

## BIODEFOSFORIZACIÓN DE MINERALES DE HIERRO

Pedro Delvasto<sup>1\*</sup>, Antonio Ballester<sup>2</sup>, Camino García-Balboa<sup>2</sup>, José Mariano Igual<sup>3</sup>, Jesús Ángel Muñoz<sup>2</sup>, Felisa González<sup>2</sup>, María Luisa Blázquez<sup>2</sup>

1: Departamento. de Ciencia de los Materiales, Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela

2: Departamento de Ciencias de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica, Universidad Complutense de Madrid, España.

3: IRNASA, CSIC. Salamanca, España.

\* E-mail: delvasto@usb.ve

Recibido: Nov-2008; Revisado: 13-Ene-2009; Aceptado: 06-May-2010

Publicado On-Line el 30-Jul-2010

Disponible en: [www.rlmm.org](http://www.rlmm.org)

Trabajo presentado en el congreso "X Iberoamericano de Metalurgia y Materiales (X IBEROMET)" celebrado en Cartagena, Colombia, del 13 al 17 de Octubre de 2008; y se seleccionó para ser remitido a la RLMM para su arbitraje reglamentario y publicación.

### Resumen

Se utilizaron cultivos mixtos de microorganismos heterótrofos, cultivos puros de la bacteria *Burkholderia caribiensis* FeGL03 y del hongo *Aspergillus niger* HNA-1 para disminuir el contenido de fósforo de un mineral de hierro proveniente de Minas Gerais, Brasil. Los microorganismos utilizados son autóctonos del mineral tratado. Se encontró, mediante la técnica del frasco agitado, que los cultivos puros del hongo *A. niger* HNA-1 fueron capaces de retirar hasta un máximo del 51 % del fósforo presente en el mineral. Además, los resultados mostraron que la disminución del tamaño de partícula del mineral contribuyó sensiblemente a mejorar la defosforización alcanzada y que los nutrientes que mejor contribuyeron al proceso de biobeneficio fueron la glucosa y el extracto de malta. Finalmente, estudios de microscopía electrónica de barrido permitieron establecer los principales fenómenos biogeoquímicos involucrados en el proceso de biobeneficio del mineral.

**Palabras Claves:** Biobeneficio, defosforización, biolixiviación heterótrofa, mineral de hierro, *Aspergillus niger*, *Burkholderia caribensis*.

### Abstract

Mixed heterotrophic cultures, pure cultures of the bacterium *Burkholderia caribiensis* FeGL03 and pure cultures of the fungus *Aspergillus niger* HNA-1 were used to reduce the amount of phosphorus present in iron ore samples from Minas Gerais, Brazil. All these microorganisms were autochthonous to the ore being treated. It was found, by means of shake flask experiments, that the pure cultures of the fungus *A. niger* were able to extract up to 51 % of the phosphorus originally present in the ore. In addition, our results show that decreasing the ore particle size greatly contributed to improve dephosphorization degree reached and also that glucose and malt extract are the nutrients which offered the best biobeneficiation performance. Finally, scanning electron microscopy analysis permitted to depict the biogeochemical phenomena involved in the biobeneficiation process of the ore.

**Keywords:** Biobeneficiation, dephosphorization, heterotrophic bioleaching, iron ore, *Aspergillus niger*, *Burkholderia caribiensis*

## 1. INTRODUCCIÓN

El fósforo en un elemento pernicioso presente en casi toda la cadena productiva del arrabio y del acero. Dicho elemento tiende a concentrarse en el hierro durante el proceso extractivo ya que es capaz de pasar de su forma oxidada a su forma elemental acabando en el hierro metálico después de la reducción del mineral. A pesar de que existen operaciones de defosforización del arrabio y del

acero líquido a través de la inyección de oxígeno y la formación de escorias con composiciones muy particulares, dicho proceso resulta costoso al implicar largos tiempos de trabajo a elevadas temperaturas, disminución de la productividad y aumento de los costes de producción. Estos procedimientos de oxidación del fósforo son capaces de retirar entre un 15 y un 86 % de esta impureza presente en el metal siendo normal que, para garantizar elevados rendimientos, el tiempo de

oxidación sea elevado y que se empleen costosos aditivos en la formación de las escorias [1]. Por todo esto, se impone la necesidad de emplear materias primas con bajo contenido en dicho elemento, para evitar la concentración del mismo en etapas posteriores del proceso [2].

A pesar de que el problema de la defosforización hidrometalúrgica de minerales de hierro, empleando ácidos inorgánicos, se ha estudiado desde finales del siglo XIX [3] no es hasta el último tercio del siglo XX cuando se incrementa el número de investigaciones en este campo y se publican varias patentes [4,5]. Hasta inicios de la primera década del presente siglo, la marcha de la economía mundial impidió el establecimiento industrial de estas tecnologías de mejoramiento hidrometalúrgico de minerales de hierro ricos en fósforo, sin embargo, la coyuntura actual de elevada demanda de materias primas ha hecho posible el establecimiento reciente de plantas de defosforización hidrometalúrgica de minerales de hierro basadas en la calcinación del mineral seguida de lixiviación con ácido clorhídrico [6]. Las técnicas de lixiviación químicas son, sin embargo, procesos agresivos que requieren de estrictos controles para evitar daños al medio ambiente.

