 3.1 Vista de los tres niveles del frente Damica del depósito. A la izquierda se puede ver el nivel de mayor cota y a la derecha la laguna que marca el nivel de la cota 0.

3.1.2 Caracterización del mineral

Consistió en la caracterización de las lateritas a través de los siguientes aspectos: visual, análisis químico cuantitativo y análisis por difracción de rayos X, para determinar el contenido de los metales de interés y de las fases presentes, esto permitió establecer la factibilidad y las rutas o criterios posibles del proceso de extracción. Este estudio fue realizado detalladamente por Betancourt y Vivas ^[36].

3.1.2.1 Homogenización

Se tomaron cantidades iguales de muestra de cada cota y se prepara una especie de torta con cada una, 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.

Posteriormente se procedió a mezclar todas las muestras de las distintas cotas para obtener una muestra “todo en uno”, debido a que estas no poseen la misma composición, y

se homogenizó de la misma forma. Con este compósito se realizaron los ensayos de biolixiviación, ya que el “todo en uno” es una muestra representativa del depósito.

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, 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 ^[36] 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 g. 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 espectrofotometría de absorción atómica (Atomic

Absorption Spectrophotometry AAS). Se uso el equipo Analyst 300 de la casa PEKÍN ELMER, y para el análisis de cada elemento se empleo la lámpara de cátodo hueco de dicho elemento.

3.1.2.4 Difracción de rayos X

La técnica de caracterización por difracción de rayos X permite determinar las fases en que se presentan los elementos de interés y la estructura general del mineral, esto nos suministra una información muy importante a pesar de la limitación que tiene esta técnica, la cual no es capaz de captar fases de de bajas concentraciones sobre todo menor al 5% en peso, ya que el espectro de las demás crea una interferencia que solapa a la especie de menor concentración.

La preparación de las muestras para dichos ensayos consistió en una reducción de tamaño por molienda para llevarlos a una granulometría fina. El difractómetro usado es modelo D8 ADVANCE, de la casa SIEMENS bajo el nombre de la marca Broker AXS Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: para el cátodo de cobre, con su respectiva longitud de onda, en 40Kv y 30mA; para el goniómetro, la velocidad de barrido de ángulo en 1,5°/min., realizando la medición para cada 0,1°.

3.1.3 Preparación física del mineral para ensayos

3.1.3.1 Reducción de tamaño

El mineral se caracteriza por ser deleznable y por presentar una gran cantidad de partículas finas, sin embargo, por la presencia de terrones formados por la aglomeración de estos finos, fue necesario emplear un proceso de reducción de tamaño en dos etapas: trituración y molienda.

La trituración se llevó a cabo con una trituradora de mandíbula y una trituradora de doble rodillo para reducir los terrones de mayor tamaño, y posteriormente se realizó una molienda en seco, esta fue realizada con molino de barras y/o molino de bolas. Las cargas de bolas empleada fue de 12 Kg. para moler 0,7 Kg. de mineral, y para el molino de barra la carga fue de 6 Kg. para moler 0,4 Kg. de mineral y el tiempo de permanencia fue de 2 horas y 15 minutos (según Betancourt y Vivas ^[36]) para obtener 100% pasante malla 200. Las curvas de molienda, así como, la clasificación granulométrica fueron realizadas por Betancourt y Vivas ^[36].



Figura 3.2 Molino de barras y molino de bolas con sus respectivos cuerpos moledores.

3.1.3.2 Tamizaje

Para el tamizaje o clasificación granulométrica del mineral molido, tal cual como sale del proceso de molienda, se empleo el método de tamizaje en seco, el equipo empleado fue una maquina vibratoria Ro-Tap y una serie de tamices ASTM.

El mineral empleado para los ensayos de biolixiviación fue 100% pasante malla 200, ya que esta granulometría fue la empleada por Castillo y Villafañe ^[2] y Rangel C. ^[27] en sus estudios de biolixiviación y lixiviación dinámica, respectivamente, con laterita del

estado Cojedes, este tamaño de partícula garantiza un mayor contacto entre las partículas de mineral y la solución lixivante y un alto grado de liberación.

3.2 Microorganismo

Para este trabajo se escogió el hongo *Aspergillus niger*, que se utiliza en la producción industrial de ácido cítrico y para la biolixiviación de níquel y otros metales pesados como cobalto cobre y zinc ^[37, 38,39,40,41].

Se utilizó el aislado ATCC 1015, incluido en el cepario del Laboratorio de Procesos Fermentativos del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Universidad Central de Venezuela, inicialmente suministrado por “American Type Culture Colection” (ATCC), que fue empleado por su capacidad en la producción de ácido cítrico a partir de jugo de nepe ^[22].

3.2.1 Medios de cultivo

3.2.1.1 Agar nutritivo dextrosa papa (ANDP)

Es un medio de cultivo para fines de mantenimiento de la cepa y obtención de esporas. Se escogió este medio, porque favorece la esporulación de hongos filamentosos como los del género *Aspergillus* y permite conservar aislados de microorganismos hasta por 3 meses en refrigeración (4° C).

Este medio se prepara a partir de una infusión de papa obtenida mediante ebullición durante 15 minutos de 200 g de papa por litro de agua destilada. Para la preparación de un litro de medio se toman 500 ml de la infusión y se suplementa con 20 g de D(+) glucosa y 23 g de agar nutritivo y se complementa con 500 ml de agua destilada y se calienta con

agitación constante hasta que las partículas de agar se disuelvan en la solución. Se esteriliza en una autoclave a 18 psi y 121° C por 15 min. y se deja enfriar. El ANDP en estado líquido se puede servir en cápsulas de petri para obtener placas o en tubos de ensayos con tapa roscada para obtener cuñas inclinadas, todo esto se debe realizar bajo un ambiente de esterilidad, para ello se utiliza una campana de flujo ascendente y un mechero.



(a)



(b)

Figura 3.3 (a) Placas de ANDP: a la izquierda observamos el aspecto de *A. niger* a los 7 días de crecimiento y a la derecha una placa que no ha sido sembrada. (b) *A. niger* cultivado en cuñas inclinadas de ANDP.

Para los inóculos fueron usadas matraces erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml de ANDP las cuales tomamos como matrices.

3.2.1.2 Cultivo sumergido para biolixiviación: diseño y optimización.

Para optimizar la producción de ácido cítrico y demás metabolitos que intervienen en el proceso de lixiviación, los diferentes sustratos seleccionados para este estudio, y las sales inorgánicas se combinaron en un diseño multifactorial. En la figura 3.4 se pueden observar los subproductos de la producción industrial de aceite y almidón de maíz (figura 3.4 a, b, c) y la melaza utilizados como sustratos.

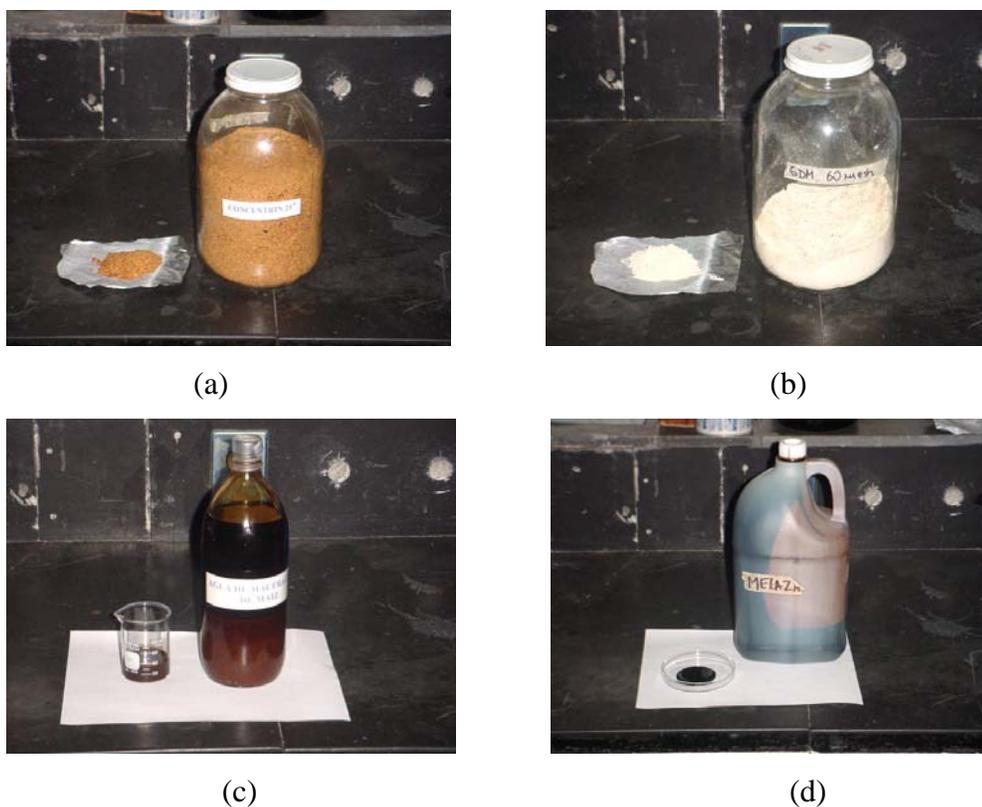


Figura 3.4 Subproductos agroindustriales empleados como sustratos fermentables:(a) Concentrín 21, (b) Germen desgrasado de maíz, (c) Agua de maceración de maíz, (d) Melaza de caña de azúcar.

Las cantidades se variaron en un rango similar al observado en los componentes de los distintos medios utilizados en la biolixiviación de níquel con *A. niger*. La combinación de estos factores en el diseño multifactorial se muestra en la tabla 3.1

- Melaza: 15-30 g/L
- AMM: 5-20 g/L de sólidos presentes en suspensión (45%)
- GDM y CONCENTRIN 21: 20-40 g/L
- KH_2PO_4 : 1-0,25
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1-0,5
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0,05-0,2

Tabla 3.1. Diseño multifactorial fraccionado en 8 bloques con 7 factores a dos niveles (2^7). Experimentos por bloque: 9. todas las concentraciones vienen dadas en g./L.

n°	Bloque	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7
		Melaza	AMM	GDM	Concentrin21	KH_2PO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
1	1	15	20	40	40	1	0,1	0,2
2	1	30	5	40	40	0,25	0,5	0,2
3	1	15	5	20	20	0,25	0,1	0,2
4	1	30	5	40	20	1	0,1	0,05
5	1	22,5	12,5	30	30	0,625	0,3	0,125
6	1	30	20	20	40	0,25	0,1	0,05
7	1	15	5	20	40	1	0,5	0,05
8	1	30	20	20	20	1	0,5	0,2
9	1	15	20	40	20	0,25	0,5	0,05
10	2	22,5	12,5	30	30	0,625	0,3	0,125
11	2	15	5	40	20	0,25	0,1	0,05
12	2	30	20	40	20	1	0,5	0,05
13	2	30	5	20	40	0,25	0,5	0,05
14	2	30	20	40	40	0,25	0,1	0,2
15	2	15	20	20	40	1	0,1	0,05
16	2	15	20	20	20	0,25	0,5	0,2
17	2	30	5	20	20	1	0,1	0,2
18	2	15	5	40	40	1	0,5	0,2
19	3	15	5	20	40	0,25	0,5	0,2
20	3	22,5	12,5	30	30	0,625	0,3	0,125
21	3	15	5	20	20	1	0,1	0,05
22	3	30	20	20	40	1	0,1	0,2
23	3	30	5	40	20	0,25	0,1	0,2
24	3	30	20	20	20	0,25	0,5	0,05
25	3	15	20	40	40	0,25	0,1	0,05

26	3	15	20	40	20	1	0,5	0,2
27	3	30	5	40	40	1	0,5	0,05
28	4	30	5	20	20	0,25	0,1	0,05
29	4	15	20	20	40	0,25	0,1	0,2
30	4	22,5	12,5	30	30	0,625	0,3	0,125
31	4	30	20	40	20	0,25	0,5	0,2
32	4	30	20	40	40	1	0,1	0,05
33	4	30	5	20	40	1	0,5	0,2
34	4	15	5	40	40	0,25	0,5	0,05
35	4	15	5	40	20	1	0,1	0,2
36	4	15	20	20	20	1	0,5	0,05
37	5	30	20	20	20	1	0,1	0,05
38	5	22,5	12,5	30	30	0,625	0,3	0,125
39	5	15	5	20	20	0,25	0,5	0,05
40	5	30	5	40	40	0,25	0,1	0,05
41	5	15	20	40	20	0,25	0,1	0,2
42	5	30	5	40	20	1	0,5	0,2
43	5	30	20	20	40	0,25	0,5	0,2
44	5	15	20	40	40	1	0,5	0,05
45	5	15	5	20	40	1	0,1	0,2
46	6	30	20	40	20	1	0,1	0,2
47	6	15	5	40	40	1	0,1	0,05
48	6	15	20	20	40	1	0,5	0,2
49	6	22,5	12,5	30	30	0,625	0,3	0,125
50	6	15	5	40	20	0,25	0,5	0,2
51	6	30	20	40	40	0,25	0,5	0,05
52	6	30	5	20	20	1	0,5	0,05
53	6	15	20	20	20	0,25	0,1	0,05
54	6	30	5	20	40	0,25	0,1	0,2
55	7	30	20	20	20	0,25	0,1	0,2
56	7	15	20	40	40	0,25	0,5	0,2
57	7	15	5	20	20	1	0,5	0,2
58	7	22,5	12,5	30	30	0,625	0,3	0,125
59	7	30	5	40	20	0,25	0,5	0,05
60	7	30	20	20	40	1	0,5	0,05
61	7	15	5	20	40	0,25	0,1	0,05
62	7	30	5	40	40	1	0,1	0,2
63	7	15	20	40	20	1	0,1	0,05
64	8	30	20	40	20	0,25	0,1	0,05
65	8	15	5	40	20	1	0,5	0,05
66	8	30	5	20	20	0,25	0,5	0,2
67	8	15	20	20	40	0,25	0,5	0,05
68	8	22,5	12,5	30	30	0,625	0,3	0,125
69	8	30	5	20	40	1	0,1	0,05
70	8	15	20	20	20	1	0,1	0,2
71	8	15	5	40	40	0,25	0,1	0,2
72	8	30	20	40	40	1	0,5	0,2

Los factores son las variables independientes y las variables dependientes son: la acidez titulable y los porcentajes recuperación de níquel, cobalto y hierro. Estos últimos valores se obtienen de la lixiviación con la solución sobrenadante obtenida de cada medio

La preparación de los medios de cultivo según el diseño multifactorial se llevo a cabo en 8 bloques de 9 experimentos cada uno. Los experimentos en la primera etapa consistían: en preparación de los medios, ajuste de pH, esterilización, inoculación e incubación.

Los medios se prepararon en matraces de 500 ml de capacidad con volúmenes de trabajo de 100 ml, el pH se ajustó a 5 con hidróxido de potasio concentrado (KOH conc.) y se esterilizaron en un autoclave a 121° C y 18 psi por 15 minutos, posteriormente fueron inoculados con 5×10^5 esporas por mililitro^[22].

Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente ($26 \pm 1^\circ$ C) en un agitador orbital New Brunswick Scientific modelo G27 a 120 rpm por 7 días, al final de este periodo el contenido de los matraces fue filtrado y el sobrenadante obtenido de cada una fue titulado, esterilizado y posteriormente, en la segunda parte del experimento, se utilizado como agente lixivante en un proceso dinámico a temperatura ambiente, las recuperaciones de níquel, cobalto y hierro fueron determinadas por AAS para tiempos de lixiviación de 6 y 18 horas, con estos datos junto con la acidez titulable se completo la matriz y se obtuvieron los resultados del diseño.

3.2.2 Preparación de los inóculos

Las suspensiones de esporas para los inóculos fueron preparadas a partir de cultivos esporulados de 7 días cultivados en matrices de ANDP, la resuspensión de las esporas se hizo con Tween 80 al 0,5% estéril y agitación magnética. La concentración de esporas en la suspensión fue determinada mediante el uso de una cámara de Neubauer observada a través de y un microscopio óptico a una magnificación de 400X. Posteriormente se toma una

alícuota de la suspensión con una micropipeta y puntas estériles que contenga la cantidad de 5×10^5 esporas/ml de medio requeridas para la inoculación.



(a)



(b)



(c)

Figura 3.4 (a) Matriz de *Aspergillus niger* en ANPD, (b) suspensión de esporas para la inoculación, (c) inoculación de los medios con la suspensión de esporas.

3.2.3 Estudio de la cinética de crecimiento de *A. niger* en el medio de cultivo optimizado.

Experimentos con el medio optimizado mediante el diseño multifactorial fueron llevados a cabo en matraces de 250 ml de capacidad y 50 ml de medio con la finalidad de cuantificar el crecimiento micelial, la variación de pH, acidez titulable y concentración de ácido cítrico y oxálico del medio a través del tiempo. Los experimentos se realizaron por duplicado y un matraz fue procesado por día.

3.2.3.1 Determinación del crecimiento micelial: biomasa

Método de Ride y Drysdale

Debido a la presencia de sólidos en suspensión en el medio de cultivo, se 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). 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. La hidrólisis se basa en el tratamiento de la muestra con una solución alcalina concentrada a alta temperatura que causa una despolimerización parcial y deacetilación para rendir compuestos denominados quitosanos.

Luego, para la determinación de la glucosamina se procede a la desaminación de las hexosaminas con ácido nitroso. Empleando 3-Methyl-2 Benzothiazolone Hidrazone (MBTH) se forma un complejo coloreado con las anhidrohexosas (producto de la desaminación) en presencia de iones Fe^{+3} , de tonalidad azul, que puede ser cuantificado

espectrofotométricamente en el máximo de absorción, en una longitud de onda de 650 nm [42].

Metodología de la medida de glucosamina.

➤ 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 la solución de KOH conc. a 130 °C durante 1 hora con agitación frecuente (cada 10-15 min.). Se enfría en baño de agua-hielo, luego se agrega 5 ml de la solución de etanol al 75% a 4 °C, 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 la suspensión de celite en la superficie y se centrifuga (6000 rpm, 10 minutos, 2°C), se descarta el sobrenadante y el residuo se lava con 5 ml de etanol al 40% a 4 °C, y se centrifuga nuevamente (6000 rpm, 10 minutos, 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) NaNO₂ al 5 % p/v (2 g en 40 ml)
- b) KHSO₄ al 5 % p/v (2 g en 40 ml)

- c) $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ al 12,5% (1,88 g en 15 ml)
- d) MBTH al 0,5 % (75 mg en 15 ml, preparar diariamente)
- e) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 0,83 % (124 mg en 15 ml)

Técnica:

Al residuo de la hidrólisis alcalina (1,5 ml) y los patrones de glucosamina (1,5 ml), se le añaden 1,5 ml de NaNO_2 al 5% más 1,5 ml de KHSO_4 al 5 %. Agitar durante 15 minutos y centrifugar (6000 rpm, 10 minutos, 2°C). Luego se toman 1,5 ml de sobrenadante y se agregan 0,5 ml de las soluciones de $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ al 12,5% y MBTH al 0,5 %, se hierve la mezcla por 5 minutos, se deja enfriar, posteriormente se agrega 0,5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 0,83%. Por último se deja reposar 30 minutos y se mide la densidad óptica a 650 nm en un espectrofotómetro de UV visible.

3.2.3.2 Determinación del pH y la acidez titulable de los cultivos sumergidos

Al sobrenadante obtenido por filtración al vacío con papel Whatman N°1 del contenido de cada matraz se le determinó el pH y la acidez titulable, con un pHmetro marca Corning modelo 7, y un electrodo de vidrio.

La acidez titulable es más útil que el pH para determinar la cantidad de ácidos cítrico, ya que este último solo mide la concentración de iones hidrogeno y los ácidos orgánicos no se ionizan completamente debido a que son ácidos débiles ^[22].

Para tal efecto se utilizó NaOH 0,1 N para valorar una alícuota de 5 ml de sobrenadante diluido en 20 ml de agua destilada, se tomó como punto de equivalencia el valor de pH de 8,1 (tomado de Castillo y Villafañe^[2]), debido a que la coloración de la solución no permite observar el viraje de un indicador.

Debido a que la especificidad con respecto al ácido cítrico es sumamente baja los resultados obtenidos a partir de este método fueron reportadas como normalidad o acidez titulable (n° equivalentes/L).

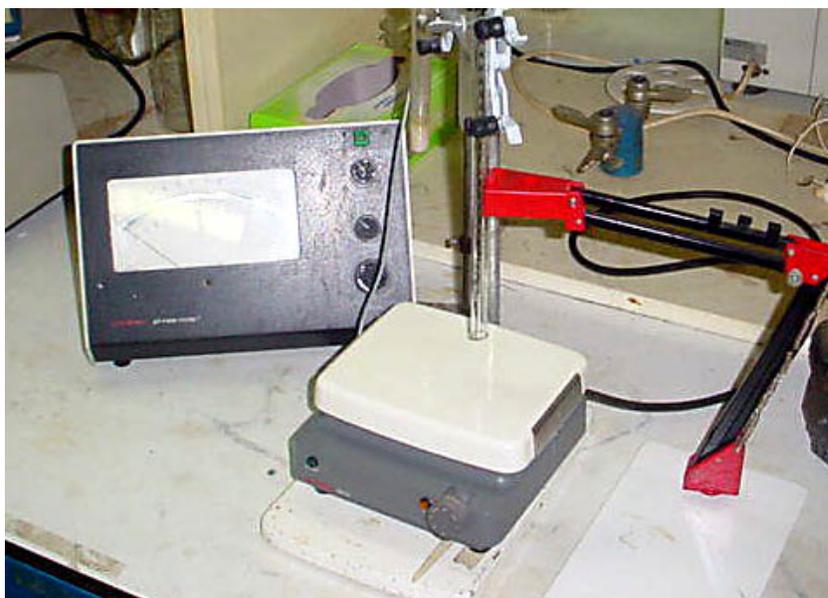


Figura 3.5 Equipo empleado para la determinación de pH y acidez titulable.

3.2.3.3 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 U.C.V, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (High-Pressure Liquid Chromatography 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 de bajo peso molecular) 300x7.8mm.
- Longitud de onda: 213 nm.

3.3 Biolixiviación

3.3.1 Biolixiviación Indirecta

El método de biolixiviación indirecta utiliza con agente lixivante la solución sobrenadante obtenida del crecimiento celular del hongo en el medio optimizado luego de completado el proceso de fermentación o periodo de incubación.

3.3.1.1 Obtención de solución sobrenadante para lixiviar

Para la obtención de solución sobrenadante, el hongo fue cultivado semanalmente en el medio de cultivo optimizado en matraces de 1000 ml de capacidad y 250 ml de medio e inoculado con 5×10^5 esporas por ml, previamente esterilizados en autoclave (121° C, 18psi, 15 min.).

Luego del tiempo establecido de incubación, que fue de 7 días el contenido de los matraces fue filtrado al vacío, al sobrenadante obtenido se le midió el pH y se tituló, posteriormente fue esterilizado y conservado en botellas de vidrio de un litro, a una temperatura de 0 °C hasta el momento de su utilización.

Una vez obtenida la suficiente cantidad de solución sobrenadante para la realización de los ensayos, el contenido de las botellas fue descongelado y homogenizado para su utilización.

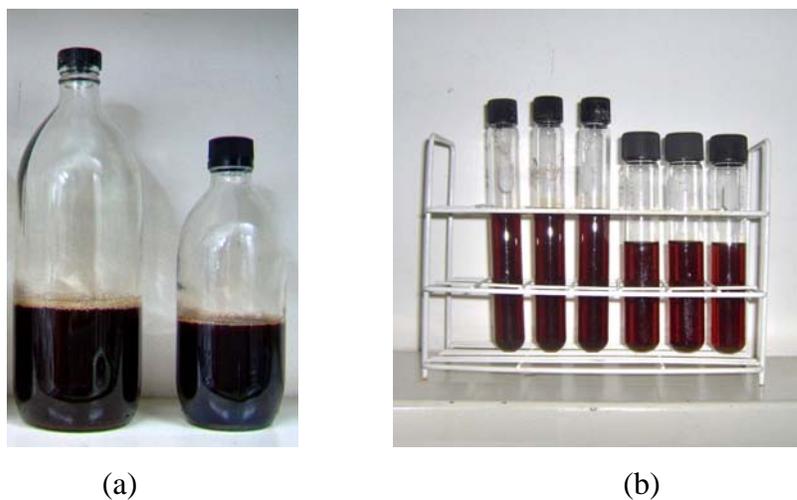


Figura 3.6 Aspecto de las soluciones sobrenadantes. (a) Conservados en botellas de 1000 y 500 ml, (b) En tubos de ensayo.

3.3.1.2 Estudio de la cinética de biolixiviación indirecta a temperatura ambiente

La biolixiviación indirecta fue realizada en matraces erlenmeyer de 250 ml de capacidad y un volumen de trabajo de 30 ml a una densidad de pulpa de 5%, el mineral y la solución sobrenadante fueron esterilizados previamente por separado y luego mezclados bajo ambiente de esterilidad. Los matraces se mantuvieron en agitación constante en un agitador orbital a 120 rpm. El contenido de un matraz fue procesado por semana, separando el licor del mineral por filtración al vacío y la recuperación de metales fue determinada por AAS.

3.3.1.3 Estudio de banco de prueba

Es un estudio de la recirculación tanto del licor como de la pulpa densa como se haría en un proceso industrial de lixiviación, esto nos permite conocer como afecta esto en la recuperación de los metales y en la obtención de soluciones más cargadas.