Una alternativa a las técnicas de lixiviación química consiste en el uso de microorganismos, en lo que se conoce genéricamente con el nombre de biohidrometalurgia. Estas tecnologías suelen emplearse para el procesamiento hidrometalúrgico de menas y minerales marginales pudiendo considerarse en la actualidad como una tecnología madura que resulta de especial aplicabilidad en procesos limpios y de bajo impacto medioambiental, los cuales resultan más acordes con la sensibilidad social y el afán de sostenibilidad con la que se empiezan a afrontar los procesos industriales en el siglo XXI.

A pesar de que la solubilización microbiana de fosfatos minerales constituye una etapa esencial del ciclo biogeoquímico del fósforo y ha sido empleada con regularidad en el campo de la agricultura [7], resulta destacable el hecho de que no fuera hasta la década de 1990 cuando salen a la luz las primeras investigaciones en el campo de la defosforización biológica de minerales de hierro [8]. Desde entonces, no son muchos los trabajos publicados respecto al biobeneficio de minerales de hierro fosforosos o materiales afines (Parks *et al.* [8]; Buis, [9]; He y Wei, [10]; Benavides, [11]; Pradhan *et al.*

[12], Delvasto *et al.*, [13]). La mayoría de estos trabajos describen el uso de microorganismos que no están directamente relacionados con el mineral que se desea tratar.

Es bien sabido que en muchas aplicaciones de la biominería y el biobeneficio de minerales *in situ* es importante utilizar microorganismos autóctonos de la zona donde dichas actividades van a ser ejecutadas, con el fin de evitar o minimizar posibles problemas derivados de la adaptación de los microorganismos al medio circundante [13].

En esta misma línea, el presente trabajo pretende abordar el problema del biobeneficio de minerales de hierro fosforosos desde una perspectiva amplia, utilizando a tales fines los propios microorganismos presentes en la microflora asociada al mineral, a través de experiencias de biolixiviación a escala de laboratorio. El trabajo experimental descrito intenta además establecer, en líneas generales, los mecanismos bajo los que transcurre la defosforización biológica de esta importante materia prima.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Mineral de hierro

El mineral de hierro utilizado corresponde a la fracción de rechazo de un proceso de separación magnética en húmedo de la mina Jangada, localizada en Minas Gerais, Brasil. El análisis del mineral por difracción de rayos X (DRX) reveló como principales fases constituyentes la hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) y el cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ), con una presencia minoritaria de goetita y aluminosilicatos en forma de fases arcillosas, en éstas dos últimas fases es donde se concentra la mayoría del fósforo del mineral [14].

El análisis químico del mineral se realizó por fluorescencia de rayos X (FRX) y mostró valores típicos como los que se indican en la Tabla 1. El contenido en fósforo de las muestras utilizadas en este estudio estuvo entre 0,19 y 0,26 % en peso. Dicho contenido de fósforo es aproximadamente tres veces mayor que el máximo permitido por las normas de comercialización internacional de este tipo de materias primas de acuerdo con Cheng *et al.* [15].

**Tabla 1.** Análisis químico del mineral de hierro Jangada

Elemento	% en peso	Elemento	% en peso
Fe	55,30	Mn	0,24
O	33,30	P	0,23
Si	9,20	Cr	0,06
Al	1,60	Ti	0,04

En los experimentos se utilizaron minerales con tres tamaños de partícula diferentes, a saber, una fracción de tamaño -2,5 + 2,0 mm (denominada en adelante 2 mm), otra de tamaño - 0,3 + 0,2 mm (en adelante 0,2 mm) y otra fracción de tamaño < 0,1 mm (en adelante 0,1 mm).

## 2.2 Microorganismos, medio de cultivo e inoculación

Se emplearon en este estudio tres grupos de cultivos microbianos, todos provenientes del propio mineral, a saber: Un cultivo mixto heterótrofo, un cultivo bacteriano puro de la especie *Burkholderia caribiensis* FeGL03 y un cultivo fúngico puro perteneciente a la especie *Aspergillus niger* HNA-1. El medio nutriente utilizado en los tres casos tiene la siguiente composición (por litro de agua destilada): 10 g glucosa; 5 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 0,25 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,20 g KCl; 0,10 g  $(NH_4)_2SO_4$ . El pH de este medio fluctuó entre 4,5 y 5,0 y no se realizó ajuste del mismo. En los casos en los que se estudió el efecto de la fuente de carbono en el medio, la glucosa se sustituyó por los siguientes nutrientes (10 g/L): sacarosa, almidón y extracto de malta.

El cultivo mixto heterótrofo se obtuvo mediante enriquecimiento, agregando 5 g de mineral de hierro sin esterilizar a un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 100 mL de medio líquido nutriente previamente esterilizado en autoclave (121 °C durante 20 min). El matraz se tapó con algodón hidrófobo y se incubó en estático a 30 °C durante 7 días. Pasado este tiempo, se agitó el matraz vigorosamente y se extrajo una alícuota de 1 mL con la cual se inoculó otro matraz Erlenmeyer preparado de igual forma que el primero. Este procedimiento se repitió cinco veces (cinco generaciones), realizándose siempre por duplicado. El sobrenadante (1 mL) de estos cultivos de quinta generación se utilizó como inóculo para los experimentos de defosforización con cultivos mixtos.

Los cultivos puros de hongos (*A. niger* HNA-1) y bacterias (*B. caribiensis* FeGL03) se obtuvieron de

la microflora del mineral a través de un método de aislamiento de microorganismos solubilizadores de fosfatos tal y como se describe en un trabajo previo [16]. Estos cultivos se mantuvieron en placas de agar NBRIP [17] y los inóculos se prepararon suspendiendo las células bacterianas o las esporas fúngicas en agua destilada estéril a una concentración de  $10^8$  células (esporas) / mL. La inoculación de los experimentos en frasco agitado con cultivos puros se realizó añadiendo 0,250 mL de dicha suspensión de células (esporas) en cada matraz.