Para la realización de este estudio se utilizó el diseño propuesto por Rangel ^[27] que se muestra a continuación en la figura 3.6 donde L0, L1, L2, L3 representa el licor y las veces que ha sido utilizado para lixiviar y M0, M1, M2, M3 representa la pulpa y el número de veces que han sido lixiviada. Las lixiviaciones se realizaron con un volumen de trabajo de 200 ml y densidad de pulpa de 5 % p/v, el tiempo de lixiviación fue de 2 horas con agitador magnético y la separación de la pulpa densa del licor se llevó a cabo por centrifugación a 2000 rpm por 5 min.

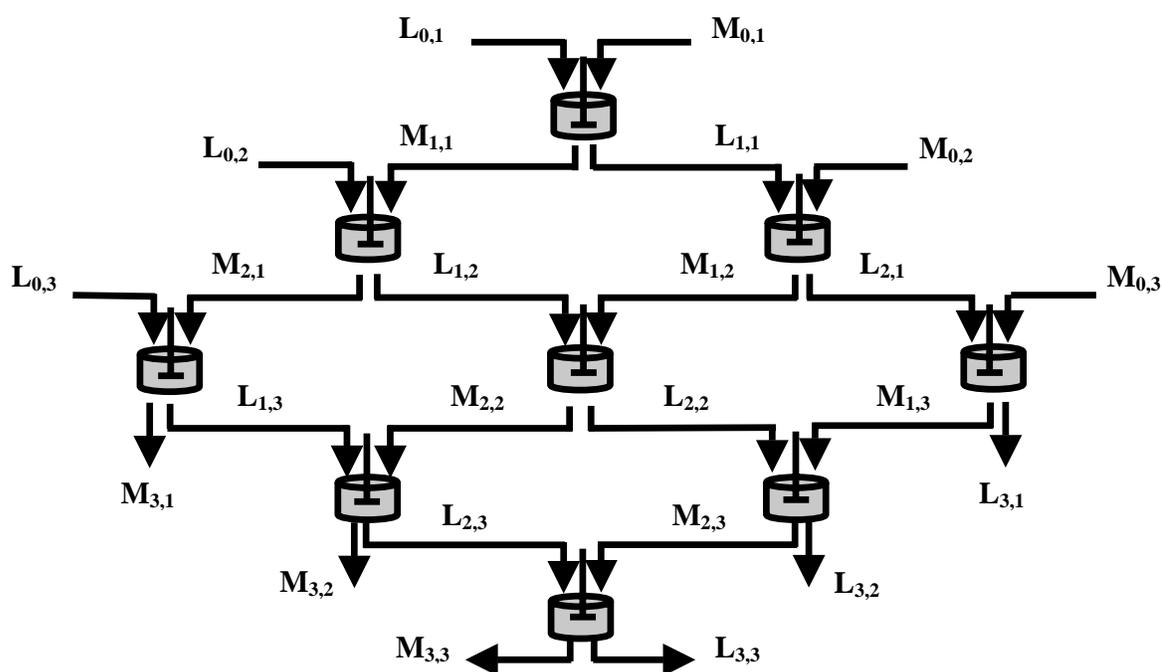


Figura 3.6 Flujograma del banco de pruebas propuesto por Rangel ^[27].

3.3.1.4 Cinética de lixiviación a altas temperaturas

Para estudiar la influencia de la temperatura en la lixiviación indirecta se realizaron ensayos de lixiviación a 80° C y a 60° C y a temperatura ambiente según lo encontrado en el trabajo de Rangel ^[27] de lixiviación de níquel con ácidos orgánicos.

Las lixiviaciones se realizaron en matraces de 500 ml con un volumen de trabajo de 150 ml calentadas sobre una plancha calentadora con agitación magnética, el tiempo de los ensayos fue de 4 horas. Alícuotas de 25 ml fueron tomadas a intervalos de 60 minutos, filtradas y analizadas por absorción atómica.

3.3.2 Biolixiviación Directa

Se realizó en matraces erlenmeyers de 500 ml con un volumen de trabajo de 100 ml de medio. A los medios de cultivo se le agregó 5 gramos de mineral 100% pasante malla 200 y fueron inoculados con 5×10^5 esporas por mililitro, previa esterilización. Estos cultivos fueron incubados en un agitador orbital a 120 rpm. Se estudio la cinética de lixiviación en función del tiempo, para lo cual, se filtró el contenido de un matraz erlenmeyer por semana obteniendo un licor cargado con los metales de interés, al cual se le determinó el pH, la acidez titulable y el contenido de metales por absorción atómica.



Figura 3.7 Biolixiviación directa en matraces.

3.3.3 Precipitación

Para los ensayos de precipitación de compuestos de níquel y cobalto se utilizó el método estudiado por Rangel ^[27], que consiste en la inyección de dióxido de carbono gaseoso a los licores cargados de metales producto de la lixiviación. Los experimentos se realizaron a tres temperaturas: 60°, 25°, y 3° C, para determinar la influencia de la temperatura en la cinética del proceso. El volumen de solución empleado fue de 50 ml, en vasos de precipitado de 100 ml de capacidad. El tiempo de duración de los experimentos fue de 2 horas.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS

4.1 Mineral

4.1.1 Caracterización física 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 física del mineral.

Muestra	Color	Morfología	Características
Cota 0	marrón	Terrones: <ul style="list-style-type: none">▪ Sub-angular▪ Aristas pronunciadas▪ Menores a 7 cm. Finos: <ul style="list-style-type: none">▪ Cantidad considerable	<ul style="list-style-type: none">▪ Tamaños Mixtos▪ Relativamente homogéneo
Cota 1 y Cota 2	rojizo	Terrones: <ul style="list-style-type: none">▪ Sub-angular▪ Aristas pronunciadas▪ Menores a 10 cm. Finos: <ul style="list-style-type: none">▪ Cantidad considerable	<ul style="list-style-type: none">▪ Tamaños Mixtos▪ Presencia de pocas zonas blancas▪ Relativamente homogéneo

La apariencia del mineral de la cota inferior (cota 0) en la mena, una vez removida la capa superficial, se observa en la figura 4.1.



Figura 4.1. Apariencia del mineral de la cota 0 del frente Damica 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 ésta.

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 inconsistente, presentado una resistencia variable dependiendo del lugar de extracción de los terrones. Además todas las muestras presentan gran cantidad de finos que se aglomeran y forman terrones 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 físicamente el mineral, 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 ^[36].

Muestra	% Ni	% Co	% Fe
Cota 0	1,3909 ± 0,0658	0,0632 ± 0,0038	22,1323 ± 0,1600
Cota 1	1,5745 ± 0,0219	0,1615 ± 0,0022	43,4313 ± 0,8060
Cota 2	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 u homogénea, presentándose la mayor variación en el porcentaje de hierro presente en la cota 1.

4.1.3 Caracterización por rayos X

A pesar de las limitaciones que tiene esta técnica en cuanto a detección de las fases minoritarias, como se explicó anteriormente en el procedimiento experimental, los difractogramas proporcionan información de suma importancia para la caracterización del

mineral ya que permiten conocer las fases mineralógicas en que se encuentran presentes los metales de interés (ver apéndice A).

Las posibles fases presentes en el mineral determinadas a través de los difractogramas realizados por Betancourt y Vivas ^[36] mediante esta técnica, se muestran en la tabla 4.3:

Tabla 4.3 Fases mineralógicas del mineral todo en uno ^[36].

Fases	Formula química
Willemseita	$(\text{Ni,Mg})_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$
Garnierita	$(\text{Ni,Mg})_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
Trevorita	NiFe_2O_4
Montmorillonita	$\text{NaMgAlSiO}_2(\text{OH})\text{H}_2\text{O}$
Kaolinita	$\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Ringwoodita, ferroan	$(\text{Mg,Fe}) \cdot 2\text{SiO}_2$
Goetita	$\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Hematita	Fe_2O_3
Cuarzo	SiO_2

Estas fases aparecen en los difractogramas de las muestras de cada una de las cotas, y como el mineral todo en uno es una mezcla de todas las cotas, ello indica que el método reportó pocos errores en cuanto a la detección de fases minoritarias como es el caso del níquel.

Entre las fases mayoritarias del mineral se tiene en primer lugar la hematita, lo cual era de esperarse por el alto contenido de hierro, y la goetita que es muy parecida en su composición química a la hematita y está directamente asociada a ésta y viceversa. También se encontraron otros minerales asociados al hierro como la trevorita y la

ringwoodita la cual posee una estructura básica de oxidosilicato. Entre las fases que contienen níquel se tiene la garnierita y la willemseita que son muy similares en su composición química y se puede decir que se encuentran asociadas como en el caso de la hematita, también se encontró al níquel en la trevorita.

Estas fases son de difícil detección debido al espectro de las fases mayoritaria como el hierro. Las fases de cobalto no se aprecian por el bajo contenido del mismo, pero sabemos que se encuentran presentes a través de los análisis químicos.

También se tienen minerales arcillosos como la montmorillonita y la kaolinita en gran cantidad, por lo que se puede clasificar el mineral como arcilloso.

4.2 Microorganismo

4.2.1 Resultados del diseño multifactorial

En los medios de fermentación para la producción de ácido cítrico por *A. niger* el crecimiento micelial y las actividades metabólicas son fácilmente afectadas por un cambio en la composición y las condiciones físicas a las que se somete el cultivo ^[29].

En vista de esto, se procedió a la optimización de las condiciones de la producción de ácido cítrico, tomando en cuenta la recuperación de níquel, cobalto y hierro, en base a la variación de ciertos parámetros nutricionales en el medio, como lo son: la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, y las sales inorgánicas.

Los medios estándares utilizados para la producción de ácido cítrico y en la biolixiviación de níquel se presentan en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Composición en g/L de distintos medios de cultivo de *Aspergillus niger* utilizados para la producción de ácido cítrico y la biolixiviación de níquel (tomado de trabajos anteriores ^[22,37-41]).

Medios	Fuente de carbono		Fuente de nitrógeno	Principales sales inorgánicas		
	Sacarosa	Glucosa		KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	MnSO ₄ .H ₂ O
Tremarias ^[22]		140	NH ₄ NO ₃ 2,5	2,5	2,5	0,003
	150			1	0,25	
Tzeferis ^[37]		150	NaNO ₃ 3 1,8	1	0,5	
	150			0,25	1,2	
Castro ^[38]	50-150		(NH ₄) ₂ CO ₃ 2,5	2,5	0,25	
Valix ^[39]		91	NH ₄ H ₂ PO ₄ 1	KCl 0,4	0,4	
Coto ^[40]	140		extracto levadura 3	0,5	0,25	0,095
Mulligan ^[41]	melaza 20		NaNO ₃ 1,5 y extracto de levadura 1,6		0,5	
	germen y conchas de maíz 20 c/u					
	desechos de papa 40					
	aserrín 40					
	hojas molidas 40					
	sacarosa 100					

En este trabajo siguiendo lo propuesto por Mulligan ^[41] de utilizar desechos como posibles sustratos fermentables, se emplearon subproductos de la producción de aceite, almidón de maíz y melaza de caña de azúcar. Como fuente de carbono se tiene la melaza, el germen desgrasado de maíz y el concentrín 21; como fuente de nitrógeno se utilizó el agua de maceración de maíz (Farias ^[42]).

Por otro lado, las sales inorgánicas utilizadas fueron las empleadas en el medio de cultivo optimizado por Coto ^[40].

De cada uno de los medios realizados según el diseño multifactorial, se obtuvieron los siguientes resultados correspondientes a la acidez titulable (N) y a la recuperación de metales, tal como se presenta en las tablas 4.5 y 4.6 para 6 y 18 horas de lixiviación, respectivamente.

Tabla 4.5. Resultados del diseño multifactorial con 6 horas de lixiviación.

n°	Bloque	Acidez (N)	%Níquel	%Cobalto	%Hierro
1	1	0,12322	6,951	9,511	0,392
2	1	0,085888	8,355	8,739	0,430
3	1	0,08282	2,425	3,592	0,581
4	1	0,13332	4,615	7,255	0,768
5	1	0,06262	6,306	6,003	0,160
6	1	0,0707	6,348	6,895	0,132
7	1	0,07474	6,198	9,437	0,418
8	1	0,07878	6,731	7,610	0,176
9	1	0,09696	4,679	7,487	0,316
10	2	0,07956	3,530	4,324	0,562
11	2	0,05916	3,760	4,356	0,536
12	2	0,10404	4,498	5,493	0,315
13	2	0,05508	4,532	4,580	0,463
14	2	0,09588	6,301	7,478	0,309
15	2	0,07344	5,870	4,729	0,264
16	2	0,07344	5,829	6,181	0,311
17	2	0,06732	3,744	4,663	0,571
18	2	0,10608	4,066	4,095	0,674
19	3	0,051	5,574	4,663	0,159
20	3	0,06732	5,541	5,755	0,174
21	3	0,05508	5,759	6,819	0,266
22	3	0,07344	5,294	3,651	0,062
23	3	0,0816	6,252	8,435	0,429
24	3	0,06936	5,370	5,123	0,097
25	3	0,08772	5,621	4,656	0,174
26	3	0,09792	4,602	3,871	0,137
27	3	0,08736	5,772	6,069	0,162

28	4	0,060984	6,282	7,194	0,279
29	4	0,067518	5,934	6,046	0,219
30	4	0,074052	5,747	5,867	0,140
31	4	0,080586	6,365	7,222	0,228
32	4	0,08712	6,447	7,991	0,224
33	4	0,078408	5,792	7,584	0,218
34	4	0,082764	6,859	8,472	0,222
35	4	0,069696	6,389	7,098	0,244
36	4	0,071874	5,515	6,658	0,299
37	5	0,072144	6,086	6,370	0,115
38	5	0,068136	6,599	6,607	0,177
39	5	0,042084	5,573	4,312	0,066
40	5	0,082164	6,557	7,467	0,165
41	5	0,074148	6,264	5,416	0,198
42	5	0,07014	6,937	7,209	0,224
43	5	0,07014	5,549	5,188	0,135
44	5	0,092184	6,598	7,160	0,240
45	5	0,06012	5,085	4,481	0,247
46	6	0,08272	6,713	5,778	0,069
47	6	0,070312	6,768	5,739	0,121
48	6	0,078584	6,516	4,608	0,075
49	6	0,066176	7,211	6,356	0,145
50	6	0,057904	6,228	4,221	0,358
51	6	0,08296	6,870	5,946	0,145
52	6	0,059972	7,307	7,822	0,246
53	6	0,064108	6,305	5,236	0,119
54	6	0,0517	6,631	5,990	0,088
55	7	0,055432	5,243	5,323	0,110
56	7	0,070356	3,689	2,881	0,171

57	7	0,0533	0,848	1,636	0,310
58	7	0,070356	2,553	2,324	0,227
59	7	0,051168	1,212	1,500	0,220
60	7	0,0533	4,941	4,108	0,054
61	7	0,03198	1,339	1,107	0,107
62	7	0,059696	5,724	6,374	0,153
63	7	0,061828	4,727	4,375	0,117
64	8	0,081016	6,607	7,964	0,196
65	8	0,051168	5,343	5,210	0,165
66	8	0,03198	4,712	4,653	0,074
67	8	0,057564	4,535	4,318	0,112
68	8	0,057564	5,956	6,655	0,298
69	8	0,046904	6,522	5,855	0,103
70	8	0,04264	5,643	2,592	0,069
71	8	0,055432	3,454	2,941	0,161
72	8	0,087412	6,516	6,030	0,242

Tabla 4.6 Resultados del diseño multifactorial con 18 horas de lixiviación.

n°	Bloque	Acidez (N)	%Níquel	%Cobalto	%Hierro
1	1	0,12322	6,236	9,626	0,360
2	1	0,085888	8,881	6,332	0,504
3	1	0,08282	2,077	2,204	0,601
4	1	0,13332	6,832	14,313	0,908
5	1	0,06262	7,498	9,247	0,382
6	1	0,0707	7,793	9,762	0,149
7	1	0,07474	7,610	6,766	0,542
8	1	0,07878	3,699	11,628	0,066
9	1	0,09696	7,454	12,519	0,383

10	2	0,07956	3,328	5,897	0,812
11	2	0,05916	4,154	5,535	0,749
12	2	0,10404	4,080	6,299	0,292
13	2	0,05508	4,831	5,719	0,196
14	2	0,09588	6,996	9,222	0,328
15	2	0,07344	6,277	6,307	0,266
16	2	0,07344	4,309	5,810	0,342
17	2	0,06732	5,858	9,053	0,715
18	2	0,10608	7,550	12,451	0,958
19	3	0,051	6,543	6,746	0,229
20	3	0,06732	6,635	7,927	0,205
21	3	0,05508	6,799	9,204	0,265
22	3	0,07344	5,869	5,205	0,111
23	3	0,0816	7,125	11,198	0,403
24	3	0,06936	6,639	7,573	0,112
25	3	0,08772	6,310	6,522	0,146
26	3	0,09792	5,297	5,251	0,104
27	3	0,08736	6,584	8,452	0,159
28	4	0,060984	6,950	9,087	0,279
29	4	0,067518	5,949	6,142	0,218
30	4	0,074052	5,954	7,404	0,140
31	4	0,080586	6,250	7,268	0,228
32	4	0,08712	6,781	7,570	0,223
33	4	0,078408	6,383	9,308	0,218
34	4	0,082764	6,635	8,068	0,222
35	4	0,069696	6,923	7,560	0,245
36	4	0,071874	6,177	7,250	0,299
37	5	0,072144	7,033	8,383	0,122
38	5	0,068136	7,426	9,475	0,196

39	5	0,042084	6,713	6,396	0,068
40	5	0,082164	7,280	10,055	0,207
41	5	0,074148	7,106	7,910	0,226
42	5	0,07014	7,608	10,008	0,005
43	5	0,07014	6,639	7,541	0,006
44	5	0,092184	6,799	8,949	0,267
45	5	0,06012	7,234	9,366	0,278
46	6	0,08272	7,069	6,757	0,133
47	6	0,070312	7,215	6,986	0,110
48	6	0,078584	6,722	5,525	0,078
49	6	0,066176	7,184	7,280	0,152
50	6	0,057904	6,082	4,756	0,237
51	6	0,08296	7,101	6,820	0,173
52	6	0,059972	8,217	9,694	0,231
53	6	0,064108	6,877	6,239	0,084
54	6	0,0517	6,923	7,095	0,063
55	7	0,055432	6,060	6,209	0,119
56	7	0,070356	4,788	4,309	0,187
57	7	0,0533	0,907	1,689	0,273
58	7	0,070356	5,125	6,825	0,217
59	7	0,051168	1,206	1,665	0,176
60	7	0,0533	5,380	4,459	0,059
61	7	0,03198	1,503	1,198	0,046
62	7	0,059696	6,473	7,818	0,154
63	7	0,061828	3,586	2,697	0,154
64	8	0,081016	6,049	8,115	0,238
65	8	0,051168	4,449	3,490	0,052
66	8	0,03198	4,408	4,637	0,065
67	8	0,057564	5,820	6,200	0,171

68	8	0,057564	3,806	4,012	0,186
69	8	0,046904	6,484	7,550	0,089
70	8	0,04264	5,168	3,431	0,066
71	8	0,055432	1,465	2,331	0,094
72	8	0,087412	5,871	6,819	0,308

Como es de esperarse en casi todos los ensayos realizados se observó que la mayor recuperación de metales se tiene con un tiempo de lixiviación de 18 horas. Sin embargo, en las tablas 4.5 y 4.6, se apreció que la diferencia entre los porcentajes de recuperación de metales en función a al tiempo de lixiviación no fue altamente significativa para la mayoría de los ensayos realizados, ello se debe a que la cinética de estos procesos es muy lenta para apreciar un cambio considerable en los valores de recuperación a tan corto tiempo

Se escogieron estos tiempos y no los descritos en otros trabajos de investigación [2, 38 - 42, 45], de 20 a 30 días, debido a la cantidad de experimentos, la disponibilidad de tiempo y espacio físico. En base a estos resultados se determinó la influencia de los distintos factores empleados en la preparación del medio (variables independientes) sobre los valores de acidez y recuperación de metales (variables dependientes), dando como resultado las siguientes de ecuaciones. A través de la aplicación de un modelo estadístico de regresión múltiple y en base a los análisis de varianza para cada variable dependiente (ver apéndice B), se logró determinar los factores que ejercen un efecto significativo en cada una de las mismas, este análisis estadístico permitió establecer las ecuaciones para la acidez, recuperación de níquel, cobalto y hierro:

- **Acidez:** sólo tres variables independientes influyen sobre este parámetro, que en orden de importancia son: germen desgrasado de maíz (GDM), agua de maceración de maíz (AMM) y KH_2PO_4 . El modelo que describe la acidez titulable es el siguiente:

$$(\text{Acidez titulable})^{1/2} = 0.17840 + 0,00153823*\text{AMM} + 0,00182738*\text{GDM} + 0.020369*\text{KH}_2\text{PO}_4.$$

- **Níquel:** sobre esta variable influyeron los siguientes factores: las interacciones del germen desgrasado de maíz con $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; agua de maceración con KH_2PO_4 . También se observó que factores individuales como la melaza y el concentrín²¹ ejercen un efecto importante en la recuperación de níquel. El modelo que describe esta variable es el siguiente:

$$(\text{Níquel}) * 2,12 = 27.13909 + 0.60360*\text{Melaza} + 1.31412*\text{AMM} - 0.76288*\text{GDM} + 0.45159*\text{concentrín} + 31.39249*\text{KH}_2\text{PO}_4 - 250.11350*\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 2.19985*\text{AMM}*\text{KH}_2\text{PO}_4 + 7.68330*\text{GDM}*\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}.$$

- **Cobalto:** Sobre esta variable influyó la interacción del agua de maceración con la sal KH_2PO_4 , el factor melaza; la interacción triple melaza, KH_2PO_4 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y por último la interacción de la melaza con la sal $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

$$\text{Cobalto} = -5.58039 + 0.44453*\text{Melaza} + 0.17793*\text{AMM} + 12.71678*\text{KH}_2\text{PO}_4 + 24.38992*\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.35689*\text{Melaza}*\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.13509*\text{Melaza}*\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.29274*\text{AMM}*\text{KH}_2\text{PO}_4 - 26.77385*\text{KH}_2\text{PO}_4*\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + 1.21473*\text{Melaza}*\text{KH}_2\text{PO}_4*\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}.$$

- **Hierro:** Las variables independientes que afectan al hierro se pueden apreciar en la siguiente relación:

$$(\text{Hierro})^{1/2} = + 0.69499 - 0,00520220*\text{AMM} + 0,003.98951*\text{GDM} - 0,0090054*\text{concentrín} - 0.84803*\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + 0.025517*\text{concentrín}*\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}.$$

Las concentraciones que maximizan las variables dependientes (acidez titulable, porcentaje de recuperación de níquel y porcentaje de recuperación de cobalto) a excepción

del porcentaje de recuperación de hierro que se minimizó, son las siguientes (las concentraciones vienen dadas en g/L):

Tabla 47. Concentraciones del medio de cultivo propuesto por el modelo (g/L).

Melaza	AMM*	GDM	Concentrín 21	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	MnSO ₄ .H ₂ O
29,78	19,65	40.00	39,91	0,25	0,10	0,20

*referida a sólidos por volumen de AMM (45% de sólidos).

En base a estos resultados se determinaron los intervalos de confianza, así como los valores de acidez titulable, % Ni, %Co y %Fe, arrojados por el modelo utilizando las ecuaciones determinadas para cada variable dependiente. En los análisis de varianza al 95% de confiabilidad para cada variable dependiente se evidencia el efecto significativo de los factores y de las interacciones entre los factores, sobre la acidez titulable y la recuperación de metales.

Además en los análisis de varianza también se observó que los datos se ajustan al modelo, el cual corresponde a un modelo lineal de primer orden. También en los Figuras de residuales normales y residuales vs. predichos, para cada variable dependiente se aprecia la normalidad y homogeneidad de la varianza (ver apéndice B). Por otro lado, para comprobar la eficacia del modelo, se determinaron los valores predichos y los intervalos de confianza, tal como se tiene en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Valores predichos por el modelo multifactorial e intervalos de confianza.

Variable dependiente	Acidez titulable (N)	% Ni	%Co	%Fe
Predicción	0,0703216	6,19641	7,04767	0,20678
Valor mínimo	0,052	4,06	3,73	0,044
Valor máximo	0,092	7,72	10,37	0,49

Con el sobrenadante obtenido, según lo descrito en el procedimiento experimental, se realizó un ensayo de lixiviación, el tiempo de lixiviación fue de 18 horas, ya que con 6 horas de lixiviación no se observó una marcada diferencia entre los porcentajes de recuperación con respecto a los obtenidos en 18 horas de lixiviación, para la mayoría de los ensayos del modelo. Además el tiempo no fue considerado como factor dentro del modelo. En la tabla 4.9 se muestran los resultados de la acidez titulable y de la recuperación de metales, para 18 horas de lixiviación, utilizando el sobrenadante obtenido a través del medio de cultivo propuesto por el diseño multifactorial.

Tabla 4.9. Resultados de acidez titulable y de recuperación de metales, para 18 horas de lixiviación.

Medio	Acidez titulable (N)	% Ni	% Co	% Fe
Medio optimizado	0,0658	7,3187	8,1743	0,2645

Comparando la tabla 4.8 y la tabla 4.9 se aprecia que los valores logrados se encuentran dentro de los límites establecidos por el modelo multifactorial, es decir, que los resultados son confiables.