## 2.3 Ensayos de biodefosforización en frasco agitado

Los experimentos de defosforización microbiológica en frasco agitado se llevaron a cabo en frascos Erlenmeyer de 250 mL taponados con algodón. Cada frasco recibió 7,5 g de mineral de hierro y luego se esterilizó en autoclave (a 121 °C durante 30 min) tres veces consecutivas a intervalos de 24 h. Así se evitó la interferencia durante el experimento de microorganismos diferentes a los inoculados. Posteriormente, en una cámara de flujo laminar, se añadieron 150 mL de medio líquido estéril a cada frasco así como la cantidad de inóculo que se especificó en el apartado anterior. En todos los casos, se dejaron frascos sin inocular a modo de controles abióticos.

La incubación se llevó a cabo en un agitador orbital a 150 rpm y 30 °C. El muestreo se realizó cada cierto tiempo extrayendo del incubador 3 frascos inoculados y 1 control abiótico. De cada frasco se extrajo por separado el medio de cultivo gastado y el mineral remanente utilizando un sifón. Se monitorearon las siguientes variables en el cultivo líquido: el pH (utilizando un pHmetro Crison Basic 20 con un electrodo modelo 5202 de Ag/AgCl), el hierro total en disolución (determinado por espectrofotometría de absorción atómica) y en el caso de los experimentos con cultivos puros de hongos la acumulación de ácido cítrico, utilizando pruebas enzimáticas (Boehringer Mannheim/R-Biopharm). Todos los valores mostrados a continuación corresponden al promedio de tres réplicas. Los sólidos se reservaron para determinar su contenido en fósforo como se describe en la sección 2.4.

En el caso de los ensayos realizados para estudiar el efecto de del tamaño de partícula y del tipo de medio nutriente, sobre el proceso de defosforización

del mineral empleando cultivos puros del hongo *A. niger*, la incubación de los mismos se llevó a cabo a lo largo de 10 días, para facilitar la separación de la biomasa del mineral, tal y como se explica en la sección 2.4.

#### 2.4 Determinación del fósforo en el mineral tratado.

En el caso de los cultivos mixtos y los cultivos puros de hongos, en cada muestreo el mineral que se extrajo del fondo de los frascos se lavó con una disolución acuosa de NaClO 5% con agitación mecánica. Usando este método la biomasa adherida al mineral (micelio fúngico) quedó suspendida en el líquido y por tanto se puede separar de las partículas de mineral por medio de un sifón. Posteriormente, el mineral liberado de la biomasa se lavó repetidamente por centrifugación con agua desionizada y se secó a 100 °C durante 24h. En el caso de los ensayos con cultivos puros de bacterias el lavado se realizó únicamente con agua desionizada. Pruebas en blanco demostraron que ninguno de los dos procedimientos de lavado influyó en el contenido de fósforo del mineral.

El mineral lavado y seco proveniente de las tres replicas de cada ensayo se pulverizó en un molinillo de bolas. De la mezcla, se separó una sub-muestra de 12 g que se prensó a 392 kN, durante 20 s, hasta convertirla en una pastilla plana de 37 mm de diámetro. Dichas pastillas se analizaron a través de espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX) para determinar cuantitativamente su contenido en fósforo, utilizando un espectrómetro PANalytical AXIOS XRF bajo una atmósfera de vacío. Previo a las medidas, el espectrómetro se calibró con diferentes muestras estándar de minerales de hierro. Los valores que se muestran corresponden a dos pastillas. La precisión de la técnica es tal que la medición repetida de una misma pastilla produce una desviación estándar de los valores de fósforo no mayor al 0,001 % en peso.

El grado de defosforización de las muestras se calculó como sigue:

$$\text{Grado de defosforización (\%)} = \frac{\%P_{\text{inicial}} - \%P_{\text{final}}}{\%P_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (1)$$

Donde %  $P_{\text{inicial}}$  se refiere al porcentaje en peso promedio del fósforo en el mineral de partida con el que se realiza el experimento y %  $P_{\text{final}}$  es el contenido de fósforo remanente en el mineral después del tratamiento, también expresado en

porcentaje en peso.

#### 2.5 Microscopía electrónica de barrido.

Con el fin de evaluar la interacción entre los cultivos y el mineral de hierro durante el proceso de biodefosforización, se realizaron pruebas de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microanálisis químico por dispersión de energía de rayos X (EDX). Previo a la observación SEM, las muestras de mineral de hierro con biomasa adherida, se deshidrataron con acetona para luego ser secadas a través de la técnica de punto crítico en un equipo Balzers CPD 030 con CO<sub>2</sub> como líquido de transición. Una vez secas, las muestras se recubrieron por vaporización, primero con una capa conductora de grafito y luego con otra capa conductora de oro. La visualización por SEM y el microanálisis químico EDX se llevó a cabo en un microscopio JSM-6400 SEM a un voltaje de aceleración de 20 kV.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

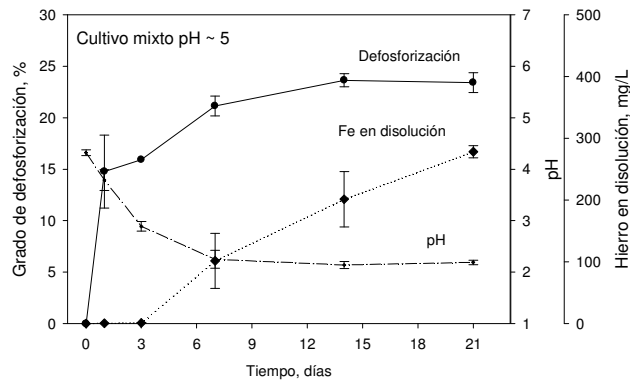
#### 3.1 Evolución del proceso de defosforización

En ambientes donde el fósforo resulta difícil de obtener, los microorganismos (hongos y bacterias) desarrollan estrategias de supervivencia tales como la producción de ácidos orgánicos. Dichos ácidos les permiten disolver los minerales que contienen fósforo, liberando así este nutriente y haciéndolo biodisponible [18].

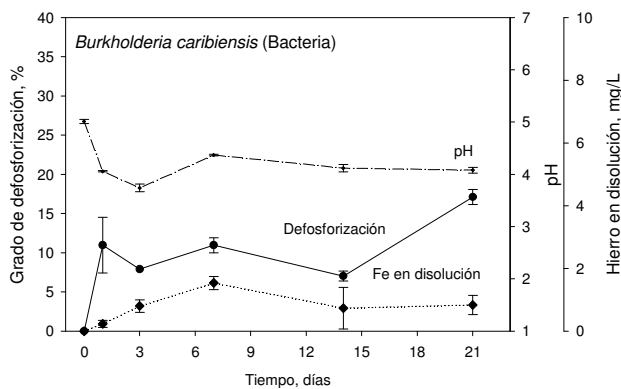
En los experimentos aquí mostrados, se reproduce intencionalmente una situación de escasez de fósforo, de manera tal que los microorganismos que se ponen en contacto con el mineral de hierro se verán obligados a atacar al mineral, para disolver el fósforo retenido en éste. Este proceso producirá una disminución del contenido de fósforo en el mineral.

La disminución lograda mediante este proceso, denominado biobeneficio, se muestra en las Figuras 1,2 y 3 para cultivos mixtos, cultivos bacterianos y cultivos de hongos, respectivamente.

La velocidad inicial del proceso resulta mayor en el caso de los cultivos mixtos (Figura 1), aunque con este tipo de cultivos el proceso se ralentiza a lo largo de la incubación, llegando a alcanzar un máximo de defosforización de 24,4 % en el día 14.



**Figura 1.** Porcentaje de defosforización, aumento de hierro en la disolución y evolución del pH durante el biobeneficio del mineral de hierro utilizando cultivos mixtos heterótrofos provenientes del propio mineral. Condiciones de incubación: 30 °C, 150 rpm. Fuente de carbono: glucosa 10 g/L. Tamaño de partícula del mineral: 0,2 mm.

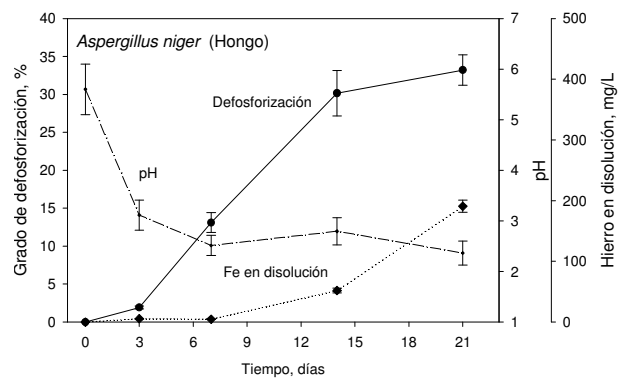


**Figura 2.** Porcentaje de defosforización, comportamiento del hierro en la disolución y evolución del pH durante el biobeneficio del mineral de hierro utilizando cultivos puros de la bacteria *Burkholderia caribiensis* FeGL03 aislada del propio mineral. Condiciones de incubación: 30 °C, 150 rpm. Fuente de carbono: glucosa 10 g/L. Tamaño de partícula del minera: 0,2 mm.

Los cultivos bacterianos, por su parte, muestran una evolución oscilante del proceso de defosforización, lo que indica que a medida de que se extrae fósforo del sistema parte de éste tiende a ser reincorporado en mineral, afectando seriamente la eficiencia del proceso a lo largo del tiempo. En este caso se alcanza disminuir el fósforo del mineral un 17,0% en 21 días de incubación. Por último, los cultivos puros del hongo *A. niger* HNA-1 presentan una cinética lenta durante los primeros 3 días de incubación pero que tiende luego a acelerarse llegándose a eliminar como máximo un 33,2 % del

fósforo en 21 días de incubación.

Como se observa en las Figuras 1, 2 y 3, la defosforización del mineral se acompañó de cambios en el pH en el sistema. En el caso de los cultivos mixtos heterótrofos y del hongo filamentoso *Aspergillus niger* HNA-1, la disminución del pH resultó más marcada, alcanzándose valores cercanos a pH 2, mientras que en el caso de los cultivos de la bacteria *Burkholderia caribiensis* FeGL03, la disminución del pH ocurrió sólo durante los tres primeros días de incubación, estabilizándose a partir de allí. El descenso del pH se debe a múltiples factores, entre los que destacan: la producción de ácidos orgánicos, la producción de ácido carbónico por efectos de la respiración microbiana y la asimilación del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) [19, 20]. De todos estos procesos, el más importante es la producción de ácidos orgánicos [21].