4.2.1 Cinética de crecimiento de *Aspergillus niger*

El estudio del microorganismo se basó en la evaluación y determinación de la cinética de crecimiento de *A. niger* en cultivos sumergidos, empleando para medio de cultivo las concentraciones obtenidas a través del diseño multifactorial.

Además se evaluó la variación de la acidez, el pH y la 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 las figuras 4.2

y 4.3. Este ensayo fue realizado por duplicado según lo establecido en el procedimiento experimental y los valores reportados en el figura 4.2 corresponden al promedio de los resultados obtenidos.

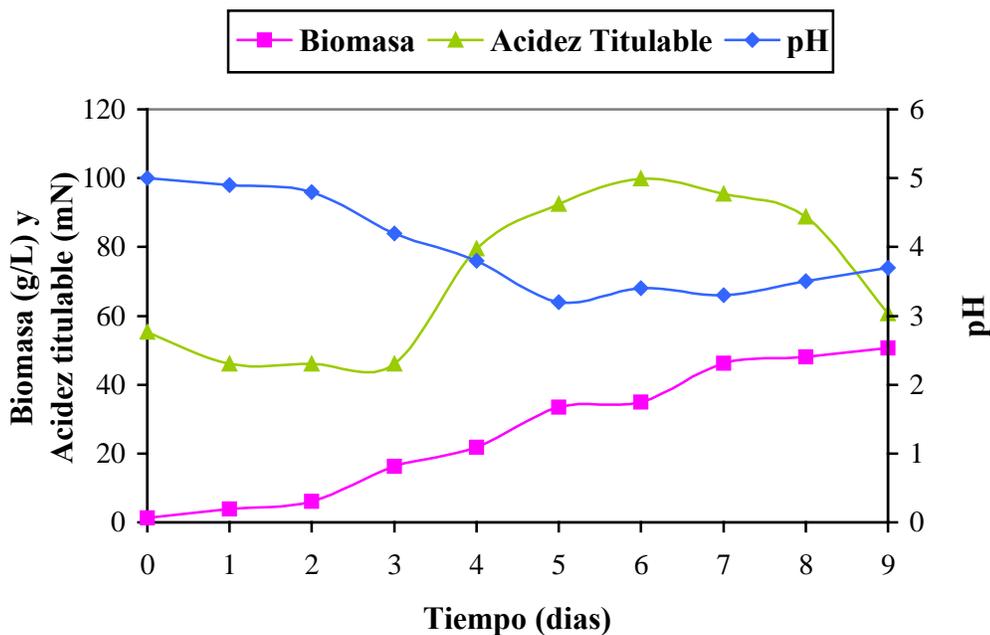


Figura 4.2 Cinética de crecimiento de *A. niger* en el medio optimizado.

Al final del crecimiento, se obtuvo una biomasa de aproximadamente 50,5820 g/L, mientras que el pH alcanzó un valor de 3,7. Durante los primeros cinco días se apreció claramente un descenso del pH, pero en los días 5, 6 y 7 los valores de pH obtenidos fueron aproximadamente similares, posterior al día 7 se presenta un incremento en estos valores.

Sin embargo, la medición de pH sólo permite determinar la concentración de iones H^+ , y los ácidos orgánicos productos del proceso de fermentación no se ionizan completamente debido a que son ácidos débiles. Por esta razón la acidez titulable es más útil al momento de determinar la concentración de los ácidos orgánicos. En cuanto a la acidez titulable se observó un incremento, reportándose un valor máximo entre los días 5, 6 y 7, luego ocurrió un descenso en la concentración de los ácidos. Esto puede deberse a que

los ácidos obtenidos reaccionan con otros productos metabólicos, o con los compuestos provenientes de los sustratos empleados en la preparación del medio para el crecimiento del hongo y por ende, disminuye la concentración de los ácidos producidos por el microorganismo.

En el figura 4.2 se observaron varias fases del ciclo de crecimiento microbiano. Durante el primer día de crecimiento se produce un pequeño aumento en la concentración de biomasa, sin embargo, no es significativo ya que este es el tiempo requerido por las esporas para la germinación, esto corresponde a la fase de latencia.

A partir del día 2 se observa la fase de crecimiento exponencial, ya que se caracteriza por un rápido desarrollo de biomasa vegetativa que se extiende hasta los 6 días de cultivo, debido a que existe una concentración adecuada de todos los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo.

La fase de crecimiento exponencial culmina con la fase de atenuación en la que se tiene una disminución en la velocidad de crecimiento, hasta el punto que la concentración de biomasa comienza a estabilizarse. En esta etapa estacionaria, se produce un crecimiento equilibrado, es decir, que el crecimiento se iguala a la lisis celular. Ello se debe a factores intrínsecos como acumulación de metabolitos inhibidores o simplemente al agotamiento de nutrientes.

Aplicando la función logaritmo natural a los valores de biomasa obtenidos durante las primeras etapas de desarrollo exponencial y graficándolas contra el tiempo, fue posible determinar la velocidad específica de crecimiento máximo, cuyo valor está representado por la pendiente de la recta obtenida en el figura 4.3.

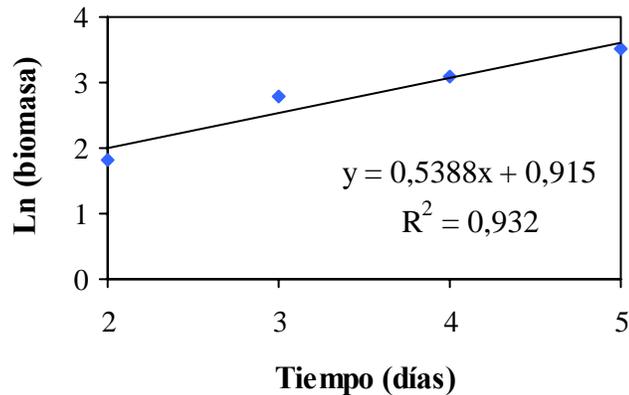


Figura 4.3. Regresión lineal del logaritmo natural de la concentración de biomasa sobre el tiempo durante la fase exponencial de crecimiento.

Según la ecuación (11) se logró estimar el tiempo de generación. Estos valores son aproximadamente:

$$\mu_m = 0,5388 \text{ días}^{-1}$$

$$x_0 = 2,4968 \text{ g/L}$$

$$t_g = 1,2865 \text{ días}$$

Comparando el tiempo de generación reportado en el trabajo realizado por Castillo y Villafañe ^[2] $t_g = 1,115$ días, utilizando como medio de cultivo un medio de sales optimizado por Coto ^[41], con el tiempo de generación obtenido utilizando el medio de cultivo propuesto por el modelo multifactorial $t_g = 1,2865$ días, se puede decir, que el primero es menor. Al obtener un tiempo de generación menor disminuye el tiempo de producción de biomasa, ya que este tiempo representa el período promedio de un ciclo completo de división celular. Básicamente, lo que significa es que para tiempos iguales el medio utilizado por Castillo y Villafañe ^[2] genera mayor producción de biomasa que el medio empleado en este estudio. El valor reportado de biomasa al final de crecimiento por Castillo y Villafañe ^[2] fue de 90,3395 g/L, mientras que el valor obtenido a través de este estudio fue de 50,5820 g/L, lo cual comprueba lo mencionado anteriormente.

Según Tremarias ^[22], los hongos filamentosos como el *A. niger*, a medida que crecen generan una capa gruesa de micelio la cual ocasiona dificultades para la aireación y agitación, conduciendo a una menor disponibilidad de oxígeno. El oxígeno es un factor crítico en el proceso de fermentación por crecimiento sumergido, por lo que una aireación deficiente permite el desarrollo de una capa gruesa de micelio, conduciendo a que los azúcares provenientes del medio sean utilizados en la síntesis de polisacáridos constituyentes de la pared celular y no en la síntesis de ácido cítrico.

En base a lo establecido por Tremarias ^[22], tomando en cuenta que se obtuvo gran cantidad de biomasa y se observó un micelio bastante grueso en los medios de cultivo (figura 4.4), se puede pensar en una producción baja de ácido cítrico por parte del hongo.

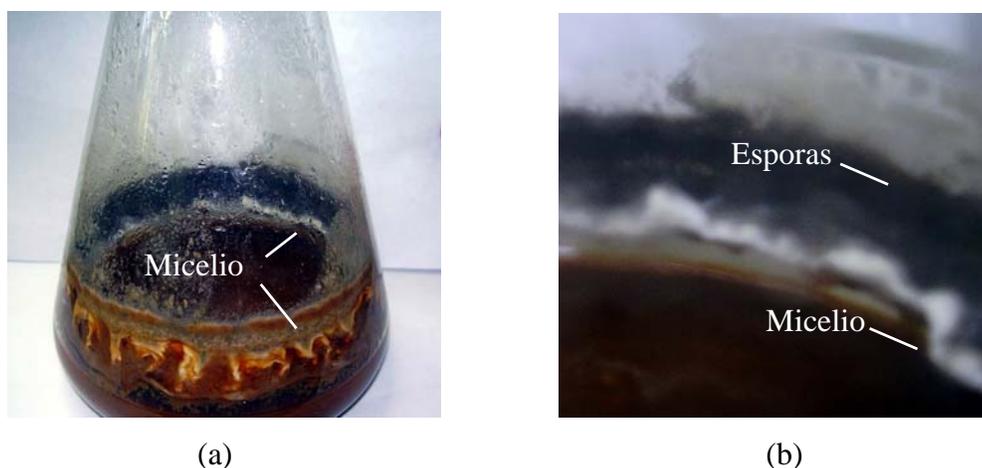


Figura. 4.4 Cultivo sumergido en matraces erlenmeyers: (a) micelio aéreo y (b) vista del micelio aéreo, donde la zona de color blanca es el micelio que se encuentra esporulado.

4.2.2.1 Concentración de los ácidos orgánicos

Suponiendo una relación directamente proporcional de la acidez titulable con la concentración de ácido cítrico, y una relación inversamente proporcional del pH con la producción del ácido, se determinó la concentración de ácido cítrico en las muestras correspondientes a los días de mayor acidez y menor pH (tabla 4.10), con el fin de

establecer el día de mayor producción de ácido cítrico. Las muestras empleadas fueron las de 5, 6 y 7 días de fermentación.

Tabla 4.10 Concentración de los ácidos orgánicos producidos por *A. niger* en los días de menor pH y mayor acidez titulable.

Tiempo (días)	Ácido cítrico (mM)
5	2,648
6	4,136
7	6,455

En la tabla anterior se tiene que el día de mayor producción de ácido cítrico fue el séptimo día de fermentación, en consecuencia todos los sobrenadantes utilizados en los experimentos de biolixiviación indirecta fueron tomados a los 7 de incubación, con el fin de garantizar la máxima producción de ácido cítrico.

Es importante señalar, que además del ácido cítrico existen otros metabolitos producto de la fermentación fúngica, tal como es señalado en la literatura y diversos trabajos realizados anteriormente [2, 11, 13, 17, 18, 20, 22, 26, 38 – 40], determinar específicamente cada uno de ellos es muy difícil.

Sin embargo, en los espectros obtenidos en el análisis de HPLC correspondientes a la determinación de ácidos orgánicos se detectaron otros componentes a parte del ácido cítrico en distintas proporciones y se puede pensar que las sustancias observadas son otros ácidos orgánicos de bajo peso molecular ya que fueron detectados con el uso de una columna para la determinación ácidos con esas características (columna Aminex HPX-87H 300x7.8mm) como lo es el ácido cítrico (ver apéndice C).

Adicionalmente se realizó la determinación de la concentración de ácido oxálico en la muestra que presentó la mayor concentración de ácido cítrico. La concentración de ácido oxálico fue de 20,45 mM. Ello significa que el *A. niger* es capaz de producir ácido cítrico y ácido oxálico, utilizando como medio fermentable el medio de cultivo propuesto por el diseño multifactorial.

4.3 Biolixiviación

4.3.1 Biolixiviación indirecta.

Para la biolixiviación indirecta se utilizó como agente lixivante metabolitos ácidos producidos biológicamente durante el crecimiento fúngico después de la separación de la biomasa (biosolución). Estos productos metabólicos están presentes en la solución sobrenadante obtenida según lo descrito en el procedimiento experimental.

4.3.1.1 Obtención de sobrenadante

Los resultados de los experimentos para la obtención de biosoluciones para lixiviar se presentan en la figura 4.5.

En el figura 4.5 se observa que hay una reproducibilidad en los valores de acidez y pH, es decir, que la variación que existe entre cada experimento es pequeña, en el caso del pH los valores obtenidos están entre 3,6 y 4,4 y en el caso de la acidez entre 0,66 y 0,92; también se observó que hay una correlación entre el pH y la acidez titulable, que a menor pH la acidez es mayor y viceversa, pero la acidez titulable sigue siendo un mejor indicativo de la concentración de ácido cítrico aunque no es del todo específica, por lo tanto los resultados se reportan en normalidad de ácido (n° equivalentes/L).

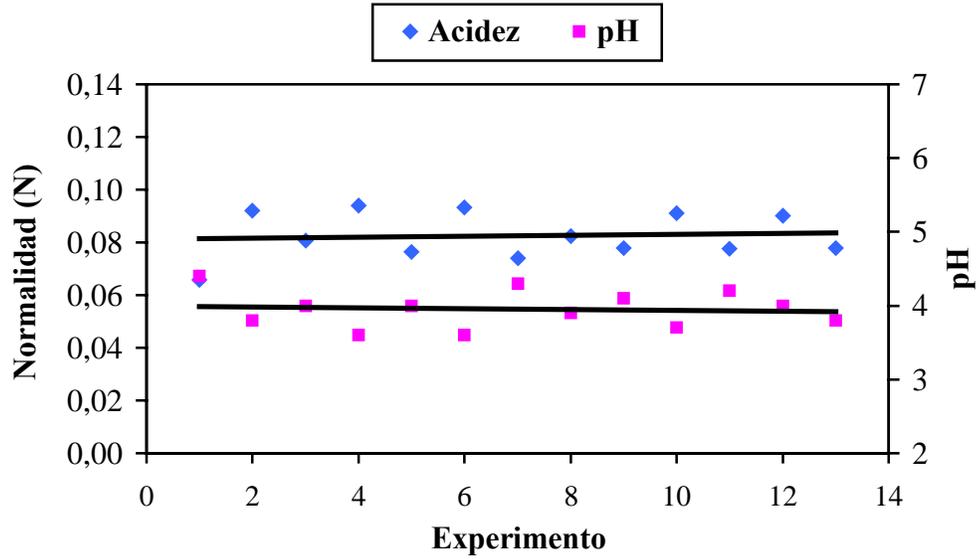


Figura 4.5 Acidez titulable y pH de los sobrenadantes obtenidos a los 7 días de incubación.

Luego de la homogenización de todos los sobrenadantes, el resultado de pH y acidez titulable se muestra en la tabla 4.11. El valor de acidez titulable se encuentra dentro de los predichos por el modelo estadístico.

Tabla 4.11. pH y acidez del sobrenadante utilizado en la biolixiviación indirecta.

	pH	Acidez titulable (N)
Sobrenadante homogenizado	4	0,083

4.3.1.1 Cinética de lixiviación a temperatura ambiente

Los resultados de la recuperación de níquel, cobalto, hierro y el pH durante la biolixiviación indirecta a temperatura ambiente se muestran en las figuras 4.6 y 4.7.

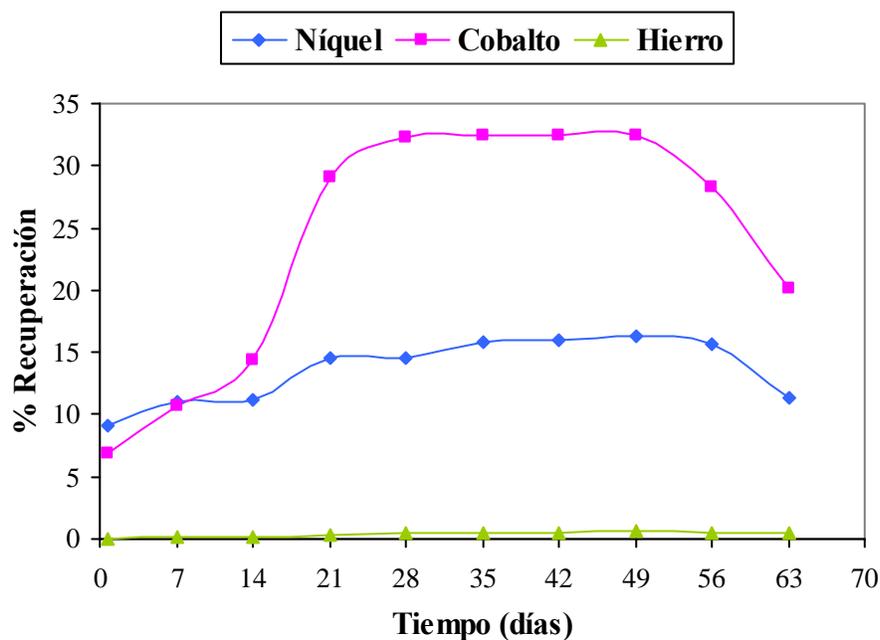


Figura 4.6. Recuperación de níquel, cobalto y hierro mediante lixiviación indirecta a temperatura ambiente y densidad de pulpa: 5%.

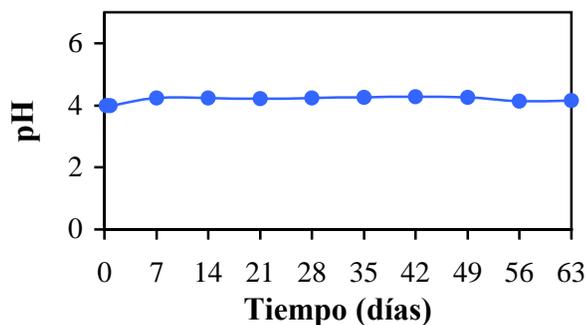


Figura 4.7. pH final de los licores de lixiviación.

La mayor recuperación se presenta en el caso del cobalto el cual presenta un porcentaje máximo de recuperación 32,48% el día 49, con respecto al níquel se obtuvo un porcentaje máximo de recuperación de 16,25% en el mismo día, sin embargo, es importante señalar que existe un periodo donde el porcentaje se mantiene aproximadamente constante.

Este periodo de estabilización de la curva ocurre entre los días 28 y 49 para el cobalto y el porcentaje de recuperación se mantiene entre 32,28 y 32,48%, lo cual es una variación insignificante que se podría atribuir a la sensibilidad y apreciación de los equipos de medición. Para el níquel la estabilización comienza el día 21 hasta el día 56 aproximadamente, y el porcentaje de recuperación se encuentra entre 14,49 y 16,25%, en este caso hay una leve variación pero sigue siendo intrascendente, ya que el aumento logrado es menor a 2%, en más del doble del tiempo. Por tal motivo se podría decir, que el tiempo que tarda el sistema en alcanzar el equilibrio es entre 21 y 28 días, esto ocurre cuando el agente lixiviante agota su capacidad de extracción, en este caso en particular, sería principalmente el ácido cítrico. En un proceso a escala industrial lo que se busca es una relación adecuada entre tiempo y recuperación, en tal caso, se tomaría como tiempo óptimo del proceso 28 días, donde alcanza un porcentaje de recuperación de níquel 14,6% y cobalto 32,3%.

En cuanto a los mecanismos que operan en la disolución de níquel y cobalto, Tzeferis y et al.^[43], en su estudio de la lixiviación de níquel y hierro de minerales niquelíferos no sulfurados por ácidos orgánicos, 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) según la reacción de equilibrio 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

También se observó que a partir de cierto tiempo hay una reducción del nivel de los metales solubilizados, es decir, el porcentaje de recuperación de níquel y cobalto decrece

después de un número de días determinados, en el caso del níquel esto se observa a partir del día 56 y en el cobalto a partir del día 49, debido a la heterogeneidad del sistema y a la gran cantidad de metabolitos que se encuentran interactuando, no se puede determinar con precisión lo que está ocurriendo, pero se puede pensar que luego de tanto tiempo ciertos compuestos orgánicos presentes en la biosolución se estén degradando o degenerando, lo que puede dar paso a un cambio en el equilibrio del sistema. Según lo estudiado por Castro^[38], la pérdida de los metales en soluciones biológicas puede deberse a la formación de oxalatos de níquel y cobalto, debido a la cantidad de ácido oxálico presente en la biosolución, los cuales son parcialmente solubles a bajas concentraciones de ácido cítrico y valores de pH alrededor de 4, en este caso todo el ácido cítrico se ha consumido en la formación de citratos de níquel y cobalto, es por eso que la concentración es muy baja y el pH es 4,3; el cual se mantiene constante.

Este descenso de los porcentajes de recuperación también se presenta en el trabajo de Rangel^[27] sobre la lixiviación química con ácido cítrico de laterita, esto hace pensar que es una característica inherente a la laterita, la cual puede estar ocasionando estas pérdidas de metales en el proceso de lixiviación cuando está presente el ácido cítrico como agente lixivante, ya sea en soluciones comerciales o biosoluciones. Valix^[46] en su estudio sobre las propiedades de electroadsorción de níquel en la ganga laterítica en la lixiviación química con ácido cítrico y en la biolixiviación con *A. niger*, explica que las pérdidas de níquel se deben a la adsorción de los iones níquel cargados positivamente en las partículas cargadas negativamente de los minerales arcillosos que forman la ganga de la laterita, esto tiene que ver con la magnitud del potencial Z de las partículas, cuando el potencial Z es positivo la carga neta de la partícula alrededor de la capa difusa es generalmente considerada positiva y un potencial Z negativo es indicativo de una partícula cargada negativamente. El potencial Z varía con el pH y se hace cero a un determinado valor, a este punto se le llama punto isoelectrico (pH_{PIE}) por debajo de este punto, el potencial Z es negativo y por encima positivo, si el sistema tiene un pH por encima del pH del punto isoelectrico de los minerales de la ganga, la carga neta en la superficie de las partículas debería ser negativa y conducir a la adsorción del níquel. Las pérdidas reportadas por Valix^[46] debido a la electroadsorción se

explican por los cambios en el pH del sistema, este fenómeno no se observó en el estudio realizado en este trabajo, ya que el pH del sistema se mantiene constante.

Por otra parte, otra característica inherente al mineral que puede estar jugando un papel importante en cuando a las pérdidas de los metales, es la propiedad de intercambio catiónico de las arcillas presentes en la laterita. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se puede describir como la transferencia o intercambio reversible de baja energía de cationes, y en menor grado aniones, fijados en la superficie exterior de los cristales en los espacios interlaminares, o en otros espacios interiores de la estructura del mineral de arcilla y la solución que la rodea. La CIC es equivalente a la medida del total de cargas negativas del mineral. Estas cargas negativas pueden ser generadas de varias formas, pero la principal que corresponde al 80 % de la carga neta de la partícula, es conocida como carga permanente y tiene su origen en las sustituciones isomórficas dentro de la estructura; además es independiente de las condiciones de pH y actividad iónica del medio ^[47]. La CIC se expresa en miliequivalentes por unidad de masa de arcilla, en el caso de los minerales de arcilla presentes en la laterita la CIC en meq/ 100 g es: caolinita: 3-15 y montmorillonita: 80-200, esto es una cantidad considerable cuando se habla de soluciones de baja concentración como los licores de lixiviación donde la concentración de níquel no supera los 90 mg/L.

En otro contexto, también es posible observar que la disolución de cobalto es mayor a la de níquel, siendo esta aproximadamente la mitad del porcentaje cobalto recuperado, este comportamiento también se presentó en diversos trabajos de biolixiviación de níquel y cobalto con *A. niger* ^[2, 37, 40] y en el trabajo de Rangel ^[27] de lixiviación química con ácido cítrico comercial a varias temperaturas, allí se explica que esta conducta se debe, a quelatos de metal formados por la unión de los iones citrato y los iones metálicos en solución, que a su vez, forman estructuras moleculares llamadas ligandos polidentados que se asocian con el níquel en una estructura plana cuadrada y con el cobalto en una geometría octaédrica de acuerdo al grado de covalencia y afinidad electrónica con el ión citrato por la teoría del campo cristalino y la regla del conteo de los 18 electrones de la química organometálica.

El tipo de estructura que forma el cobalto tendría mayor afinidad que la del níquel y explicaría la mayor asociación del ácido cítrico con el cobalto, aunque ambos tengan el mismo grado de afinidad. Hay que recalcar que además de ácido cítrico existen otras sustancias producto del metabolismo fúngico que facilitan la disolución de los metales en la biolixiviación indirecta ^[37].

En cuanto a la solubilización del hierro se puede decir que el proceso es selectivo, debido a que la solubilización de hierro es mínima con respecto a los demás metales, la razón de ello es que el ácido cítrico no es capaz de reducir el hierro presente en la hematita (Fe_2O_3) en forma de Fe^{+3} a Fe^{+2} (FeO) que es más soluble, lo que disminuye la afinidad de este elemento con el citrato ^[43].

Cabe destacar, que la solución sobrenadante también contiene cierta cantidad de ácido oxálico el cual tiene una gran selectividad hacia el hierro con respecto a los otros metales, al contrario que el cítrico, como se demostró en los estudios realizados ^[2, 37, 38, 40, 43], donde se demuestra que el ácido oxálico tiene poca capacidad de solubilizar el níquel y el cobalto, lo cual podría explicarse por la formación de oxalatos de níquel y cobalto, los cuales son poco solubles en condiciones de bajo pH (2,5-6).

La selectividad del ácido oxálico en la disolución del hierro se atribuye al proceso de reducción por parte del ácido oxálico y la subsiguiente solubilización de Fe^{+2} :



Según lo descrito por Castro ^[38] y por Tzeferis ^[43], 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 (6-2,5) y bajas concentraciones de ácido, son parcialmente solubles.

En el trabajo realizado por Castillo y Villafañe ^[2] también se estudió la lixiviación química con ácido cítrico comercial a 0,5 M y 5% de densidad de pulpa y se obtuvo recuperaciones de cobalto y níquel de 35 y 20% respectivamente.

En el caso de las biosoluciones obtenidas a través del modelo multifactorial se logró una recuperación de níquel que corresponde aproximadamente al 80% de la recuperación con ácido comercial, y de cobalto un 93 % a pesar de que la concentración de ácido cítrico en el sobrenadante fue de 6 mM aproximadamente, es decir, una concentración de ácido cítrico 100 veces menor que la empleada en lixiviación química.

En tal sentido, se evidencia que además del ácido cítrico otros productos metabólicos producidos por *A. niger* intervienen en la solubilización del níquel y el cobalto. Este comportamiento se evidencia aún más en los ensayos de biolixiviación indirecta realizado por Castillo y Villafañe ^[2] donde se obtienen mayores rendimientos en la biolixiviación directa e indirecta, que en la lixiviación química.

En el trabajo de Castro ^[38] también ocurre lo mismo, la lixiviación química con ácido cítrico es menos efectiva en la extracción de níquel que la biolixiviación directa e indirecta con *A. niger*. El caso contrario también se puede presentar, como en los trabajos de Sukla ^[44] de biolixiviación indirecta de laterita niquelífera, y Coto ^[41] de biolixiviación directa de serpentinita niquelífera, que revelan mejores rendimientos para la lixiviación química. Esto tendría una explicación en la mineralogía, ya que distintos tipos de mineral, y los metales que este contenga, tienen distinta susceptibilidad a la solubilización por biolixiviación (según Valix ^[39, 45], y Castro ^[38]).

4.3.1.2 Estudio de banco de pruebas

Con el fin de estudiar una forma de aumentar la concentración de los metales de interés en los licores de lixiviación, se realizaron experimentos de recirculación tanto del licor como de la pulpa densa, cómo se haría en un proceso a escala industrial, lo que se

busca es optimizar el proceso de recuperación de metales con biosoluciones a menores tiempos de lixiviación. Los resultados se resumen en la tabla 4.12. Comparando los valores de la tabla 4.12 con la tabla 4.13, se tiene que en la tercera pasada con pulpa fresca (L3,1) se supera la concentración de níquel obtenida en la biolixiviación indirecta en un 42%.

Tabla 4.12. Concentración de Ni, Co y Fe en los licores de lixiviación provenientes del banco de prueba según el diseño descrito en el procedimiento experimental.

Muestra de licor	Pulpa densa	Licor n° pasadas	Concentración (mg/L)		
			Ni	Co	Fe
L1,1	Pulpa fresca (M0)	1	43,38	3,17	39,33
L2,1		2	66,65	4,56	44,05
L3,1		3	125,8	5,65	45,8
L1,2	Pulpa lixiviada 1 vez (M1)	1	11,9	2,71	33,5
L2,2		2	24,7	4,63	56,5
L3,2		3	37,7	4,68	70,85
L1,3	Pulpa lixiviada 2 veces (M2)	1	6,90	2,35	28,6
L2,3		2	12,83	3,80	43,85
L3,3		3	19,04	5,13	70,75

Tabla 4.13. Concentración máxima de Ni, Co y Fe alcanzada por biolixiviación indirecta.

Metales	% Recuperación	Concentración (mg/L)
Ni	16,25	88,70
Co	32,48	16,40
Fe	0,60	92,25

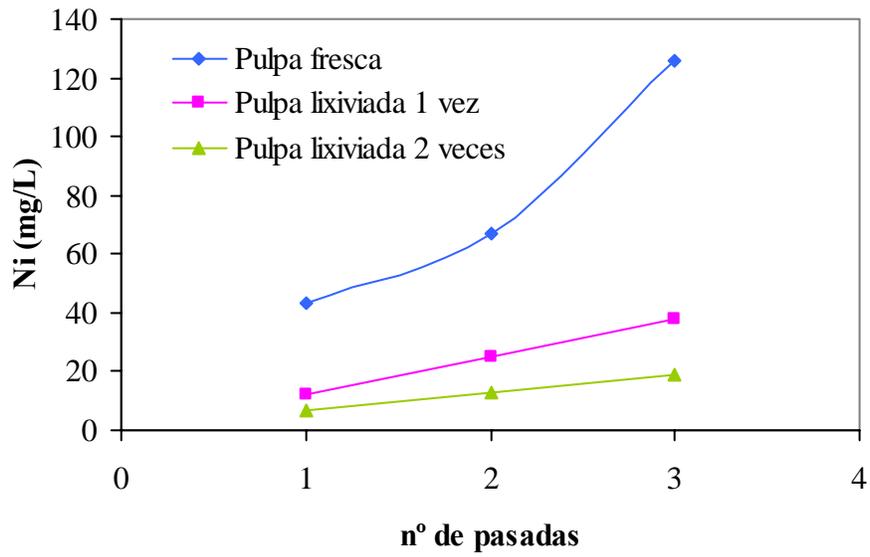


Figura 4.8 Concentración de Ni en el licor en función del numero de pasadas a distintas condiciones de la pulpa.

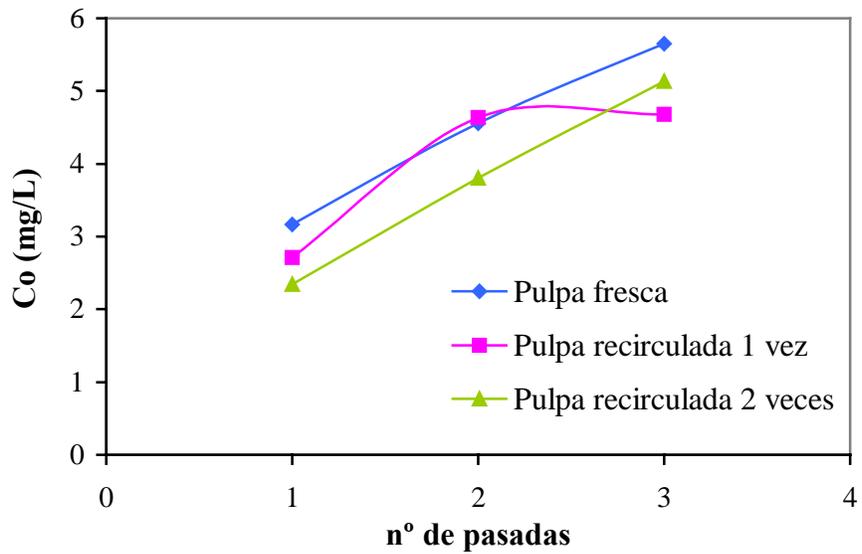


Figura 4.9 Concentración de Co en el licor en función del numero de pasadas a distintas condiciones de la pulpa.

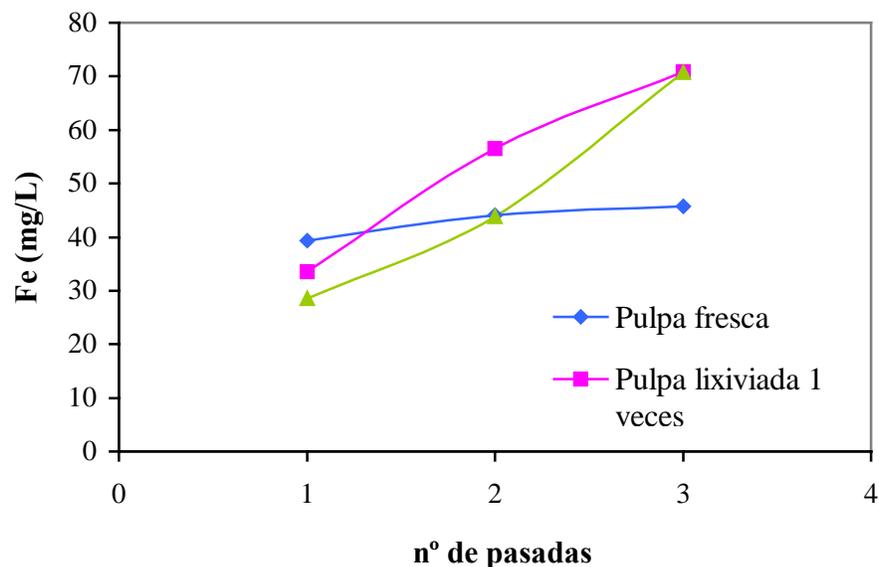


Figura 4.10 Concentración de Fe en el licor en función del número de pasadas a distintas condiciones de la pulpa.

En todos los casos la concentración de los metales tiende a aumentar con el número de pasadas que se le hace a la pulpa, bien sea fresca, o recirculada. En el caso del níquel es donde se observó el mayor aumento de concentración en la tercera pasada con pulpa fresca, con respecto a la segunda pasada cuyo incremento es más del doble, esto quiere decir que el agente lixivante todavía está presente todavía tiene gran capacidad de disolución en la tercera pasada.

Por otro lado, a medida que la pulpa es recirculada la concentración de metales disminuye y la pendiente de la recta, que corresponde a el incremento de la concentración, también.

En el caso del cobalto no se alcanzan las recuperaciones de la biolixiviación indirecta, esto se debe a que la cinética de disolución del níquel es más rápida que la del cobalto, en el mejor de los casos (L3,1) sólo se obtiene un 34,5% de lo recuperado en biolixiviación indirecta. El hierro también es menos solubilizado, lo cual es beneficioso

para el proceso ya que aumenta la selectividad. El comportamiento de cada uno de los metales en cuanto a la solubilización con la recirculación del licor y la pulpa densa se esquematizan a continuación en los figura del 4.8 al 4.10:

En el caso del cobalto observamos un comportamiento casi lineal a excepción del caso de la pulpa lixiviada una vez donde en la tercera pasada la concentración permanece igual a la del segundo pase, donde si se obtuvo una aumento de casi el doble con respecto a la primera pasada, eso quiere decir que en la tercera pasada no se solubilizó gran cantidad de cobalto, esto puede deberse al por agotamiento del agente lixivante.

Con respecto al hierro se muestra que el incremento en la concentración respecto al numero de pasadas (pendiente de la recta) es muy pequeño cuando se utiliza pulpa fresca, luego que la pulpa es recirculada la solubilización del hierro va aumentando aunque en la primera pasada la concentración de es menor, en las subsiguientes pasadas el incremento en los valores de la concentración es mucho más severo, se pude decir, que a medida que la pulpa es recircula es hierro se solubiliza mas fácilmente.

Con el fin de observar como es el comportamiento de la extracción níquel y cobalto y hierro de la pulpa densa para saber hasta cuando es beneficioso recircular la pulpa se graficaron tomaron solo los valores correspondientes a las recirculaciones con biosolución fresca en cada pasada, lo podemos ver en el figura 4.11.

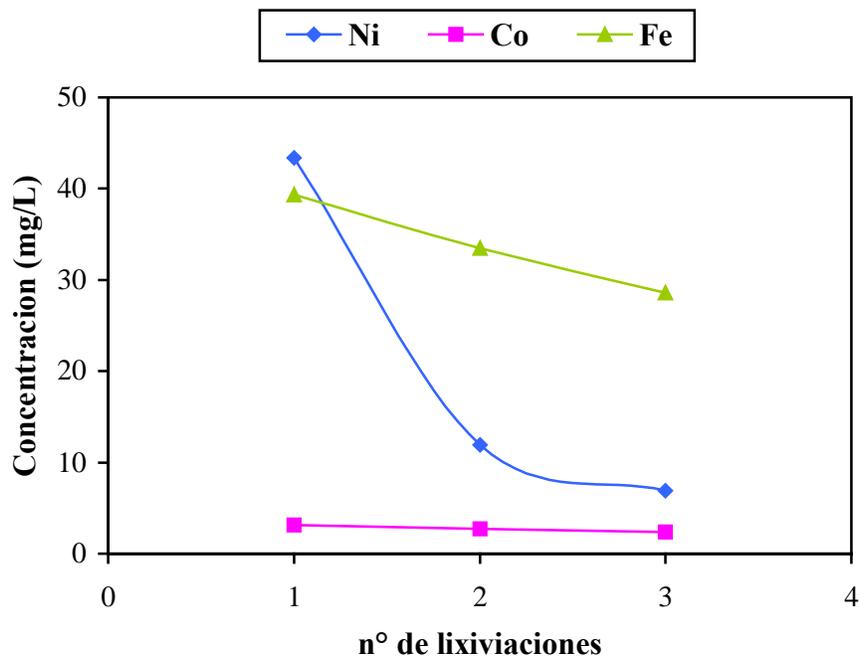


Figura 4.11 Concentración de Ni, Co, y Fe de la recirculación de la pulpa densa con biosolución fresca en cada pasada, correspondientes a las muestras L1,1; L1,2; L1,3.

Se puede observar que la recuperación de los metales disminuye con el número de lixiviaciones, como es de esperarse, debido al agotamiento de estos en el mineral, y no al agotamiento del agente lixivante en la solución como en los casos anteriores. Con relación al níquel se observa que la mayoría se solubiliza en la primera lixiviación, por eso en la segunda y la tercera lixiviación las recuperaciones son muy bajas, y la diferencia entre ellas es muy pequeña, es por eso que una tercera lixiviación deja de ser beneficiosa en cuanto a la rentabilidad del proceso. En el caso del cobalto se observa que la recuperación es similar en todos los casos esto, se debe a que la solubilización es más lenta que la del níquel y el hierro, en menor grado, no se observa un descenso pronunciado de la curva como en el níquel, lo que nos parece indicar que todavía se puede extraer más cobalto con otras lixiviaciones. La concentración del hierro también disminuye.

4.3.1.3 Lixiviación a altas temperaturas

Los resultados recuperación para los metales de interés Ni y Co, se muestran en las figuras 4.12 y 4.13.

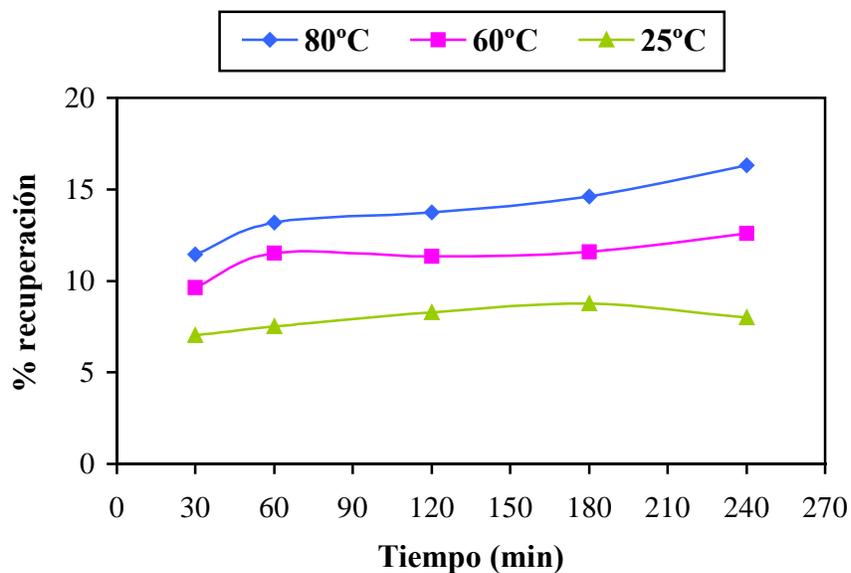


Figura 4.12. Cinética de recuperación de níquel a 80, 60 y 25°C.

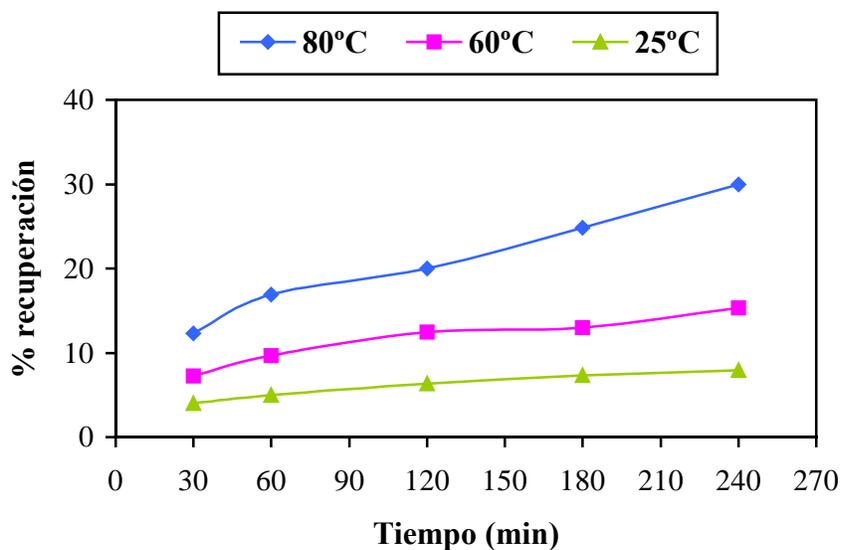


Figura 4.13. Cinética de recuperación de cobalto a 80, 60 y 25°C.

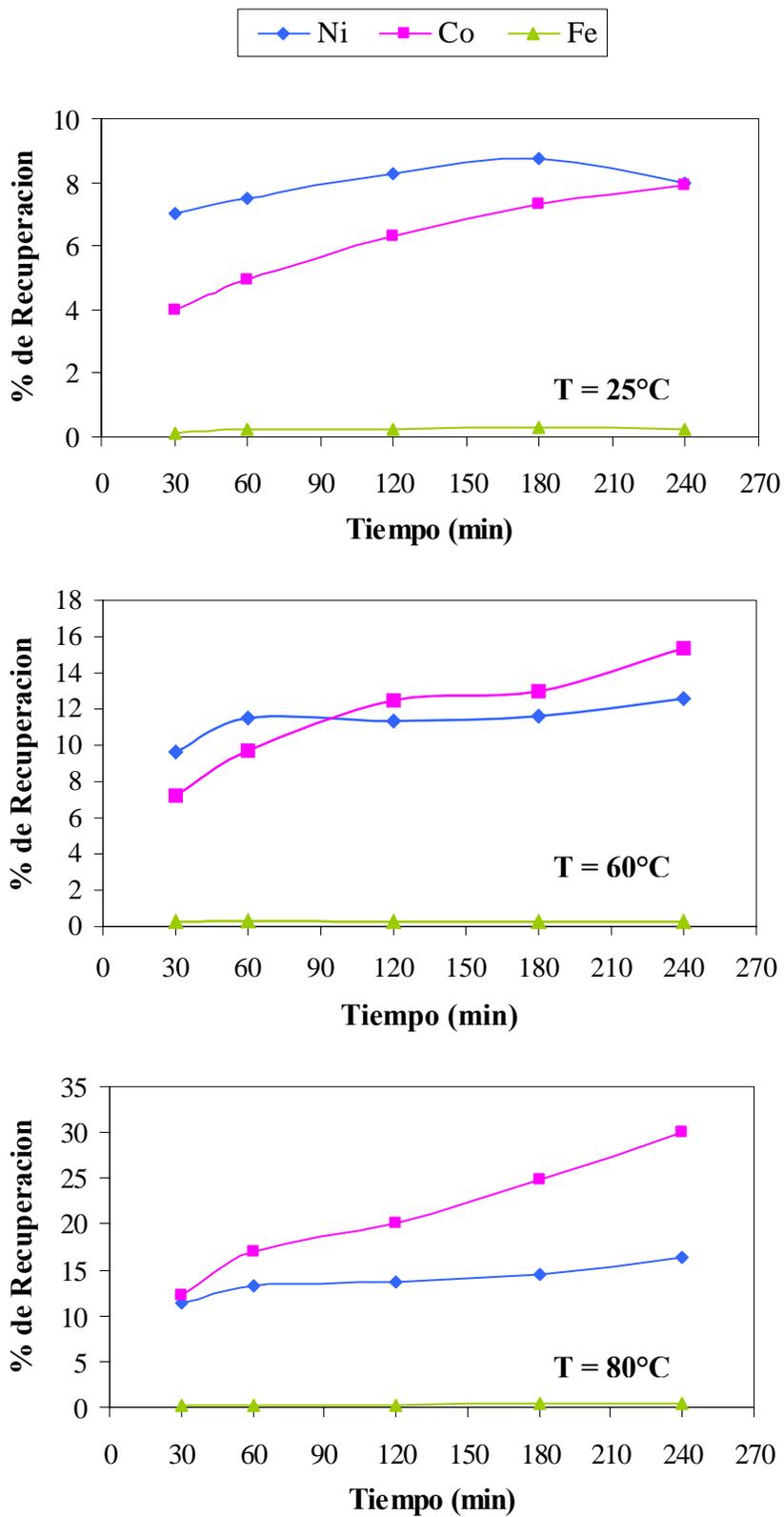


Figura 4.14 Cinética de lixiviación a las temperaturas estudiadas.

En ambos metales se observa el mismo comportamiento con respecto a la temperatura, a medida que ésta aumenta, la recuperación obtenida es mayor, gracias a que la temperatura incrementa la cinética del proceso, lo mismo ocurre en el caso del hierro como es de esperarse, los mayores rendimientos se obtienen a la temperatura de lixiviación de 80°C, además, se puede ver que la pendiente es mayor, esto quiere decir que a medida que transcurre el tiempo la recuperación es mayor, este efecto es más notorio en el caso del cobalto. A 60°C el incremento en la recuperación es menor en ambos metales, en el níquel casi no hay variación y en el cobalto hay un aumento del doble entre la primera medición y la última, esta cinética sigue siendo lenta para un proceso a escala industrial. A 25°C la recuperación de níquel es muy baja y se mantiene casi constante y el cobalto también es bajo pero la recuperación se duplica al cabo de las 4 horas con respecto a la obtenida a los 30 minutos

En la figura 4.14 se puede comparar la cinética de lixiviación a cada una de las temperaturas estudiadas, y como se ve afectada la solubilización de los metales por la temperatura. Lo más resaltante es, que a temperatura ambiente el rendimiento del níquel es mayor que el cobalto a lo largo de casi todo el proceso, y al cabo de 4 horas los porcentajes de recuperación se igualan, el rendimiento a 60°C comienza siendo mayor para el níquel y se igualan a los 90 minutos, de ahí en adelante el rendimiento se invierte, siendo mayor para el cobalto.

En el proceso realizado a 80°C ocurre lo contrario al caso de temperatura ambiente, los rendimientos de níquel y cobalto son aproximadamente iguales al inicio del proceso y luego el cobalto aumenta considerablemente, el níquel también aumenta pero muy poco en relación con el porcentaje inicial a los 30 minutos. Como ya se dijo anteriormente el cobalto es más susceptible a la solubilización por que tiene mayor afinidad electrónica que el níquel con los iones citratos, pero su cinética es más lenta que la del níquel, por eso para periodos de lixiviación cortos a temperatura ambiente, obtenemos mayores rendimientos de níquel que de cobalto como se observa en las figuras 4.6, 4.8, 4.11 y 4.14.

Lo que ocurre al aumentar la temperatura es que se acelera la cinética del proceso, entonces, la solubilización del cobalto es más rápida que la del níquel, por lo que ya se dijo acerca de la afinidad, en consecuencia los rendimientos de cobalto superan los de níquel como lo vemos en la figura 4.14.

Los valores máximos de recuperación se obtuvieron a 80°C y 4 horas de lixiviación y corresponden a 16,3% de níquel 30% de cobalto y 0,35% de hierro, estos valores prácticamente se igualan a los obtenidos por biolixiviación indirecta en 28 días aproximadamente de lixiviación (16,25% de níquel, 32,48% de cobalto y 0,35% de hierro). Esto es algo muy interesante ya que al reducir el tiempo de días a horas se pueden lograr muchos beneficios en cuanto a costos y tiempos de operación, y se evita la necesidad de trabajar en condiciones de esterilidad. Ello es estrictamente necesario cuando se trabaja con soluciones de origen biológico en largos periodos de tiempo, para evitar la contaminación y la reproducción de microorganismos que ocasionan la alteración del proceso.

4.3.2 Biolixiviación directa

El método de biolixiviación directa consiste en lixiviar el mineral en presencia del microorganismo, es decir, introducir en el mismo sistema mineral, nutrientes o sustratos y el microorganismo. A través de este método se ha reportado que se logra una gran recuperación de metales ^[2, 37 - 41, 44], sin embargo, el tiempo en que se alcanza la mayor recuperación en algunos casos sobrepasa los 20 días.

En el diseño multifactorial elaborado en este trabajo para determinar un medio optimizado para la biolixiviación, se tomó en cuenta la influencia de los sustratos empleados en la preparación de dicho medio. En ese caso se estudió la influencia de algunos subproductos agroindustriales tales como, melaza, agua de maceración de maíz, germen desgrasado de maíz, concentrín, y las sales inorgánicas KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en la acidez titulable y la recuperación de níquel, cobalto y hierro con soluciones sobrenadantes (biolixiviación indirecta).