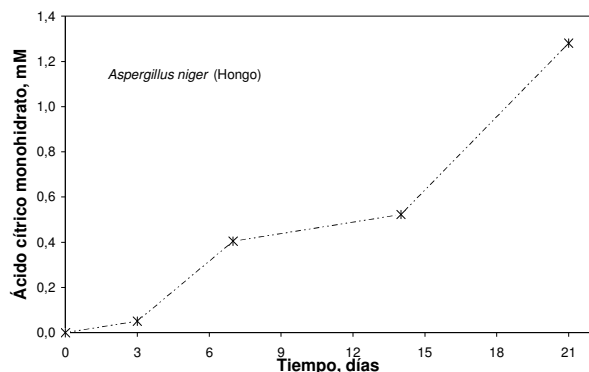


**Figura 3.** Porcentaje de defosforización, aumento de hierro en la disolución y evolución del pH durante el biobeneficio del mineral de hierro utilizando cultivos puros del hongo *Aspergillus niger* HNA-1 aislado del propio mineral. Condiciones de incubación: 30 °C, 150 rpm. Fuente de carbono: glucosa 10 g/L. Tamaño de partícula del mineral: 0,2 mm.

Otros resultados previamente publicados [14] indicaron que los cultivos mixtos utilizados en el presente estudio son capaces de producir ácido glucónico y ácido cítrico, mientras que los cultivos bacterianos de la cepa *B. caribiensis* FeGL03 solamente generan ácido glucónico. El hongo *A. niger* HNA-1 por su parte, produce ácido cítrico, llegando a acumular durante el proceso de biodefosforización hasta 1,3 mM del referido ácido, como se muestra en la Figura 4.

A diferencia de los procesos de biolixiviación con microorganismos autótrofos, basados en la oxidación del hierro o del azufre, en el proceso aquí

planteado el mineral se encuentra oxidado en su totalidad y no presenta azufre en su composición. Esto hace que los ácidos orgánicos producidos, durante la incubación, por los microorganismos heterótrofos estudiados, permita el ataque de la superficie del mineral para favorecer la solubilización del fósforo. Estos ácidos orgánicos no solo ayudan acidificando el medio y promoviendo la acidólisis del mineral sino que, también, actúan formando complejos con los iones metálicos solubilizados del mineral que se encuentran presentes en el medio líquido, lo cual acelera el proceso de biolixiviación. Este mecanismo resulta de especial importancia cuando el fósforo se encuentra ocluido en la ganga del mineral, ya que, al contener ésta metales distintos al hierro (Al, Si, Ca, etc.) la presencia de ácidos orgánicos que formen complejos estables con los metales de la ganga del mineral pudiera favorecer la solubilización selectiva del fósforo.



**Figura 4.** Acumulación de ácido cítrico producido por el hongo *Aspergillus niger* HNA-1 durante la defosforización del mineral de hierro en el experimento mostrado en la Figura 3.

En cualquier proceso de beneficio interesa retirar las fases contaminantes limitando al máximo las pérdidas de las fases metálicas económicamente importantes del mineral. En el caso aquí tratado, el proceso de defosforización debe transcurrir sin que se produzcan pérdidas importantes de hierro. Durante el proceso de defosforización es natural que cierta cantidad de hierro pase a la disolución como consecuencia de la disolución de ciertas fases que contienen tanto hierro como fósforo, es el caso de las goetitas fosforosas, una fase minoritaria en el mineral [14].

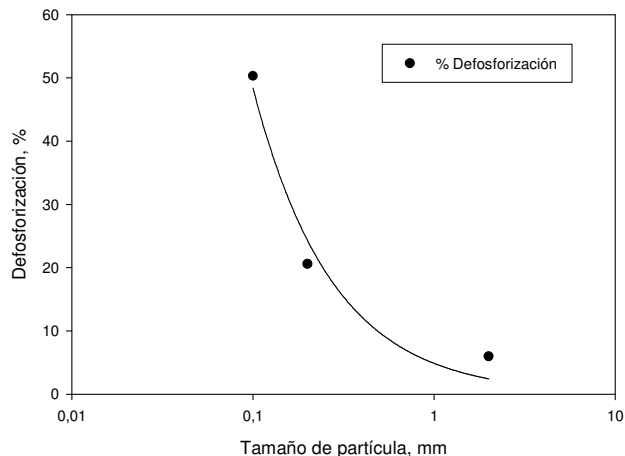
Se observa en la Figura 1 que las pérdidas de hierro son mayores en el caso de los cultivos mixtos, concentrándose en el medio cerca de 290 mg/L de este metal hacia el final de la incubación (21 días), este valor equivale aproximadamente al 1 % del hierro total contenido en el mineral. En los cultivos bacterianos (Figura 2) la cantidad de hierro que pasa a disolución es muy baja (< 2 mg/L), lo que puede indicar que las bacterias atacan preferencialmente ciertas fases del mineral que contienen fósforo pero no hierro, como los aluminosilicatos. El poco hierro disuelto por las bacterias muestra sin embargo un comportamiento de tipo oscilante, al igual que la defosforización. Por último, en el caso de los cultivos de hongos puros (Figura 3), el hierro disuelto alcanzó un máximo de 200 mg/L.