La razón por la que el método de biolixiviación directa no fue incluido en el modelo para la recuperación de metales, fue debido a limitaciones de espacio físico y tiempo. El modelo propone 72 experimentos debido a la cantidad de factores a estudiar, estos fueron divididos en bloques de 9 ensayos cada uno, sin contar que al introducir el mineral en el sistema se está agregando una variable más, en consecuencia se incrementaría el número de ensayos arrojados por el modelo. El principal problema que se presenta es el tiempo de realización del ensayo, ya que se requiere un mínimo de 20 días para alcanzar el equilibrio del sistema, debido a que son cinéticas muy lentas, si se tiene un total de 8 bloques, ello equivaldría a un tiempo mínimo de 160 días (quizás hasta más tiempo), y se requiere una disposición de espacio para la incubación que a escala de laboratorio no está disponible

Sin embargo, para efectos de este estudio se realizó un ensayo exploratorio de biolixiviación directa, utilizando como medio de cultivo el obtenido por el modelo multifactorial. La finalidad de realizar este ensayo fue observar si se alcanzaban los valores de recuperación máxima logrados con la biolixiviación indirecta. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 4.15 y 4.16

En la figura 4.15 se distingue la selectividad del proceso de biolixiviación directa en cuanto a la recuperación de níquel y cobalto respecto al hierro. A los 9 días se obtuvo una recuperación de 13,75% de níquel, 34,53% de cobalto y 0,58% de hierro, el rendimiento de cobalto es ligeramente mayor al máximo obtenido por el método de lixiviación indirecta después de los 28 días (32,48%), en el caso del níquel es levemente menor al obtenido por biolixiviación indirecta (16,25%), y para el hierro es equivalente (0,59%). Con los valores arrojados por la biolixiviación directa se observó el mismo comportamiento reportado por Castillo y Villafañe ^[2] y Tzeferis ^[37], en el que la biolixiviación directa proporciona mayor de recuperación en menor tiempo al logrado mediante la biolixiviación indirecta.

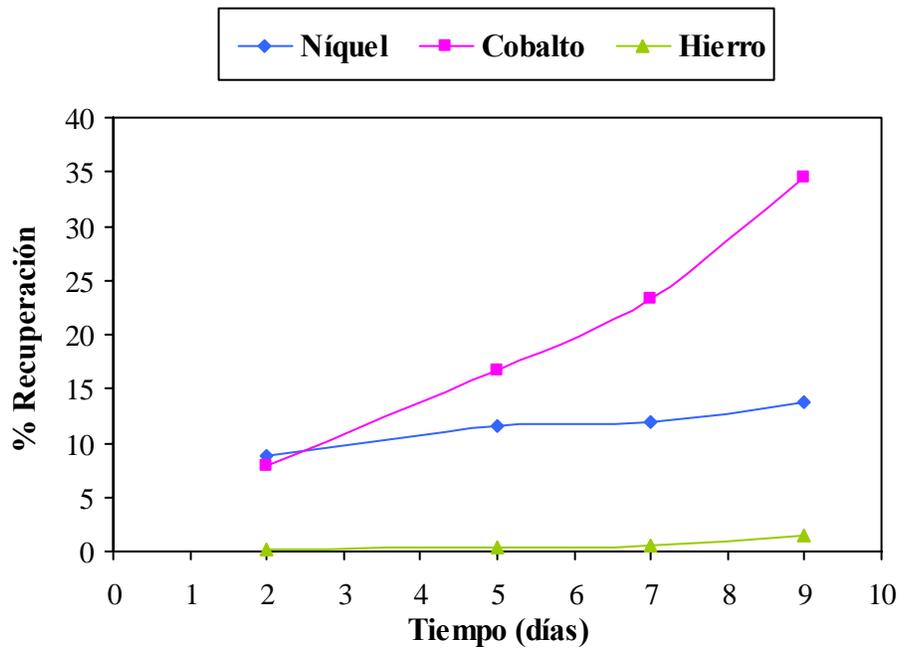


Figura 4.15. Biolixiviación directa con *A. niger*, utilizando el medio propuesto por el diseño multifactorial.

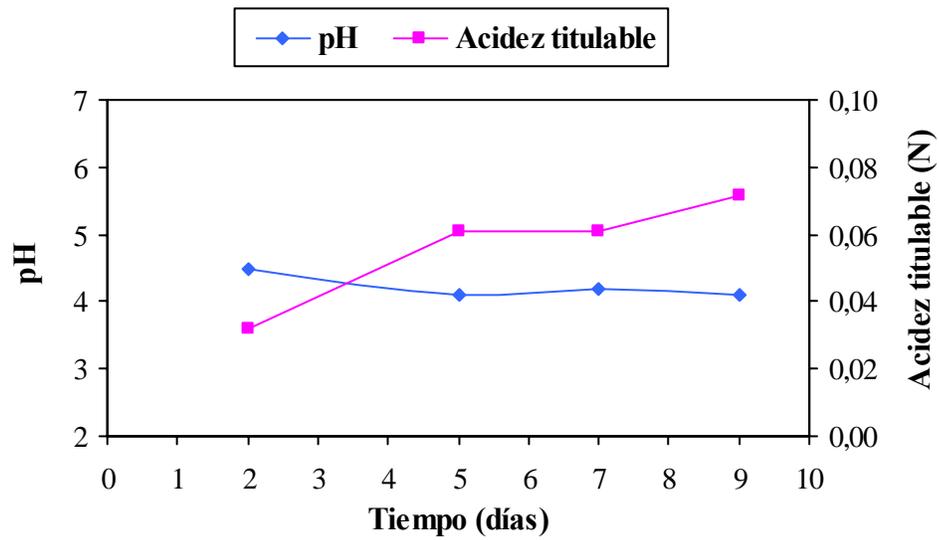


Figura 4.16. Variación de pH y acidez en la biolixiviación directa.

Adicionalmente se tomo una muestra a los 37 días para observar la influencia de un incremento considerable en el tiempo sobre la recuperación. Se obtuvo una disminución muy significativa en los valores de recuperación (50% y 75% de pérdida del níquel y el cobalto respectivamente), por lo que se recomienda un estudio más profundo de la cinética de biolixiviación directa utilizando como medio de cultivo el propuesto en este trabajo, con el fin de determinar cuando el sistema alcanza su estabilización y la máxima recuperación, así como los factores que causan la disminución en los niveles de metales disueltos después de cierto tiempo.

Se tiene que el valor de pH en el día 37 fue de 5,1, con respecto al día 9 que fue 4,1 (figura 4.16). También se tiene la presencia de ácido oxálico en la solución ya que es producido por el hongo, tal como se indicó en la determinación de la concentración de ácidos orgánicos, las concentraciones de ácido cítrico reportadas son muy bajas. En vista de que el pH del sistema se mantuvo entre 4,1 y 5,1, en presencia de ácido oxálico y con una baja concentración de ácido cítrico, el descenso en la disolución metales puede ser atribuido a la formación de oxalatos de níquel y cobalto, que son parcialmente solubles.(Castro ^[38]). También hay que mencionar las características inherentes a la laterita como lo son la propiedad de electrosorción y la capacidad de intercambio catiónico que se explicaron cuidadosamente en el estudio cinético de lixiviación indirecta, las cuales también pueden estar asociadas a las pérdidas.

4.3.3 Coeficientes de selectividad

Para el análisis cuantitativo de la selectividad en la biolixiviación indirecta y directa, se determinaron los índices de selectividad de níquel y cobalto respecto al hierro, los resultados se presentan en la tabla 4.14.

El cálculo de los índices de selectividad se realizó en función a las siguientes ecuaciones, donde [Ni], [Co] y [Fe] equivalen a los porcentajes de recuperación máxima.

$$S_{Ni/Fe} = [Ni] / ([Ni] + [Fe]),$$

$$S_{Co/Fe} = [Co] / ([Ni] + [Fe])$$

Tabla 4.14. Coeficientes de selectividad de procesos de biolixiviación estudiados.

Método de biolixiviación	Temperatura (°C)	S _{Ni/Fe}	S _{Co/Fe}	% Recuperación máxima		
				Ni	Co	Fe
Indirecta	80	0,98	0,99	16,30	30,00	0,35
Indirecta	60	0,98	0,98	12,58	15,35	0,27
Indirecta	25	0,96	0,98	16,25	32,48	0,59
Directa	25	0,90	0,96	13,76	34,54	1,52

En la tabla anterior se tiene que la biolixiviación con *A. niger* es un proceso selectivo, ello es una de las razones principales de la utilización de este método. Sin embargo, la selectividad del proceso varía según el método empleado. Como se observa en la Tabla el método de biolixiviación indirecta es más selectivo que el método de biolixiviación directa. Sin embargo, dentro de la biolixiviación indirecta, se tiene que la temperatura ejerce un efecto importante en la selectividad, ya que a medida que se incrementa la temperatura aumenta la selectividad. A 80 °C se obtuvo una recuperación de 16,3% níquel y 30% cobalto, en 4 horas y la mayor selectividad. Por su parte, a temperatura ambiente comparando los resultados obtenidos de la biolixiviación indirecta con los valores de la biolixiviación directa se tiene que la mayores rendimientos en recuperación de metales en cuanto al tiempo, a pesar de presentar menor selectividad que con por el método indirecto.

De igual forma comparando los resultados de la biolixiviación indirecta con el resultado presentado por Castillo y Villafañe ^[2], se obtiene que el máximo porcentaje de recuperación logrado fue de 20,02% Ni, 75,69% Co, en 30 días, este resultado es mayor que la recuperación alcanzada en la biolixiviación indirecta utilizando como medio de cultivo el propuesto a través del modelo multifactorial (16,25% Ni y 32,48% Co, en 42

días), a pesar de que este último es un proceso más selectivo ($S_{Ni/Fe} = 0,96$ y $S_{Co/Fe} = 0,98$), que lo ilustrado por Castillo y Villafañe ($S_{Ni/Fe} = 0,90$ y $S_{Co/Fe} = 0,97$). De esta manera se reitera que una alta selectividad no necesariamente implica una alta recuperación. Por ende, para mejorar la eficiencia del método de lixiviación biolixiviación indirecta es necesario optimizar las condiciones de de trabajo.

El resultado mas significativo fue el de la biolixiviación indirecta a 80°C, donde se apreció un porcentaje de recuperación bastante significativo (16,30% de níquel y 30 % de cobalto, en 4 horas) en tan corto tiempo de trabajo y altamente selectivo ($S_{Ni/Fe} = 0,98$ y $S_{Co/Fe} = 0,99$). En base a esa acotación, es importante señalar que la biolixiviación indirecta a 80 °C es un método que merece ser estudiado a mayor profundidad, ya que proporciona resultados importantes reduciendo al mínimo los tiempos del proceso y aumentando la selectividad. Esto es una alternativa de mucho potencial, porque una de las desventajas de los procesos de biolixiviación es que la cinética de lixiviación es muy lenta sobre todo a temperatura ambiente, ya que tarda más de 20 días en alcanzar el equilibrio.

4.3.4 Precipitación

Para la precipitación de níquel y cobalto de los licores de lixiviación se utilizó el método uno de las vías recomendadas por Rangel ^[27]. Esta vía consiste en la adición de CO₂ con el fin de promover la precipitación, la razón por la que se escogió este método de precipitación fue porque en el estudio realizado por Rangel ^[27] resulto ser el más efectivo. Además sugiere que la temperatura puede favorecer la precipitación. Por esta razón se escogieron 3 temperaturas 3, 25 y 60 °C. El tiempo durante el cual se inyectó CO₂ en las muestras fue de 2 horas y 30 min. para cada muestra. La determinación de la cantidad de níquel y cobalto precipitado fue por AAS, para ello se midió la concentración antes y después de inyectar CO₂ a las muestras.

Después de transcurrido el tiempo del ensayo no se observó la formación de precipitado en ninguna de las muestras. Los resultados obtenidos por AAS confirmaron que

en todas las muestras la variación entre los ppm iniciales y los ppm finales de níquel y cobalto fue insignificante, dicha variación puede ser tomada como error del instrumento, por lo que se puede afirmar que con las condiciones estudiadas no se logró la precipitación de níquel y cobalto de los licores provenientes de la biolixiviación, bajo estas condiciones de trabajo. Sin embargo, se recomienda ajustar otros parámetros como el pH durante la precipitación, utilizar una mezcla de gases y un incremento en la temperatura (por ejemplo, 80°C) para tratar de favorecer la precipitación de estos metales en dichos licores. Lo anterior indica que el método de precipitación propuesto por Rangel ^[27] no es eficiente en el caso de licores obtenidos por biolixiviación bajo las condiciones estudiadas.

4.3.5 Balance técnico-económico

Los costos generados durante los procesos de lixiviación o biolixiviación ejercen una gran influencia al momento de estudiar alternativas en la recuperación de metales. Los costos involucrados en el proceso estudiado en este trabajo se refieren en forma general al consumo de sustratos para el crecimiento del microorganismo:

- Costo de la melaza: 329,66 Bs./Kg.
- Costo del germen desgrasado de maíz: 358,5 Bs./Kg.
- Costo del concentrín 21: 415,8 Bs./Kg.
- Costo del agua de maceración de maíz: 487,5 Bs./L
- Costo del KH_2PO_4 : 97.152 Bs./Kg.
- Costo del $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 85.100 Bs./Kg.
- Costo del $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 197.800 Bs./Kg.
- Valor del níquel: 28.000 Bs./Kg.
- Valor del cobalto: 112.500 Bs./Kg.
- Valor del ácido cítrico: 56.350 Bs./Kg.

Tabla 4.15. Costos de los medios de cultivo.

Costo del medio de cultivo	Costo (Bs./L)
Medio optimizado	122,69
Medio de sales optimizado por Coto ^[41]	26745,64

En la tabla 4.15 se aprecia claramente la considerable disminución del costo del medio de cultivo utilizado en este trabajo en comparación al medio empleado en el trabajo de Castillo y Villafañe ^[2], que es el medio de sales optimizado por Coto ^[41]. A pesar de que no se obtuvo una recuperación tan alta como la reportada por Castillo y Villafañe ^[2], es evidente la importancia de considerar el método de la recuperación de metales utilizando *A. niger* en medios de cultivos de subproductos agroindustriales. Por otro lado en la tabla 4.16 se aprecia la relación de costos para los métodos de biolixiviación directa e indirecta, realizados a temperatura ambiente, sin temperatura ni recirculación del licor y la pulpa.

Tabla 4.16. Costos para el método de biolixiviación directa e indirecta (para 100ml de sobrenadante).

Concepto	Método indirecto.	Método directo.
g totales del medio	11,309	11,309
g. de Ni obtenidos	$8,87 \times 10^{-3}$	$9,39 \times 10^{-3}$
g. de Co obtenidos	$21,64 \times 10^{-3}$	$2,18 \times 10^{-3}$
g. de medio necesarios para obtener 1g de Ni	1464,37	1383,28
g. de medio necesarios para obtener 1g de Co	7920,12	5958,25
Costo del medio (Bs./g)	381,64	381,64
Costo para 1g. de Ni (Bs.)	558.904,15	527.953,14
Costo para 1g. de Co (Bs.)	3.022.068,05	2.274.082,08

Como se puede observar la inversión necesaria para obtener un gramo de níquel y cobalto, tanto para el método directo como para el indirecto es bastante alta. Sin embargo; esta inversión disminuye un poco si se realiza por el método directo. La razón principal por la que estos costos son altos, es el empleo de sales inorgánicas comerciales en la preparación del medio de cultivo. Estas sales son las mismas empleadas por Castillo y Villafañe ^[2] y por Coto ^[41], la diferencia entre el medio utilizado en los trabajos de Castillo y Villafañe es que se sustituye la fuente de carbón y nitrógeno (sacarosa y extracto de levadura, los cuales son costosos) por subproductos agroindustriales, en consecuencia el costo al preparar el medio de cultivo disminuye aproximadamente en un 65%.

A pesar que la recuperación de metales lograda con el medio de cultivo propuesto por el diseño multifactorial que la obtenida en el trabajo de Castillo y Villafañe, es factible utilizar el medio de cultivo propuesto en el estudio realizado en este trabajo. La razón es que se logra una recuperación aproximadamente 4% Ni y 50% Co menor a la lograda por Castillo y Villafañe, generando menos de la mitad del costo. Sin embargo es imprescindible mejorar y optimizar los parámetros y las condiciones estudiadas durante la realización de este trabajo, tales como la temperatura de lixiviación, concentración de los sustratos para el medio de cultivo, tiempo de fermentación y tiempo de lixiviación, entre otros, para obtener mejores beneficios.

Para ello es necesario realizar un estudio en el que utilicen como sustratos fermentables únicamente subproductos agroindustriales, ya por ejemplo, la melaza y el agua de maceración de maíz poseen gran cantidad de sales inorgánicas, de esta forma el costo del medio se convierte en 1,25 Bs./g. (200% menos que el valor del medio propuesto por el diseño multifactorial), ahora suponiendo que se obtiene el mismo grado de recuperación mencionado en la Tabla 4.16, los costos generados para la obtención de 1g. de Ni y 1g. de Co serían 1729,23 Bs. Y 7448,39 Bs., respectivamente.

Sin embargo, esta suposición no es del todo viable, ya que cualquier cambio que se realice durante la preparación del medio de cultivo afecta los resultados predichos por el modelo, por ende los porcentajes de recuperación obtenidos varían considerablemente.

4.3.5 Ruta biotecnológica recomendada

En base a los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo la ruta biotecnológica recomendada para un proceso a escala industrial es el método de biolixiviación indirecta, a altas temperaturas a presión atmosférica, ya que se comprobó que con a una temperatura de 80 °C se aumenta la cinética considerablemente y se alcanzan altas recuperaciones en cortos tiempo. El uso de la temperatura incrementa los costos del proceso pero reduce el tiempo de días (como ocurre a temperatura ambiente) a horas lo que evitaría el paso previo de esterilización, el cual requiere una temperatura de 121°C y 18 psi de presión, esto a escala industrial es una complicación enorme.

En cuanto a la obtención de los sobrenadantes utilizando las concentraciones del medio de cultivo propuesto por el diseño multifactorial es importante un pH inicial igual a 5 y un tiempo de fermentación de 7 días, con el fin de obtener la máxima concentración de ácidos orgánicos. El tiempo de lixiviación utilizado podría ser de 4 horas, sin embargo, es recomendable realizar una cinética de lixiviación para determinar en que tiempo se alcanza la máxima recuperación bajo estas condiciones. Otra ventaja de este método es que no es necesaria la manipulación del microorganismo durante largos periodos de tiempo.

Adicional a la alta recuperación obtenida a través de este método en tan corto tiempo, se tiene una gran selectividad durante este proceso, por lo que se logran dos objetivos importantes durante el proceso de biolixiviación.

También es recomendable estudiar la factibilidad de aplicar el método de biolixiviación directa *in situ* ya que no requiere gran inversión en equipamiento tecnológico y se ha determinado que se obtienen altos rendimientos de níquel y cobalto selectivamente de hierro.

5. CONCLUSIONES

- El uso de subproductos agroindustriales como sustratos fermentables por *Aspergillus niger* es una alternativa factible en el proceso de biolixiviación de níquel y cobalto de laterita ferruginosa del estado Cojedes.
- La biolixiviación de laterita con *Aspergillus niger*, por los métodos directo e indirecto, es un proceso altamente selectivo en la recuperación de níquel y cobalto respecto al hierro. Siendo el método indirecto más selectivo que el método directo.
- El máximo de recuperación obtenido por el método indirecto fue de 16,25% Ni y 32,48% Co en 49 días, y en el método directo fue de 13,76% Ni y 34,54 Co en 9 días. Por lo que se puede decir, que el método directo es más eficiente.
- El cobalto presente en el mineral laterítico es más susceptible a la biolixiviación con ácido cítrico y demás productos metabólicos de la fermentación fúngica con *A niger* que el níquel.
- El tiempo óptimo del proceso de biolixiviación indirecta es de 28 días, después del cual los incrementos en la recuperación de níquel y cobalto fueron insignificantes.
- La temperatura aumenta la cinética de lixiviación del níquel y el cobalto, obteniéndose altos rendimientos en tiempos menores, la selectividad también se incrementa.
- El ácido cítrico es el principal responsable en la disolución de metales en el mineral laterítico durante la biolixiviación con *Aspergillus niger*, pero también se comprobó que otros metabolitos intervienen en el proceso de solubilización.
- La cinética del proceso de disolución del níquel es mayor que la del cobalto en los primeros días del proceso de biolixiviación indirecta a temperatura ambiente, lo mismo ocurre a altas temperaturas en las primeras horas.

- La recirculación del licor con mineral nuevo incrementa considerablemente la concentración de níquel en solución, alcanzándose mayores concentraciones del metal que las obtenidas por biolixiviación indirecta (70 % más)
- El medio de cultivo optimizado, compuesto de subproductos agroindustriales resulta mucho más económico que los medios estándares utilizados para biolixiviación con *Aspergillus niger*.
- La utilización de sales inorgánicas comerciales en la preparación del medio de cultivo para el crecimiento de *Aspergillus niger* incrementa los gastos de extracción de metales.
- El *Aspergillus niger* requiere un mínimo de siete días de incubación en el medio de cultivo descrito en este trabajo, para alcanzar la mayor acidez y concentración de ácido cítrico.
- El método de precipitación utilizando sólo CO₂ no es efectivo en licores provenientes de biolixiviación a las temperaturas estudiadas.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una caracterización de la materia prima utilizada en la preparación del medio de cultivo, con el fin de conocer la influencia de todos los elementos presentes, en el crecimiento de *A. niger* y la producción de ácidos orgánicos.
- Es necesario realizar un estudio de biolixiviación, en donde los sustratos empleados en la preparación del medio, sean únicamente subproductos agroindustriales, con la finalidad de reducir los costos para determinar la aplicabilidad de este método a gran escala.
- Para optimizar la biolixiviación indirecta se recomienda una variación en la temperatura, de esta forma se podrá obtener una mayor extracción de metales y disminuir el tiempo de lixiviación.
- Se recomienda un estudio más profundo de la biolixiviación directa a fin de optimizar y controlar todos los parámetros del proceso, ya que este método presenta altas recuperaciones y grandes ventajas para su aplicación a nivel industrial.
- Es recomendable caracterizar todos los productos metabólicos del proceso de fermentación fúngica con *A. niger*, con el fin de establecer la influencia de los mismos en la disolución de metales.
- En cuanto a la precipitación de níquel y el cobalto, se requiere buscar otras vías de precipitación, las mismas pueden incluir la variación de pH, mezclas de gases y variación de temperatura, con la finalidad de encontrar un método más eficiente.
- Por último se recomienda realizar un estudio de las propiedades de intercambio catiónico y electrosorción de metales en la ganga laterítica lixiviada con ácidos orgánicos quelantes, a fin de determinar el mecanismo responsable de las pérdidas reportadas en el proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://www.pdvsa.com/lexico/museo/minerales/niquel.html>. Consultado: 11/11/04.
2. CASTILLO, G; VILLAFANE C (2003): *Recuperación de Ni y Co de laterita ferruginosa del estado Cojedes a través de la biolixiviación con cultivos de **Aspergillus niger***, Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
3. <http://www.prodigyweb.net.mx/degcorp/Quimica/NIquel:htm>. Consultado el 20/11/04.
4. AME MINERAL ECONOMICS. Nickel. May 2001.
5. DON LEET, L (1977): *Fundamentos de geología física*. Editorial Limusa. Tercera edición. México, pp.98-110.
6. <http://www.uclm.es/users/higuera/yymm/YM5.html>. Consultado: 18/12/04.
7. AMERICAN SOCIETY, ASM HANDBOOK (1990): *Properties Selection: Nonferrous Alloys and Special-Purpose Materials*. Volumen 2, pp.428.
8. http://es.wikipedia.org/wiki/tabalperi%C3%B3dica_de_los_elementos. Consultado: 19/11/04.
9. http://www.adi.uam.es/docencia/elementos/spv21_sinmarcos/elementos/co.html. Consultado: 15/12/04.
10. SZHZYGIEL Z, TORRES A (1984): *Metalurgia no ferrosa*. Editorial Limusa. México. pp. 210.
11. BALLESTES, Antonio (1992): *Metalurgia extractiva*. Editorial Síntesis. Volumen 2. pp. 268-394.

12. VAN ARSDALE, George (1965): *Hidrometalurgia de metales comunes*. Editorial Hispano Americana. México. pp. 48-53.
13. DE LA CUADRA, Antonio (1995): *Nuevas tendencias en los procesos de obtención de metales*. Guayaquil. p 79-94.
14. WRIGHRT, J: K (1973): *The segregation process*. Min. SCI. Engng. Vol 5. N° 2
15. CANON, M H (1950): *Fundamentals and practical factors in ammonia leaching of nickel and cobalts ores*. Volumen 2. Editions JMetls, New York. pp. 67.
16. <http://www.ilustrados.com/publicaciones.com/EpZZpVullFjLXLPctM.html>
Consultado: 11/01/05.
17. COTO Orquídea; DORTA Blas (2002): *Perspectivas y desafíos de la biotecnología en la industria minera-metalúrgica*. Curso. Universidad Central de Venezuela.
18. <http://es.wikipedia.org/wiki/Microorganismo>. Consultado: 12/02/05.
19. MADIGAN, Michael; MARTINKO, Jhon; PARKER, J (1998): *Biología de los microorganismos*. Editorial Prentice Hall, 8ª edición. pp. 135-137,488-501. España.
20. SCRAGG, Alan (2000): *Biotecnología para ingenieros, sistemas biológicos en sistemas tecnológicos*. Editorial Limusa. México. pp. 189-230, 334-354.
21. MEJÍAS, Luisa (2003): *Toxinas de *Aspergillus* y *Fusarium* y sus implicaciones en alimentos*, Trabajo Especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
22. TREMARIAS, Maria (1997): *Producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* a partir del jugo de nepe* Trabajo Especial de Grado, Universidad Simón Bolívar. Caracas.