Los resultados aquí presentados indican que el hongo *A. niger* HNA-1 puede ser un agente biológico adecuado para el biobeneficio de minerales de hierro con elevados contenidos de fósforo, ya que condujo a mayores rendimientos de defosforización. Adicionalmente, *A. niger* es un microorganismo muy estudiado y de hecho se encuentra muy extendido su uso industrial para la producción comercial de ácido cítrico [22]. Por estas razones, se decidió utilizar ese microorganismo para los experimentos que se presentan a continuación.

### 3.2 Efecto del tamaño de partícula y del tipo de nutriente utilizado

Se quiso evaluar la posibilidad de incrementar aún más el rendimiento de la defosforización intentando intervenir en dos variables importantes del proceso, a saber: la granulometría del mineral y el nutriente utilizado por el agente biológico de defosforización (*A. niger* HNA-1). En la Figura 5 se aprecia como la disminución del tamaño de partícula afecta positivamente la eficiencia del biobeneficio del mineral.

La disminución del tamaño de partícula del mineral más allá del rango estudiado en los ensayos anteriores, efectivamente trajo como consecuencia una mejora en el porcentaje de fósforo retirado del mineral con el hongo *Aspergillus niger* HNA-1. Como se observa en la Figura 5, la molienda del mineral hasta la condición de polvo fino (< 0,1 mm) aumenta sensiblemente el grado de defosforización que es posible alcanzar a través del biobeneficio del mineral ya que se alcanzaron porcentajes de defosforización del orden del 51%.



**Figura 5.** Efecto de la variación del tamaño de partícula sobre la defosforización del mineral de hierro Jangada utilizando el hongo *Aspergillus niger* HNA-1 a un tiempo fijo de incubación de 10 días. Condiciones de incubación: 30 °C, 150 rpm. Fuente de carbono: glucosa 10 g/L.

Sin duda esta mejora se debió a la liberación de las fases que contienen al fósforo, ya que la goetita fosforosa y los aluminosilicatos suelen encontrarse en los poros de la hematita en este mineral [14].

Gracias a este proceso de liberación, el ácido cítrico producido por el hongo accedería de modo más eficiente a dichas fases fosforosas, disolviéndolas con mayor eficacia.

La reducción del tamaño del mineral hasta valores tan bajos puede resultar, sin embargo, un proceso físico de tratamiento del mineral (previo al biobeneficio) que además de añadir una etapa de consumo energético importante y, por tanto, de incremento de costes, iría en contra de la idea fundamental de este tipo de tratamientos biológicos, la cual es el aprovechamiento de minerales considerados como desechos y la disminución de impactos medioambientales o de consumos de energía.

En la Figura 6 se muestra el efecto de diferentes nutrientes (fuentes de carbono) añadidos a cultivos de *A. niger* crecidos en contacto con mineral de hierro.

El biobeneficio del mineral de hierro con este hongo está sustentado en la producción del ácido cítrico. *A. niger* puede metabolizar diversas fuentes de carbono para generar este ácido [23, 24, 25]. Cuando el crecimiento del hongo se da en presencia de mineral de hierro, dicho ácido reaccionará con las fases fosforosas, desestabilizando su estructura cristalina por medio del ataque con protones del ácido y/o a

través de la formación de complejos con el citrato, liberando de esa manera el fósforo ocluido y haciéndolo incorporable a la biomasa del microorganismo, lo que le permite cumplir con sus funciones biológicas [21].



**Figura 6.** Efecto de la variación del tipo de nutriente (fuente de carbono) sobre la defosforización del mineral de hierro Jangada utilizando el hongo *Aspergillus niger* HNA-1 a un tiempo fijo de incubación de 10 días. Condiciones de incubación: 30 °C, 150 rpm. Tamaño de partícula del mineral: 0,1 mm. Todas las fuentes de carbono se añadieron a razón de 10 g/L.

La producción del ácido cítrico y, por tanto, el grado de defosforización alcanzable, dependerá entonces de la facilidad con que el hongo *Aspergillus niger* HNA-1 sea capaz de adquirir y metabolizar los azúcares presentes en el medio [26]. La glucosa, utilizada en todos los experimentos previos, será la que con más facilidad se utilice, ya que puede metabolizarse de manera inmediata; y como se observa en la Figura 6, conduce a porcentajes de defosforización cercanos al 51 %.

Las otras fuentes de carbono utilizadas en este estudio como la sacarosa (un disacárido), el almidón (un polímero de glucosa) o el extracto de malta (mezcla compleja de varios disacáridos, monosacáridos, oligosacáridos, vitaminas y minerales) requerirán en mayor medida la inducción de enzimas apropiadas que intervengan en la hidrólisis de estos azúcares más complejos para convertirlos en monosacáridos metabolizables por el organismo [22].

El almidón fue el nutriente menos eficiente al producir sólo un 41 % de defosforización. El extracto de malta tuvo un rendimiento ligeramente superior al de la glucosa, probablemente debido a

que la complejidad química de este nutriente incluye numerosas vitaminas y oligoelementos que favorecen el desarrollo fúngico [27], sin embargo, este nutriente tiene un coste muy elevado, lo que lo vuelve inapropiado para su aplicación industrial. La sacarosa, que es un nutriente relativamente económico, produjo rendimientos de defosforización de cerca del 47 %, convirtiéndose en una opción atractiva para el biobeneficio de minerales de hierro a escala industrial.

### 3.3 Estudio SEM de la interacción mineral/microorganismos

Se realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido (SEM) a fin de esclarecer los diferentes procesos biogeoquímicos que operan durante la defosforización microbiana del mineral de hierro.

Este estudio reveló que los microorganismos colonizan la superficie de las partículas del mineral.