23. <http://www.sci.muni.cz/microb/Miniatlas/asp-ni.htm> Consultado: 10/02/05.
24. <http://www.biojen.com/Equisept/scientific.htm> Consultado: 23/03/05.
25. http://www.tilex.nex/tilex_moldmildew_advertorial.pdf Consultado: 10/04/05.
26. http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_c%C3%ADtrico Consultado: 18/08/05.
27. RANGEL, Carlos (2003): *Lixiviación dinámica de Ni y Co a presión atmosférica de laterita utilizando ácido sulfúrico y cítrico con posterior precipitación selectiva*. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela.
28. MATTEY, M. "The productions of organic acids". *Critical Reviews in Biotechnology*. 1992. N° 12. pp. 87-132.
29. RUGSASSEL S., MORIKAWA S., KIRIMURA K., USAMI S. "Simulation of citric acid production in *Aspergillus niger* by addition of viscous substances in shake culture". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995. N° 42. pp. 839-843.
30. QUITERO R, Rodolfo (1990): *Ingeniería bioquímica. Teoría y aplicaciones*. Editorial Alambra Mexicana. México.
31. CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA: *Guía de Microbiología*. Cortesía de la Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
32. Información por vía electrónica de Concentrín 21: ficha técnica y cotización. Perdomo Gustavo Alfonso Rivas.2005.
33. PARRA, M; PEDRAZA, J (1985): "Recuperación del níquel laterítico por lixiviación bacterial". *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, N° 2.

34. BALLESTER, A; MUÑOZ, J (1995): "A study of bioleaching of spanish uranium ore Part I, II, III", *Hydrometallurgy*, N° 38.
35. BOSECKER K, FEEM (1997): *Microbial review*. Elsevier, N° 20, pp 591.
36. BETANCOURT, Edgar; VIVAS, Renny (2002): *Estudio de la extracción de Ni y Co en laterita por medio de lixiviación ácida en columnas*. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
37. TZEFERIS, P (1994): "Leaching of a low grade hematitic laterite ore using fungi and biologically produced acid metabolites". *International journal of mineral processing*. N° 42, pp 267-283.
38. CASTRO, I; FIETTO, J; VIEIRA, R; TROPIA, M; CAMPOS, L; PANIAGO, E, BRANDAO, R (1994): "Bioleaching of zinc and nickel from silicates using *Aspergillus niger* cultures". *Hydrometallurgy*. N° 36, pp 345-360.
39. VALIX, M; USAI, F; MALIK, R (2000): "Fungal bio-leaching of low grade laterite ores". *Mineral Engineering*. Vol 14, N° 2, pp 197-203.
40. COTO, O; BRUGERA, N; ABIN, L; GAMBOA, J; GOMEZ, Y (2001): "Bioleaching of cuban nickeliferous serpentinite. Part I". *Biohidrometallurgy*.
41. MULLIGAN, C; KAMALI, M; GIBBS, F (2004): "Bioleaching of heavy metals from a low-grade mining ore using *Aspergillus niger*". *Journal of Hazardous Materials*. N° 110, pp 77-84.
42. FARIA, Mery (2001): *Diseño y optimización de un sistema de dos fases para la producción del hongo entomopatógeno *Nomurea rileyi**. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela.

43. TZEFERIS, P (1994): "Leaching of nickel and iron from greek non-sulphide nickeliferous ores by organics acids" *Hydrometallurgy*. N° 32, pp 345-360.
44. SUKLA, L; PANCHANADIKAR, V (1993): "Bioleaching of lateritic nickel ore using a heterotrophic micro-organism". *Hydrometallurgy*. N° 32. pp 373-379.
45. VALIX, M; TANG, J; CHEUNG, W (2001): "Effects of mineralogy on the biological leaching of nickel laterite ores". *Minerals Engineering*. Vol 14. pp 1629-1635.
46. VALIX, M; USAI, F; MALIK, R (2000): "The electro-sorption properties of nickel on a laterite gangue leached with an organic chelating acid". *Minerals Engineering*. Vol 14. pp 205-215.
47. RUS, José: (1999): *Clay Supported Extractants for Hydrometallurgical Applications*. Trabajo de tesis doctoral. University of Hertfordshire.UK.

APENDICES

APENDICE A

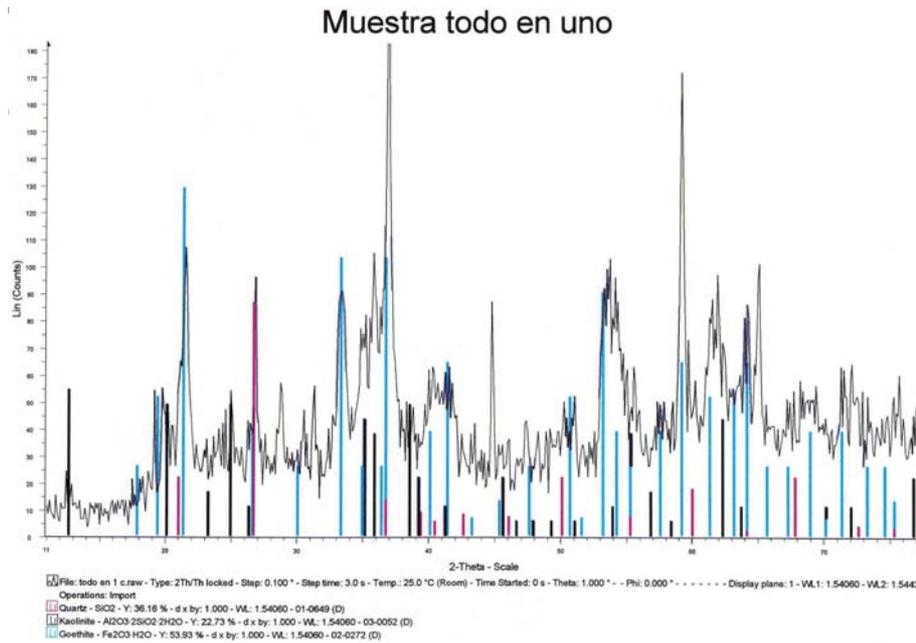


Figura A.1 Difractograma del mineral todo en uno para las fases de cuarzo, caolinita y goetita.

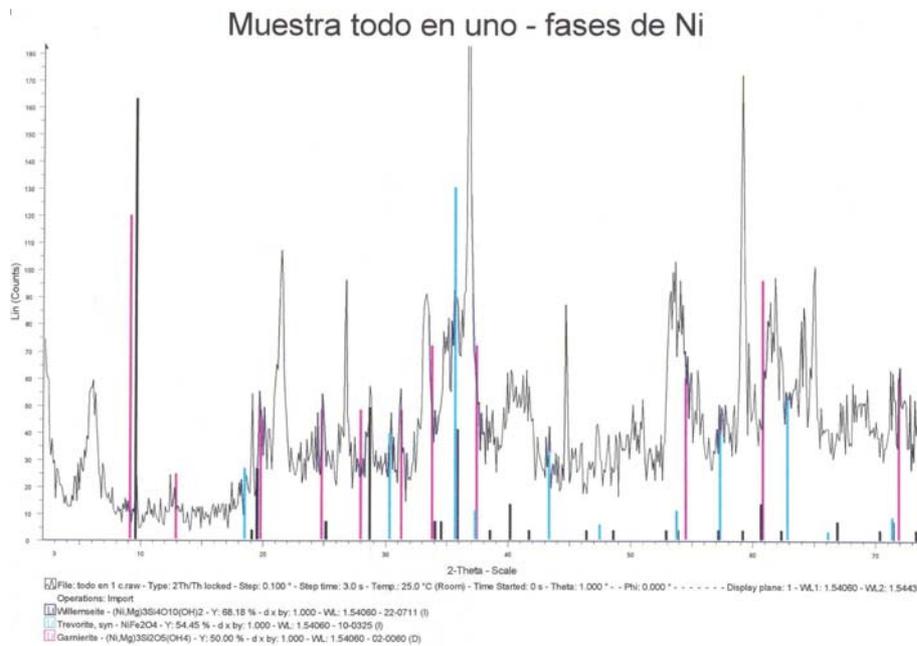


Figura A.2 Difractograma del mineral todo en uno para las fases de níquel: willemsite, trevorita y garnierita.

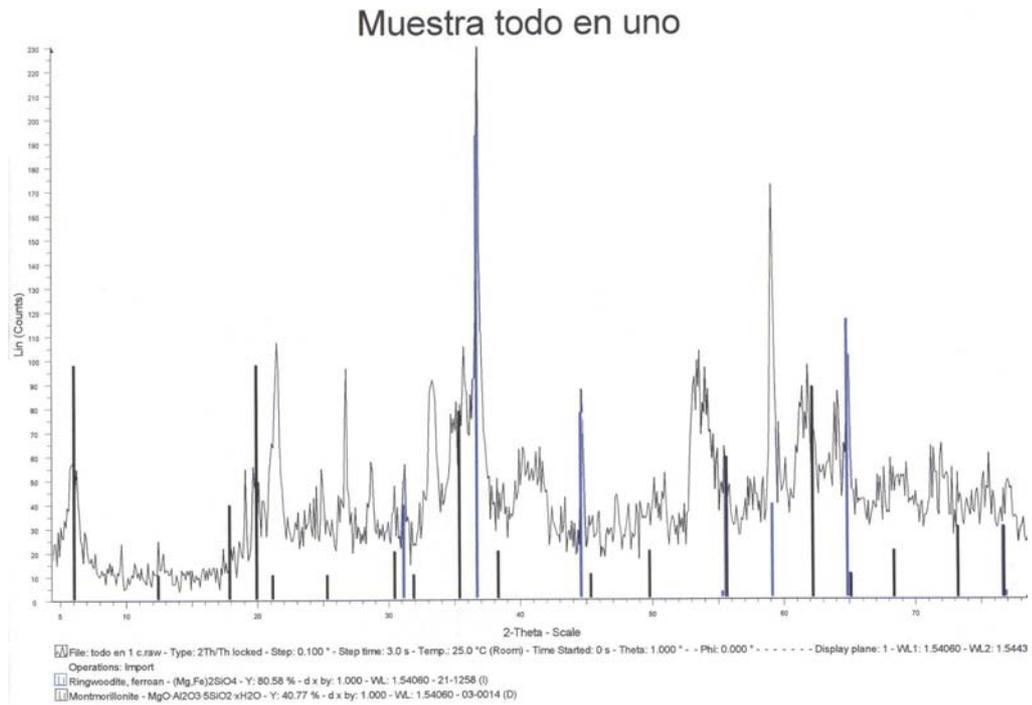


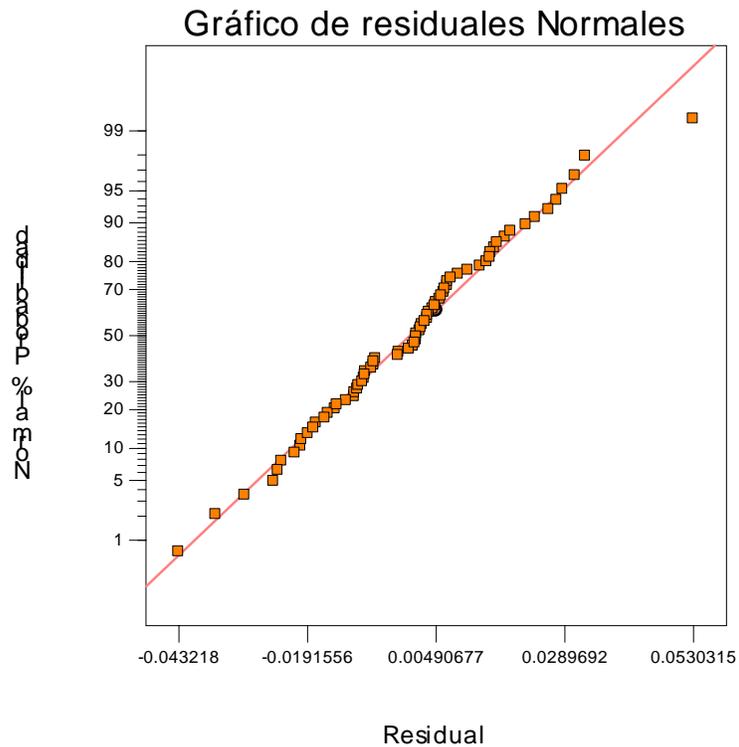
Figura A.3 Difractograma del mineral todo en uno para las fases ringwoodita ferroan y montmorillonita.

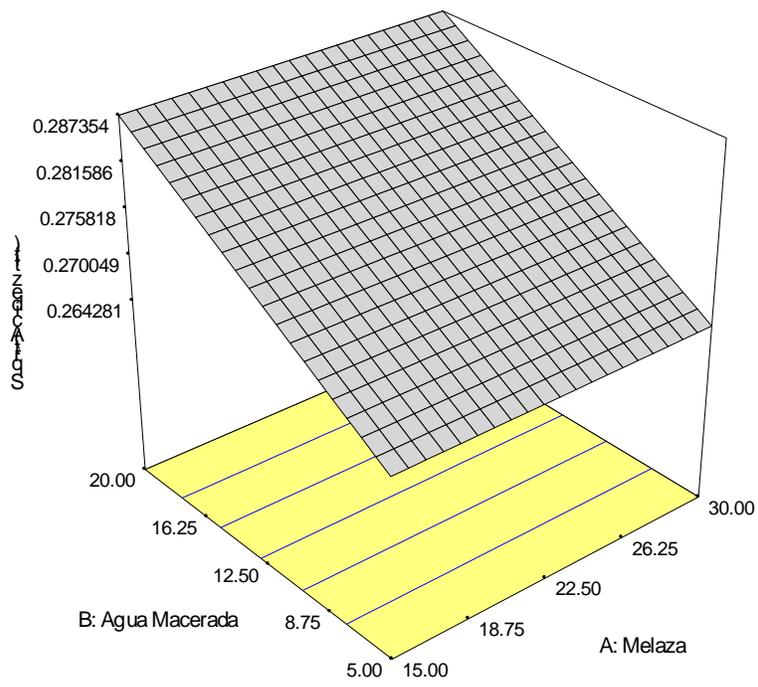
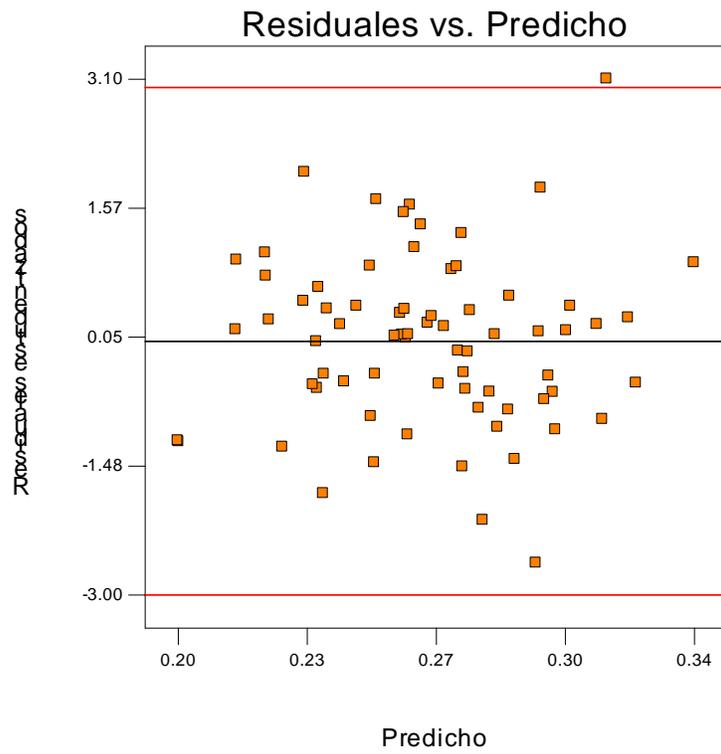
APÉNDICE B

Variable dependiente: (Acidez)^{1/2}

Tabla B.1 Análisis de varianza de Acidez titulable

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F	Prob>F	
Block	0.028	7	3.949E-003			
Model	0.034	3	0.011	32.16	< 0.0001	significativo
<i>B</i>	8.518E-003	1	8.518E-003	24.44	< 0.0001	
<i>C</i>	0.021	1	0.021	61.32	< 0.0001	
<i>E</i>	3.734E-003	1	3.734E-003	10.71	0.0018	
Curvatura	1.294E-004	1	1.294E-004	0.37	0.5447	No significativo
Residual	0.021	60	3.485E-004			
Total	0.082	71				





Superficie de respuesta de acidez titulable

Tabla B.2 Valores para acidez titulable

Factor	Ejes	Valor obtenido	Menor	Mayor
Melaza	X		15.00	30.00
Agua Macerada	Y		5.00	20.00
Germen		40.00	20.00	40.00
Concentrin21		39.91	20.00	40.00
KH ₂ PO ₄		0.25	0.25	1.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.10	0.10	0.50
MnSO ₄ ·H ₂ O		0.20	0.05	0.20

Gráfico de un solo factor

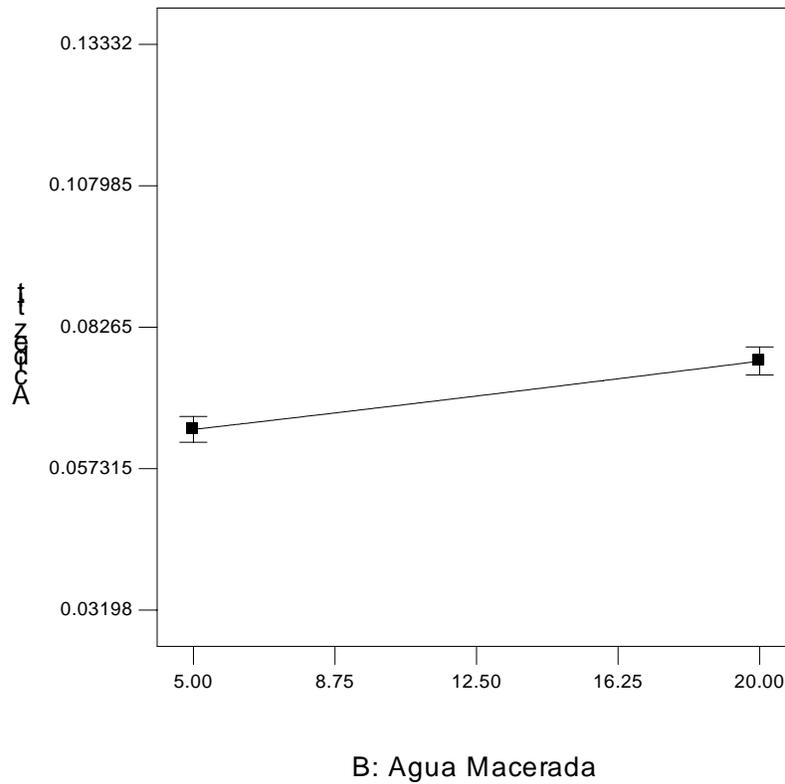
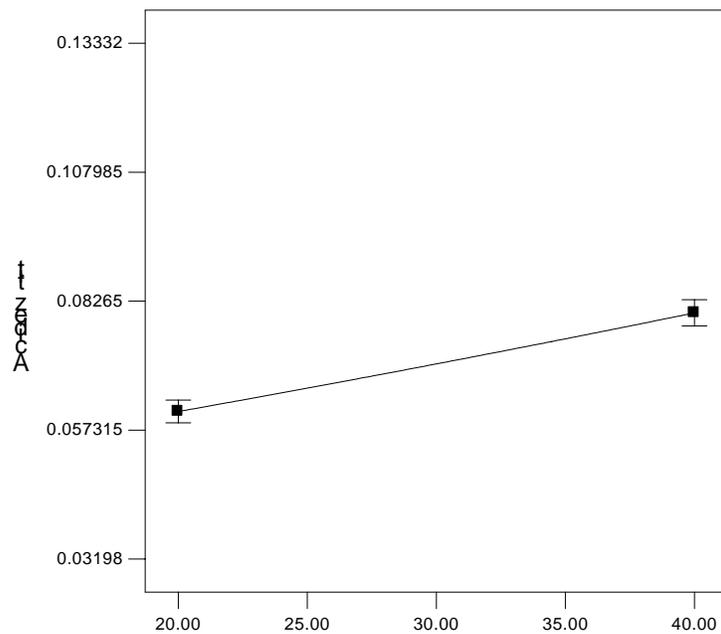
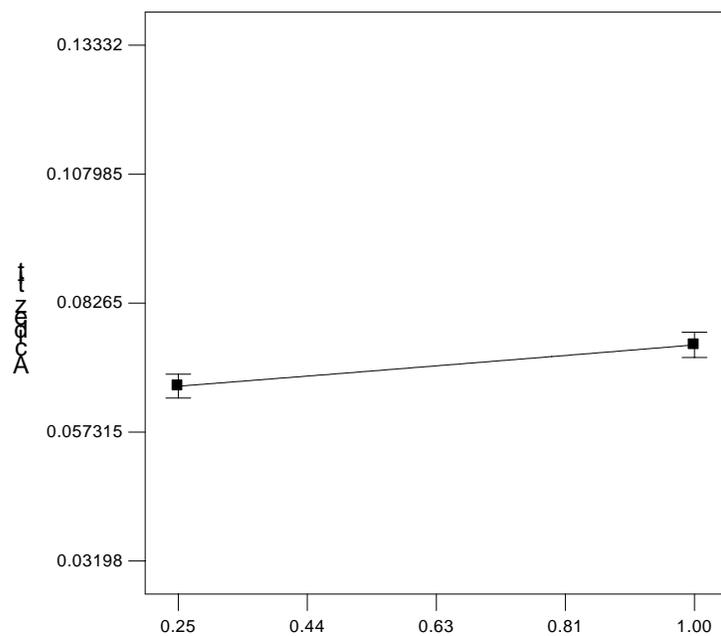


Gráfico de un solo factor



C: Germen

Gráfico de un solo factor



E: KH2PO4

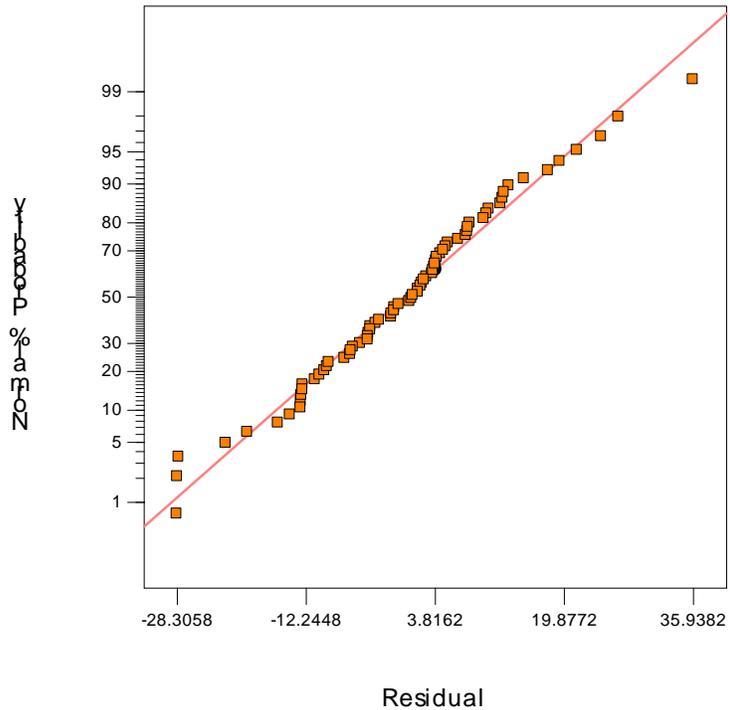
Variable Dependiente: (Niquel)^{2,12}

Tabla B.3 Análisis de la varianza para (Niquel)^{2,12}

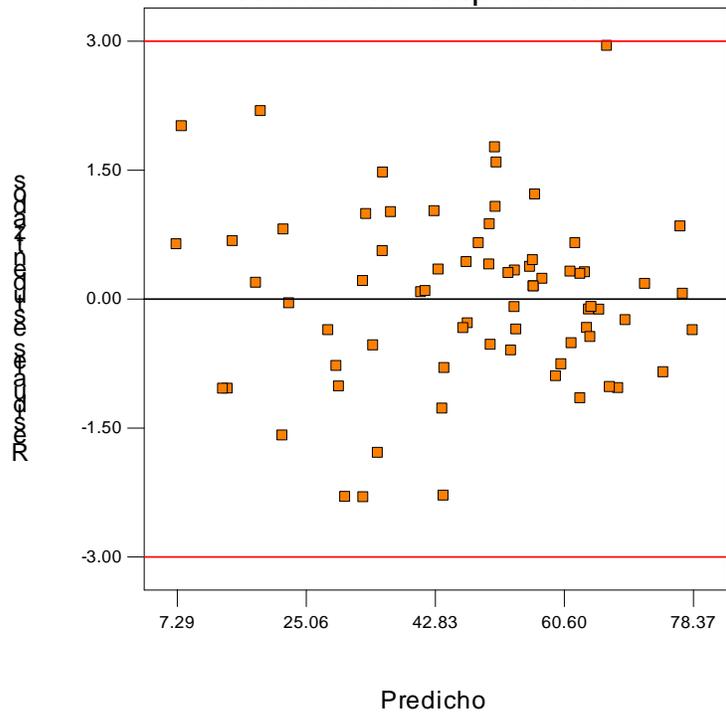
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F	Prob>F	
Bloque	14575.80	7	2082.26			
Modelo	7729.90	8	966.24	4.92	0.0001	Significativo
<i>A</i>	<i>1311.61</i>	<i>1</i>	<i>1311.61</i>	<i>6.67</i>	<i>0.0125</i>	
<i>B</i>	<i>13.31</i>	<i>1</i>	<i>13.31</i>	<i>0.068</i>	<i>0.7957</i>	
<i>C</i>	<i>249.72</i>	<i>1</i>	<i>249.72</i>	<i>1.27</i>	<i>0.2645</i>	
<i>D</i>	<i>1305.16</i>	<i>1</i>	<i>1305.16</i>	<i>6.64</i>	<i>0.0127</i>	
<i>E</i>	<i>136.49</i>	<i>1</i>	<i>136.49</i>	<i>0.69</i>	<i>0.4082</i>	
<i>G</i>	<i>138.50</i>	<i>1</i>	<i>138.50</i>	<i>0.70</i>	<i>0.4048</i>	
<i>BE</i>	<i>2449.93</i>	<i>1</i>	<i>2449.93</i>	<i>12.47</i>	<i>0.0008</i>	
<i>CG</i>	<i>2125.19</i>	<i>1</i>	<i>2125.19</i>	<i>10.81</i>	<i>0.0018</i>	
Curvatura	22.67	1	22.67	0.12	0.7354	No significativo
Residual	10808.88	55	196.53			
Total	33137.25	71				