En el caso de los cultivos mixtos (Figura 7a) y de los cultivos de *A. niger* HNA-1 (Figura 8a) se observaron abundantes filamentos alrededor de las partículas de mineral, mientras que en el caso de los cultivos puros de *B. caribiensis* FeGL03 (Figura 7c) la colonización consistió en la formación de cúmulos de células bacterianas adheridas entre sí y a la superficie a través de microfibras extracelulares, formando lo que se conoce como una biopelícula. Estas microfibras suelen estar compuestas por materiales poliméricos extracelulares (denominados comúnmente en la literatura como EPS) los cuales, de acuerdo con Ishii *et al.* [28], se forman a su vez de sustancias proteicas o polisacáridos excretados por las células bacterianas.

La razón por la cual se aprecia colonización del mineral durante el biobeneficio se debe a que las células microbianas (filamentos fúngicos o bacterias) presentan en cierto modo quimiotaxis, es decir, son capaces de “sentir” el medio circundante con el fin de ubicar las regiones en las que se concentran los nutrientes escasos en el sistema de manera de explotarlos a necesidad [18, 21, 22].

De acuerdo con Fomina *et al.*, [21], la explotación de estos nutrientes se logra gracias a la producción microbiana de metabolitos particularmente activos para disolver minerales, entre los que destacan: los ácidos orgánicos, los agentes quelantes y los exopolímeros. A este proceso se le denomina “biolixiviación heterotrófica” [21, 29, 30].

La biomasa (conjunto de células microbianas) juega

además un papel activo, no sólo por producir las sustancias químicas encargadas de la lixiviación del mineral, sino también porque absorbe los elementos químicos que se liberan del mineral durante el proceso de biobeneficio [31].

Esta absorción puede ser de dos formas, incidental (en el caso del Fe, Al y Si) o nutricional (caso del P). El caso nutricional está claro, ya que el fósforo es un elemento esencial en el desarrollo celular ya que interviene en los procesos energéticos de todas las formas de vida y conforma los ácidos nucleicos y otros materiales celulares [31]. El caso incidental tiene que ver con reacciones abióticas pasivas entre los exopolímeros (EPS) que recubren a las células y los metales presentes en la disolución, los cuales se acumulan en estos EPS por atracción electrostática o complejación llegando incluso a acumularse en tales cantidades que llegan a precipitar minerales secundarios [32], como se observa claramente en las Figuras 8b y 8c.

La bioacumulación de hierro y otros elementos del mineral (Al, Si) sobre los diferentes materiales celulares se observó en los microanálisis químicos EDX efectuados, algunos de cuyos ejemplos se muestran en las Figuras 7 b, 7d y 8d.

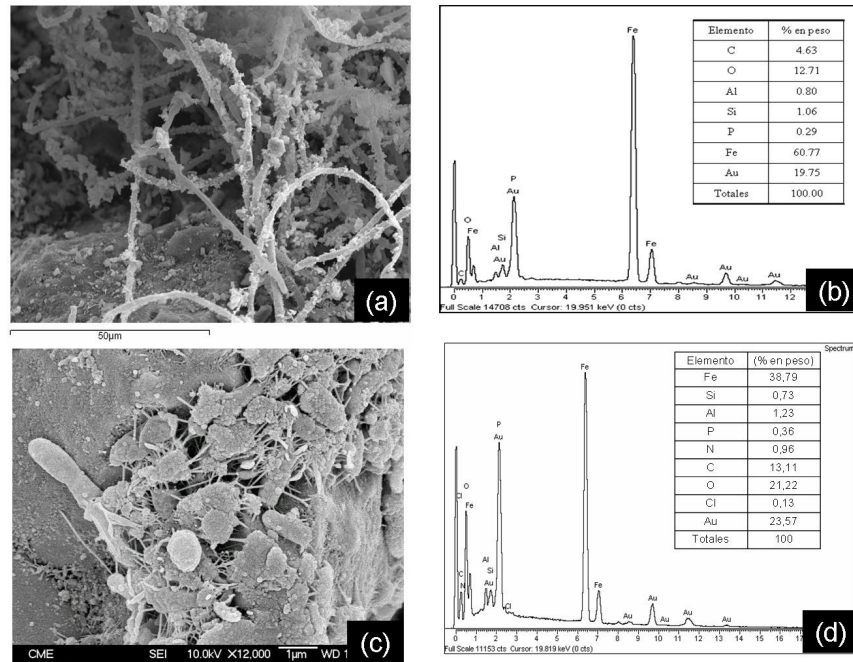
Estas evidencias permiten establecer las diferentes etapas a través de las cuales transcurre el proceso de biobeneficio, las cuales se encuentran esquematizadas en la Figura 9a, para el caso de los hongos y en la Figura 9b, para el caso de las bacterias.