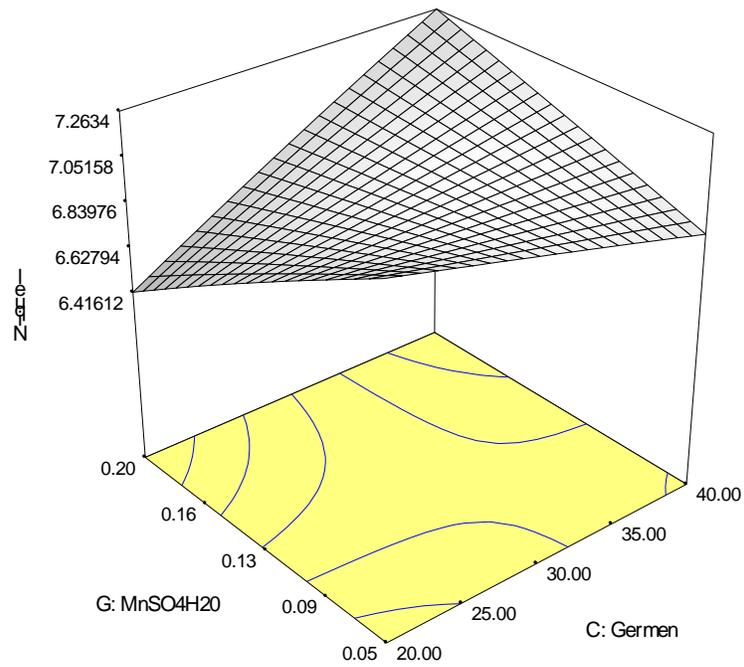
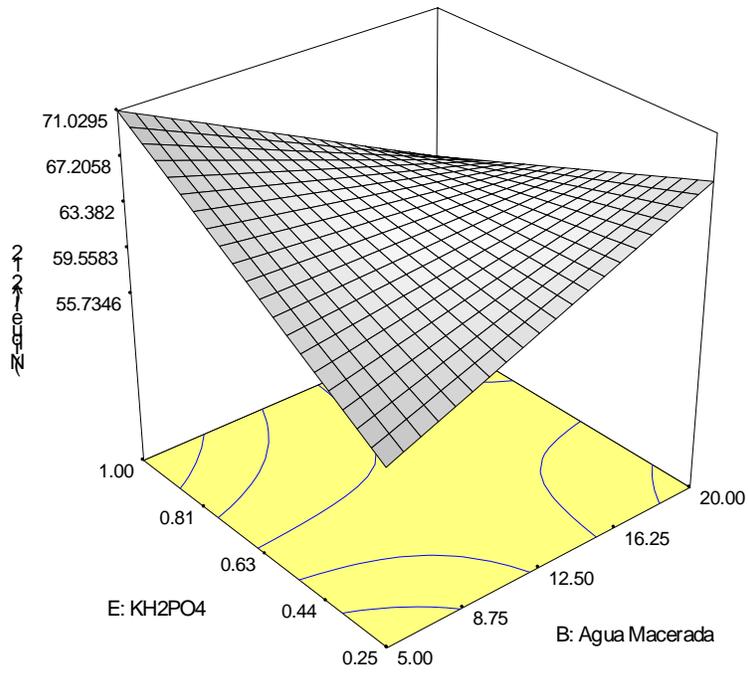
Valores de "Prob > F" menores a 0.0500 indican que los términos del modelo son significativos

Gráfico Norma de Residuales



Residuales vs. predichos





Superficies de respuesta del níquel

Tabla B.4 Valores para el níquel

Factor	Ejes	Valor obtenido	Menor	Mayor
Melaza		29.78	15.00	30.00
Agua Macerada	X		5.00	20.00
Germen		40.00	20.00	40.00
Concentrin21		39.91	20.00	40.00
KH ₂ PO ₄	Y		0.25	1.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.10	0.10	0.50
MnSO ₄ ·H ₂ O		0.20	0.05	0.20

Gráfico de un factor

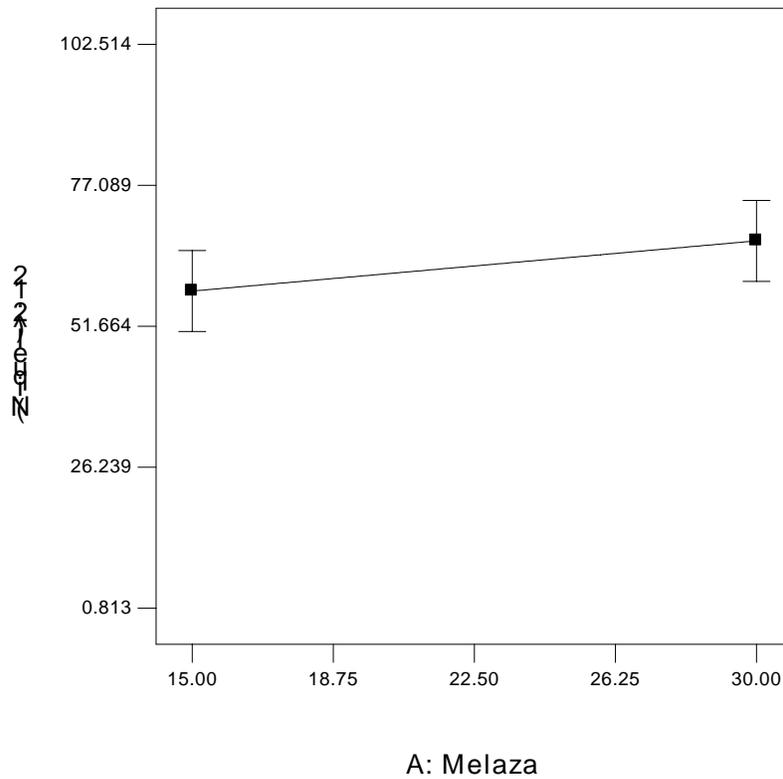
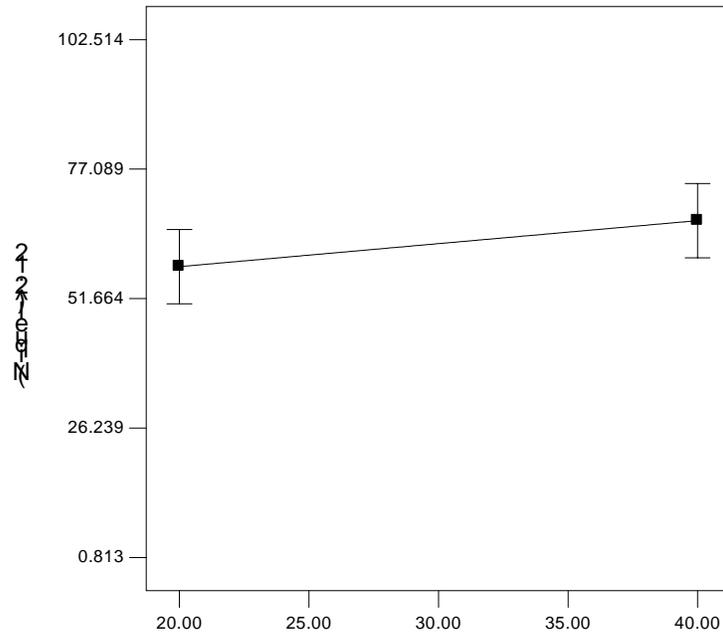
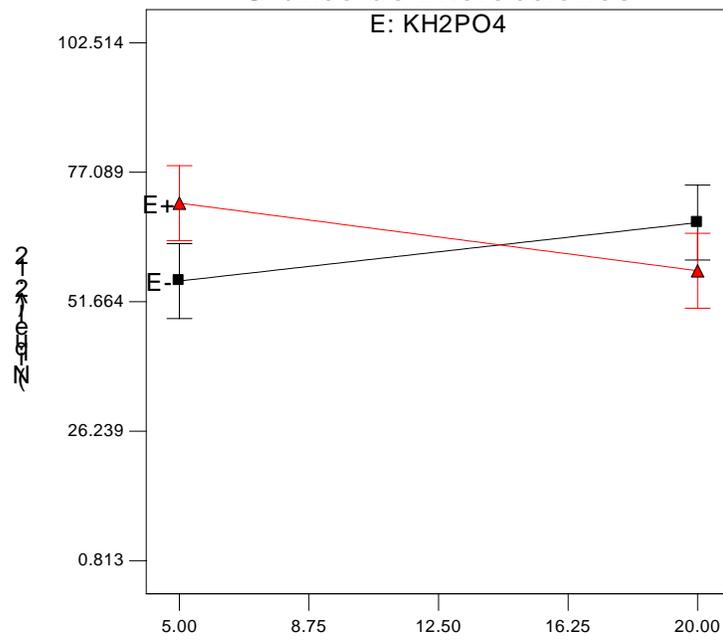


Gráfico de un factor



D: Concentrin21

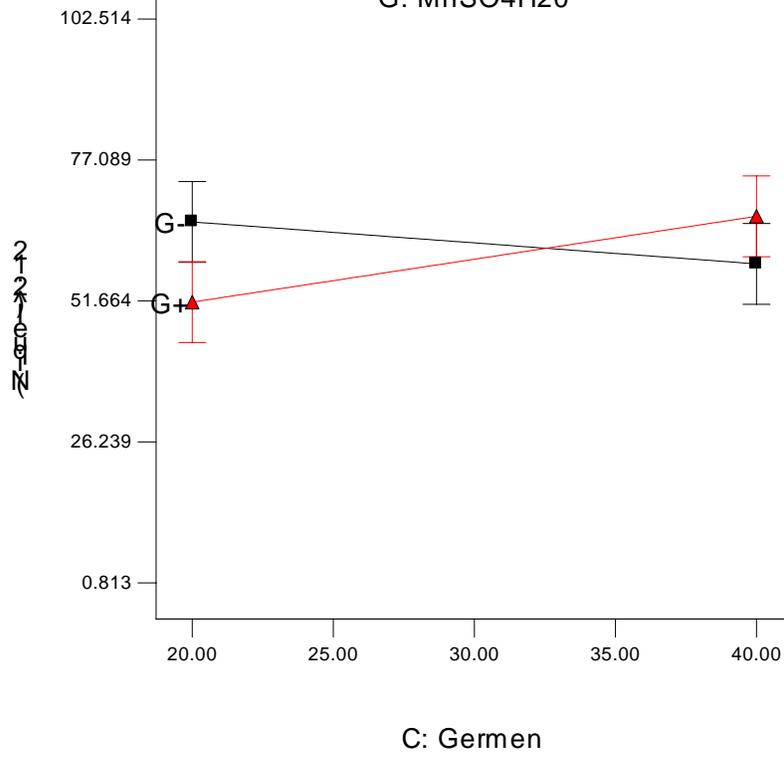
Gráfico de interacciones



B: Agua Macerada

Gráfico de interacciones

G: MnSO4H2O



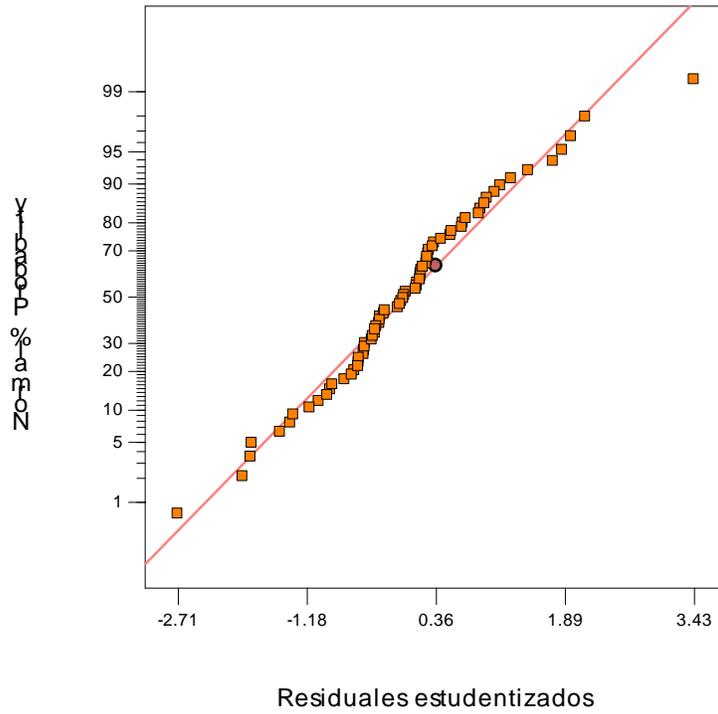
Variable dependiente Cobalto

Tabla B.5 Análisis de la varianza para Cobalto

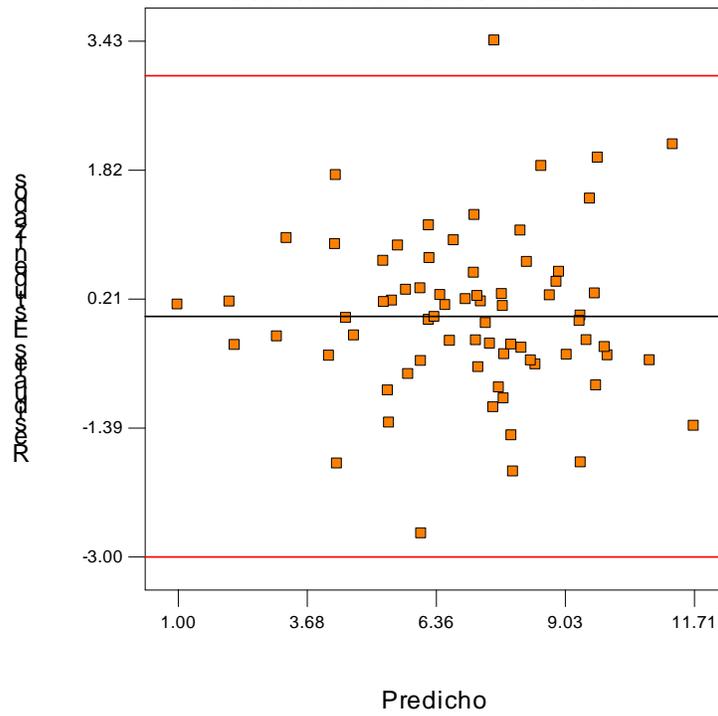
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F	Prob>F	
Bloque	181.89	7	25.98			
Modelo	150.88	9	16.76	6.20	<0.0001	significativa
<i>A</i>	<i>42.55</i>	<i>1</i>	<i>42.55</i>	<i>15.73</i>	<i>0.0002</i>	
<i>B</i>	<i>0.091</i>	<i>1</i>	<i>0.091</i>	<i>0.034</i>	<i>0.8551</i>	
<i>E</i>	<i>12.85</i>	<i>1</i>	<i>12.85</i>	<i>4.75</i>	<i>0.0337</i>	
<i>F</i>	<i>1.64</i>	<i>1</i>	<i>1.64</i>	<i>0.61</i>	<i>0.4391</i>	
<i>AE</i>	<i>0.029</i>	<i>1</i>	<i>0.029</i>	<i>0.011</i>	<i>0.9183</i>	
<i>AF</i>	<i>20.35</i>	<i>1</i>	<i>20.35</i>	<i>7.52</i>	<i>0.0083</i>	
<i>BE</i>	<i>43.38</i>	<i>1</i>	<i>43.38</i>	<i>16.04</i>	<i>0.0002</i>	
<i>EF</i>	<i>0.11</i>	<i>1</i>	<i>0.11</i>	<i>0.041</i>	<i>0.8396</i>	
<i>AEF</i>	<i>29.88</i>	<i>1</i>	<i>29.88</i>	<i>11.05</i>	<i>0.0016</i>	
Curvatura	0.32	1	0.32	0.12	0.7340	no significativa
Residual	146.06	54	2.70			
Total	479.15	71				

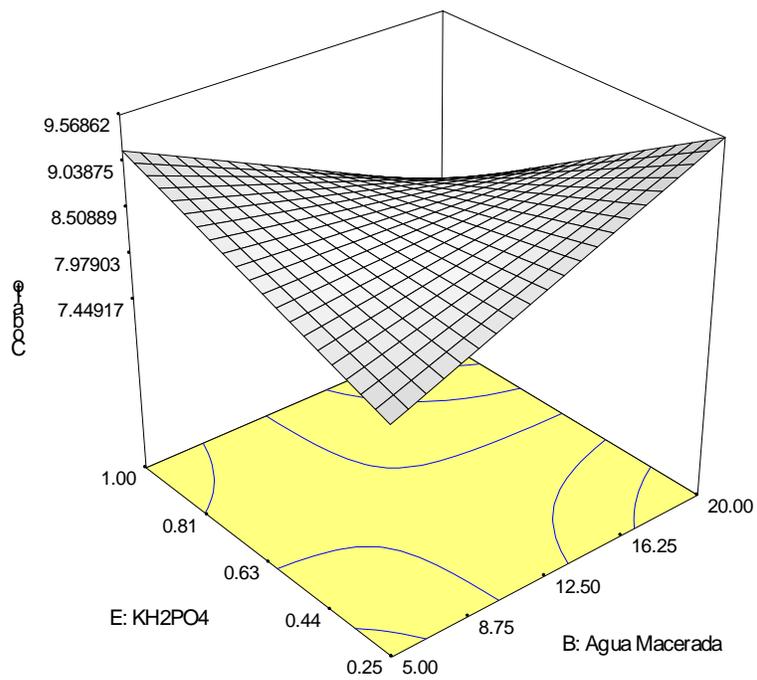
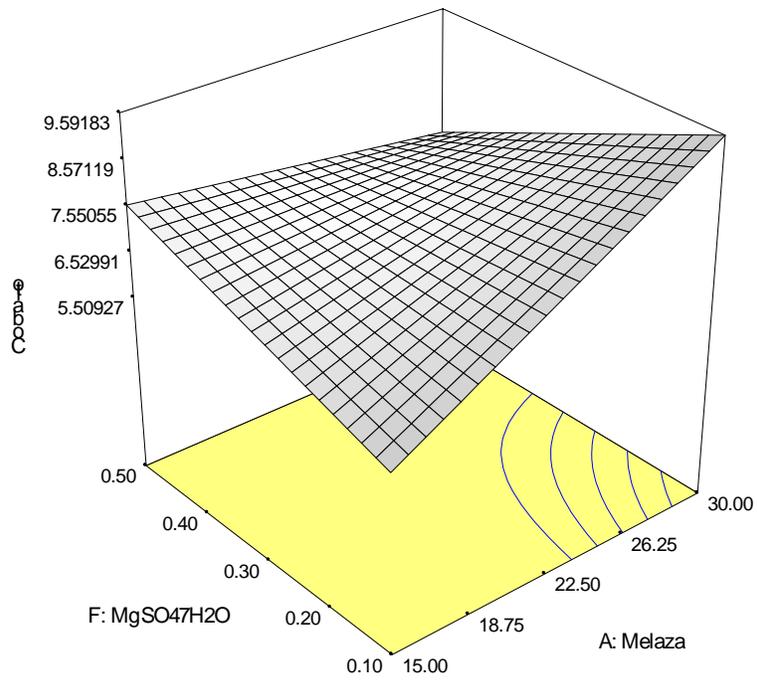
Valores de "Prob > F" menores a 0.0500 indican que los términos del modelo son significativos

Gráficos de residuales Normales

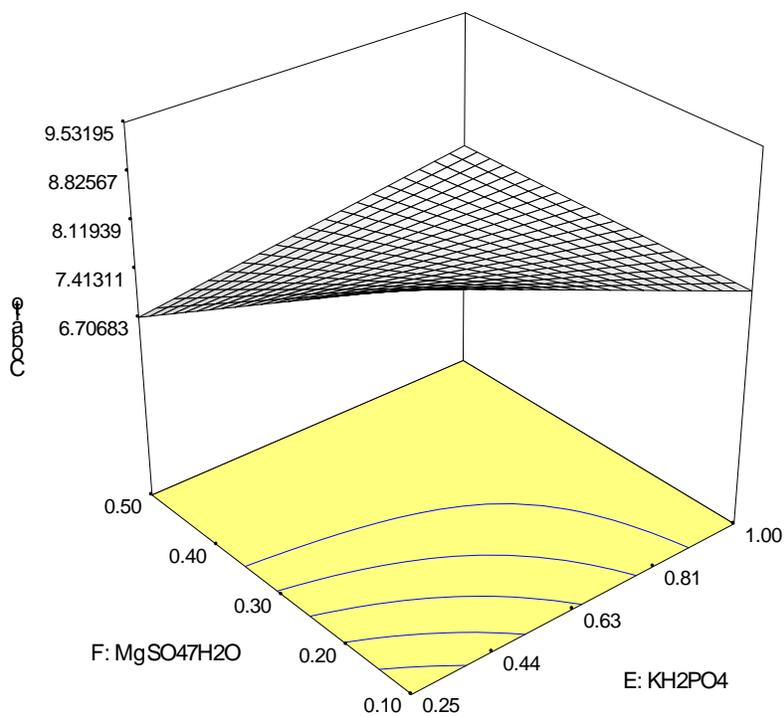


Residuales vs. Predichos





Superficies de respuesta para el cobalto



Superficie de respuesta para el cobalto

Tabla B.6 valores para el cobalto

Factor	Ejes	Valor obtenido	Menor	Mayor
Melaza		29.78	15.00	30.00
Agua Macerada		19.65	5.00	20.00
Germen		40.00	20.00	40.00
Concentrin21		39.91	20.00	40.00
KH2PO4	X		0.25	1.00
MgSO47H2O	Y		0.10	0.50
MnSO4H2O		0.20	0.05	0.20

Gráfico de un factor

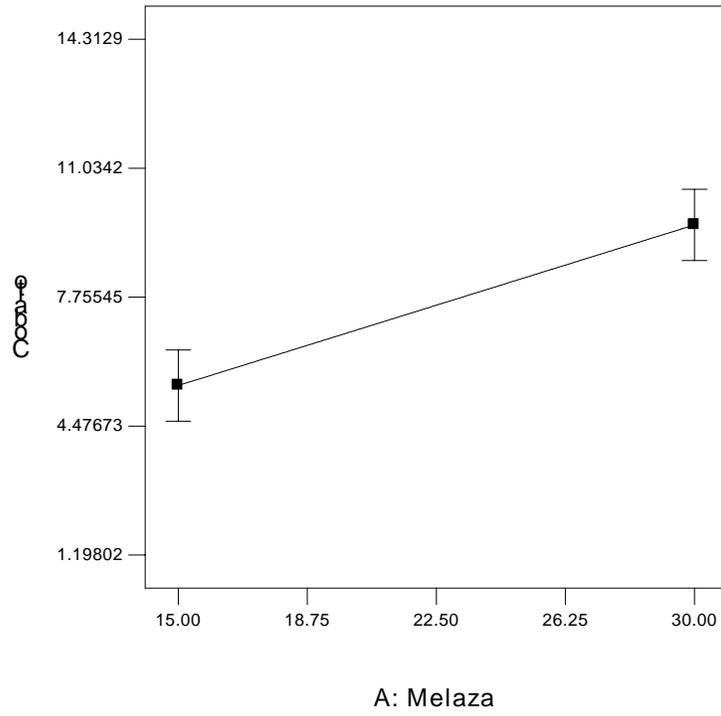


Gráfico de un solo factor

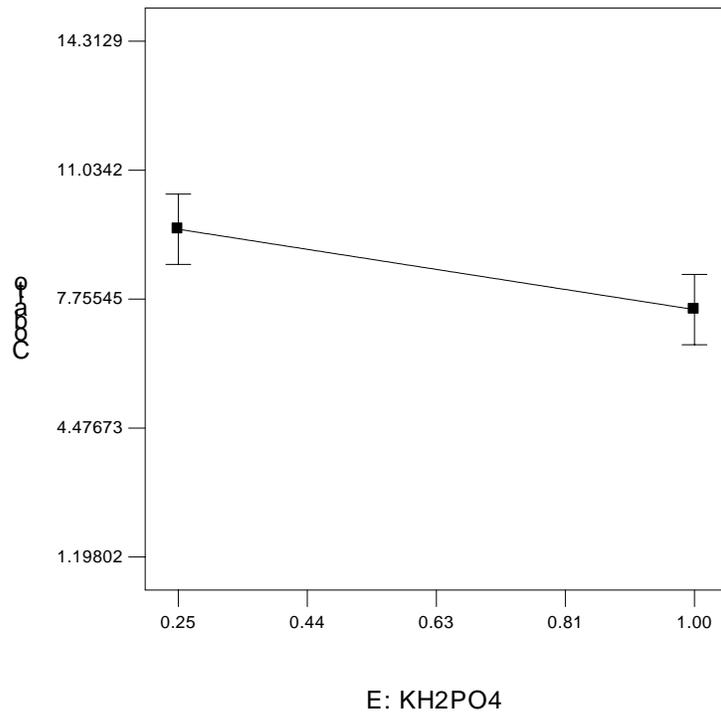


Gráfico de interacciones

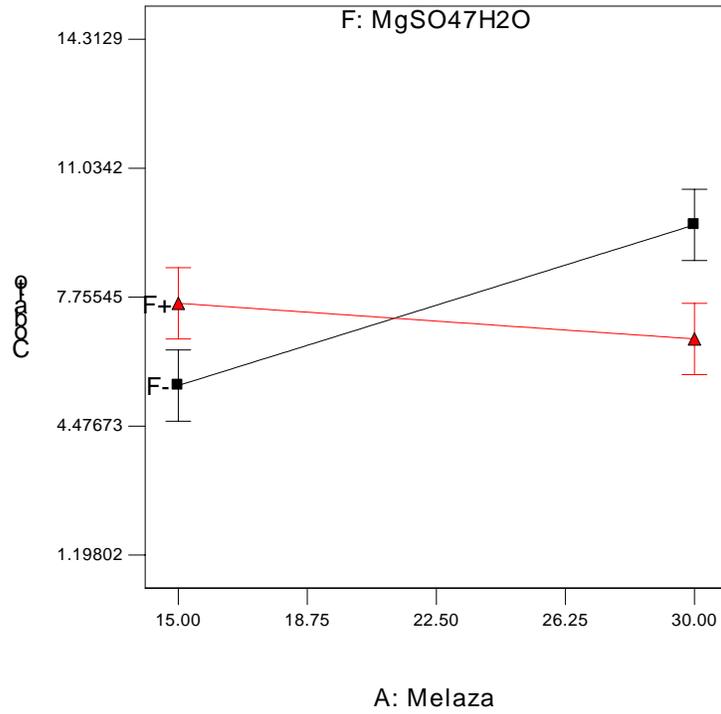
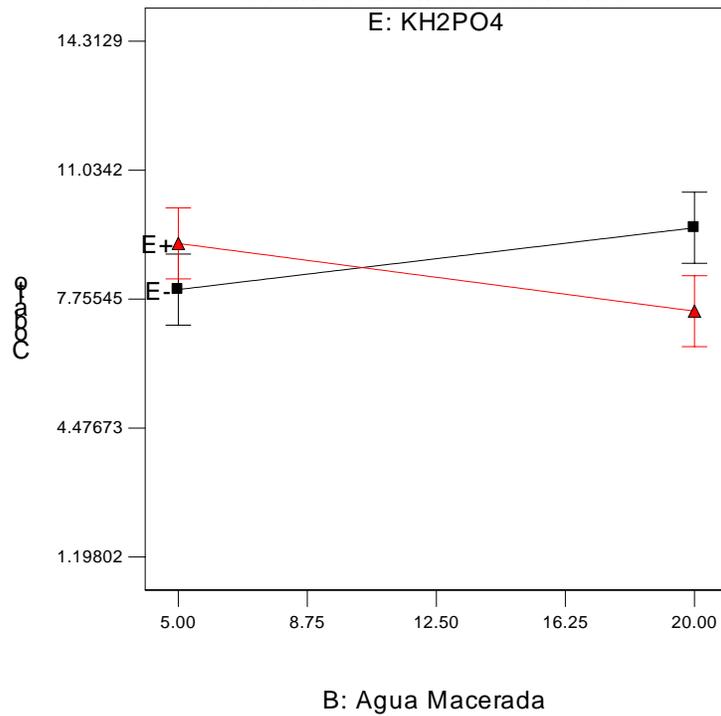


Gráfico de interacciones

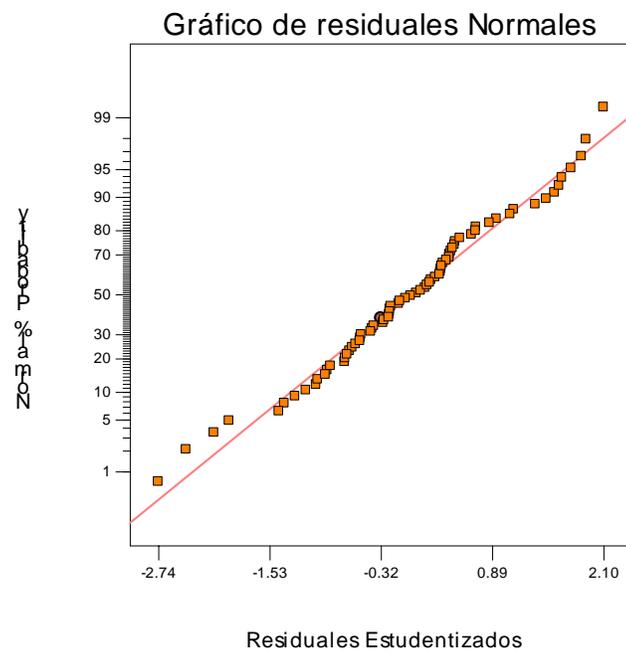


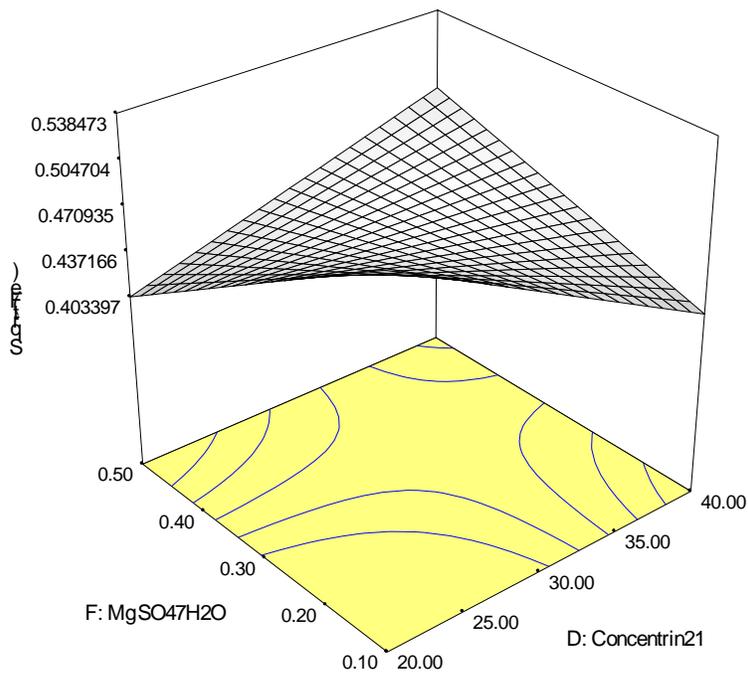
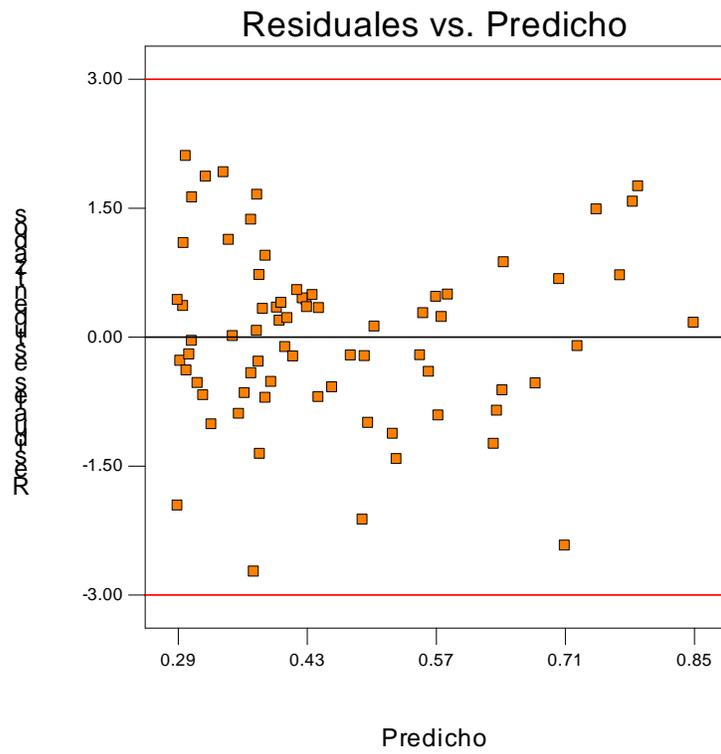
Variable dependiente (Hierro)^{1/2}

Tabla B.7 Análisis de la varianza para (Fe)^{1/2}

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F	Prob>F	
Block	1.09	7	0.16			
Model	0.40	5	0.079	5.37	0.0004	Significativo
<i>B</i>	<i>0.097</i>	<i>1</i>	<i>0.097</i>	<i>6.62</i>	<i>0.0127</i>	
<i>C</i>	<i>0.10</i>	<i>1</i>	<i>0.10</i>	<i>6.92</i>	<i>0.0109</i>	
<i>D</i>	<i>0.012</i>	<i>1</i>	<i>0.012</i>	<i>0.79</i>	<i>0.3769</i>	
<i>F</i>	<i>0.017</i>	<i>1</i>	<i>0.017</i>	<i>1.18</i>	<i>0.2809</i>	
<i>DF</i>	<i>0.17</i>	<i>1</i>	<i>0.17</i>	<i>11.32</i>	<i>0.0014</i>	
Curvatura	0.021	1	0.021	1.44	0.2347	No significativo
Residual	0.85	58	0.015			
Total	2.36	71				

Valores de "Prob > F" menores a 0.0500 indican que los términos del modelo son significativos



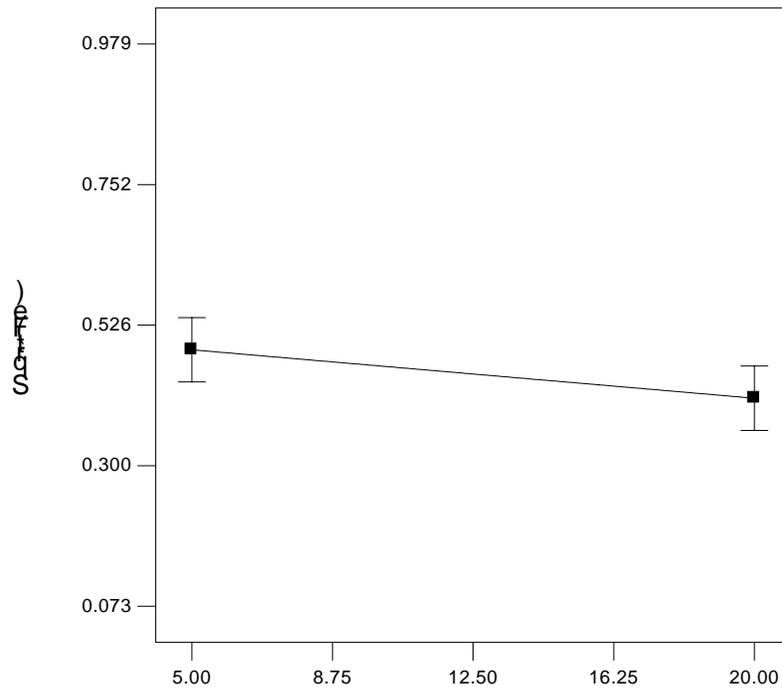


Superficie de respuesta del hierro

Tabla B.8 Valores para el hierro

Factor	Ejes	Valor obtenido	Menor	Mayor
Melaza		29.78	15.00	30.00
Agua Macerada		19.65	5.00	20.00
Germen		40.00	20.00	40.00
Concentrin21	X		20.00	40.00
KH ₂ PO ₄		0.25	0.25	1.00
MgSO ₄ 7H ₂ O	Y		0.10	0.50
MnSO ₄ 4H ₂ O		0.20	0.05	0.20

Gráfico de un solo factor



B: Agua Macerada

Gráfico de un solo factor

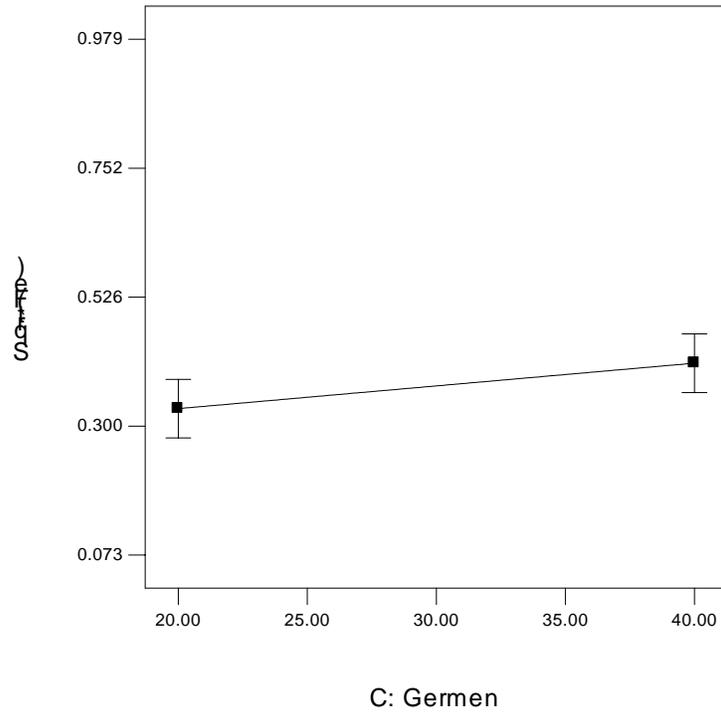
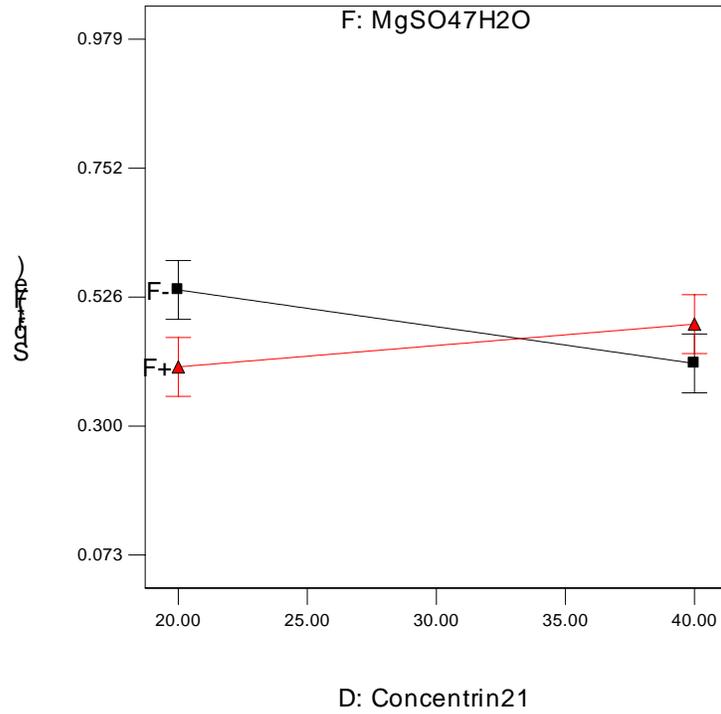


Gráfico de interacciones



APENDICE C

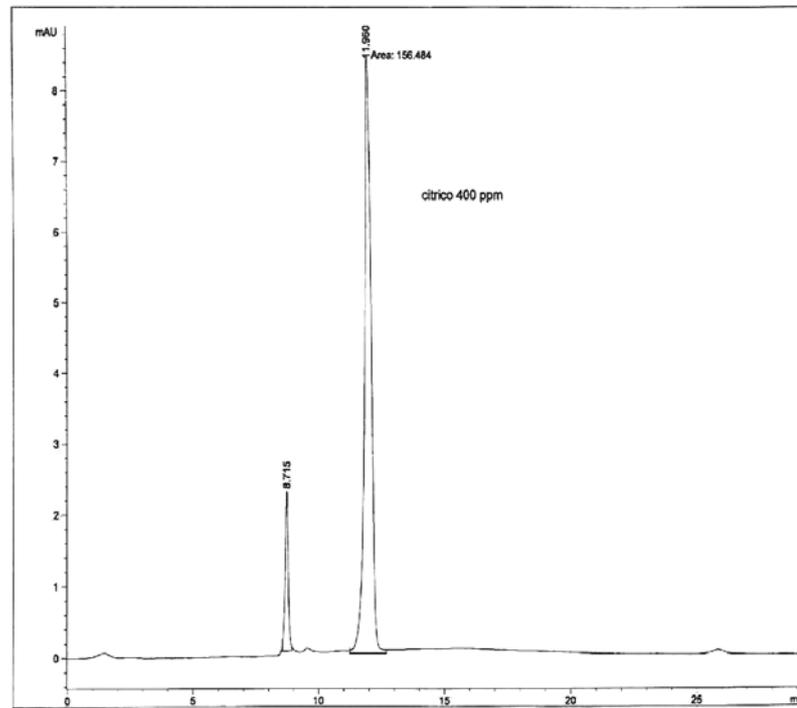


Figura C.1 Patrón de ácido cítrico 400ppm.

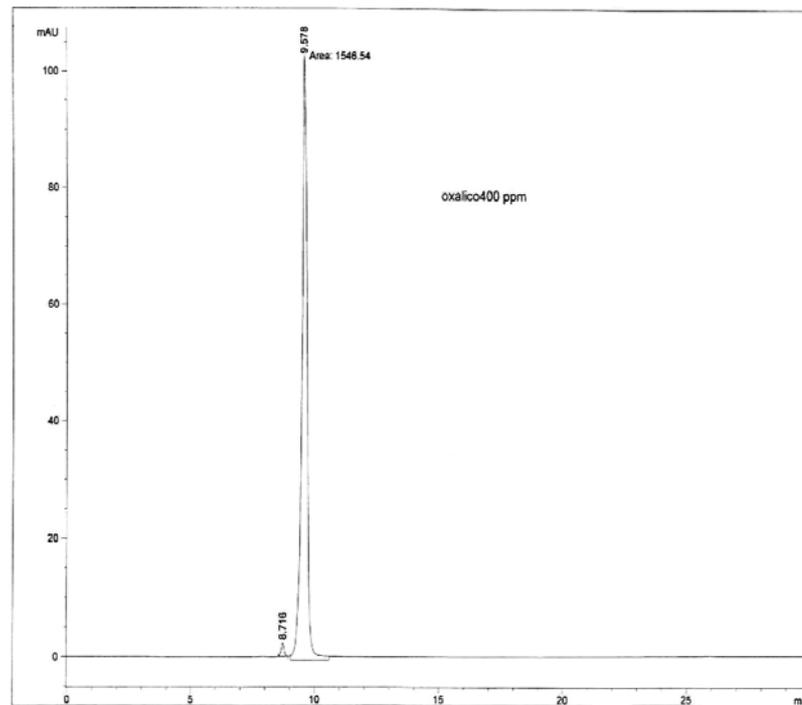


Figura C.2 Patrón de ácido oxálico 400ppm.

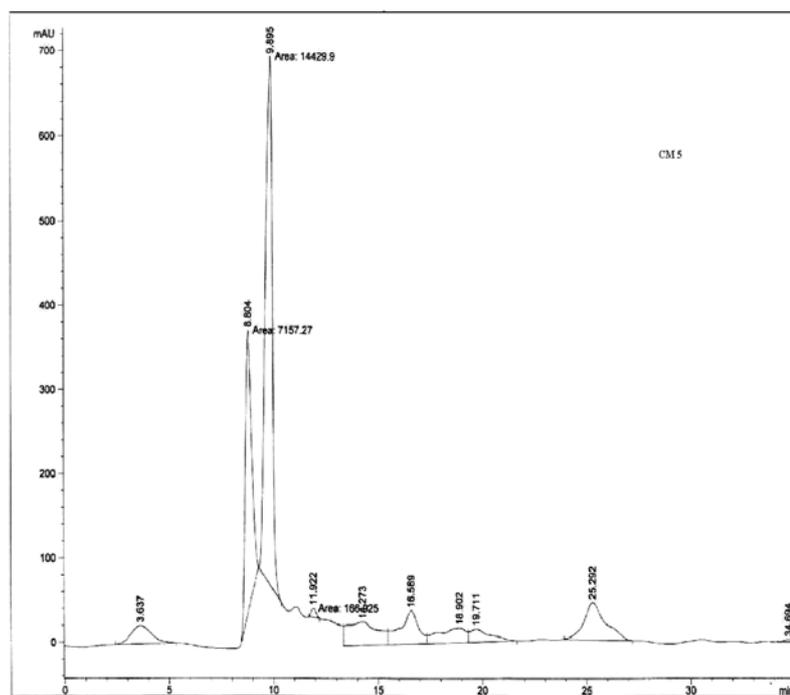


Figura C.3 Muestra del día 5.

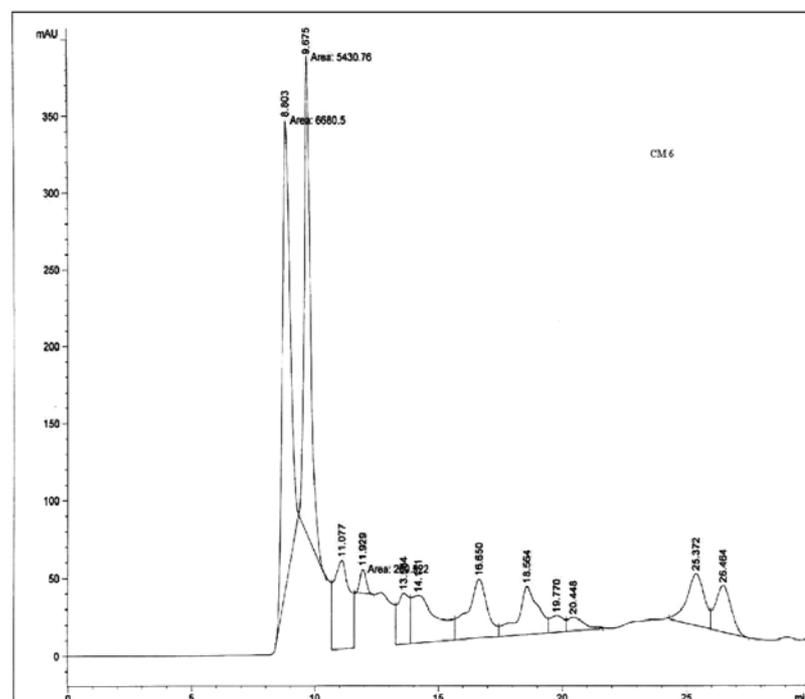


Figura C.4 Muestra del día 6.

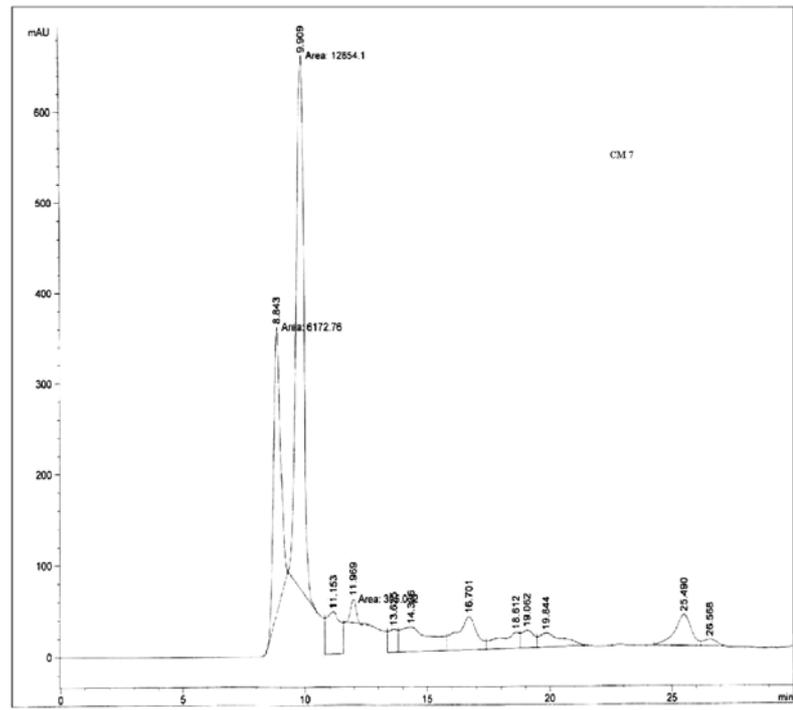


Figura C.5 Muestra del día 7.