## 4. CONCLUSIONES

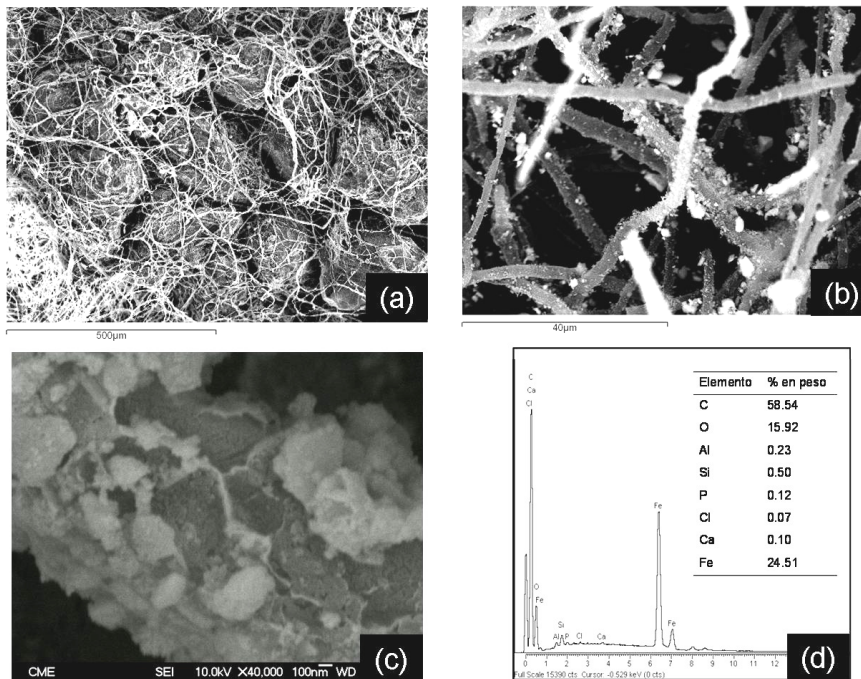
Los resultados presentados indican que es posible disminuir el contenido de fósforo de minerales de hierro utilizando microorganismos y que este proceso resultó ser más eficiente utilizando cultivos puros del hongo *A. niger* HNA-1 frente a cultivos mixtos heterótrofos o cultivos puros bacterianos.

En este trabajo se alcanzó un máximo de 51 % de defosforización, empleando el referido hongo sobre mineral finamente pulverizado (< 0,1 mm) en 21 días de incubación.

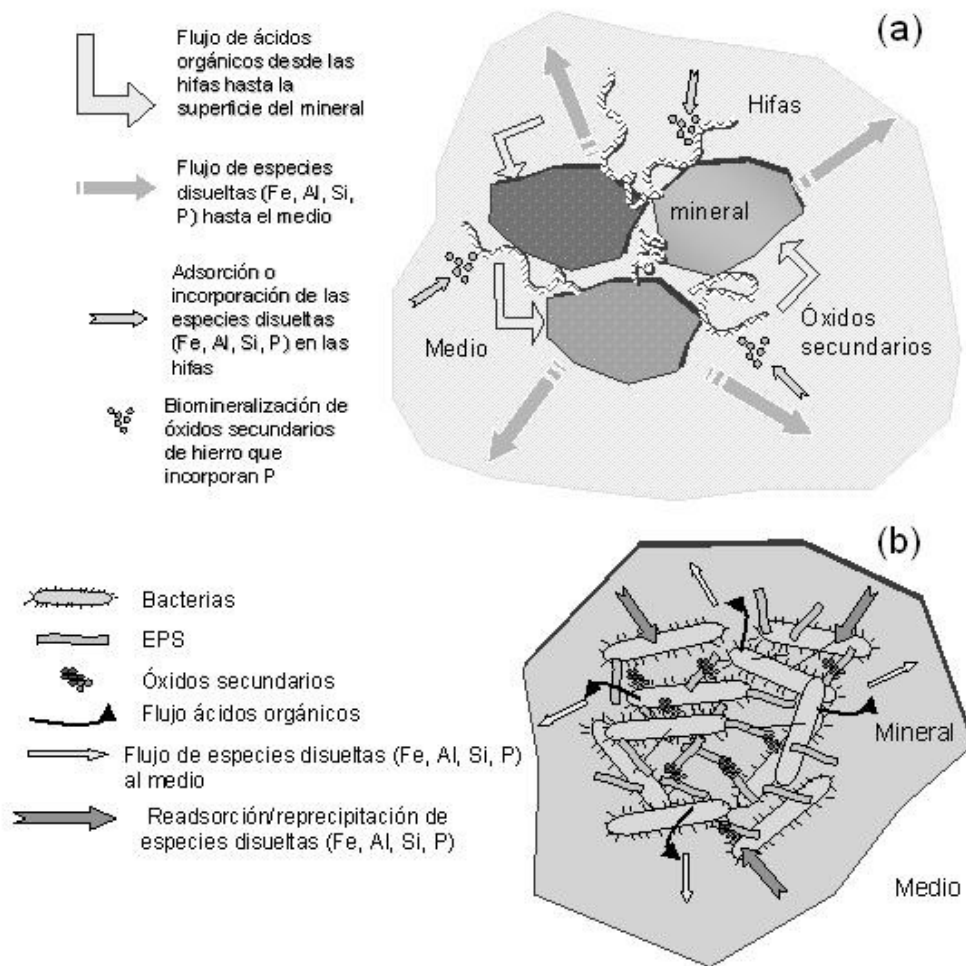
Debido al contenido de fósforo del mineral utilizado en este estudio (~ 0,23 %), se estima que se necesita alcanzar valores de defosforización de entre el 60 y 70 % para que el proceso resulte económicamente viable.



**Figura 7.** (a) Imagen SEM de microorganismos filamentosos colonizando partículas de mineral de hierro durante el biobeneficio empleando cultivos mixtos heterótrofos. (b) El espectro EDX y cuantificación corresponde al análisis de uno de los filamentos, observándose la presencia de hierro y fósforo, entre otros elementos. (c) Imagen SEM de células bacterianas de *Burkholderia caribiensis* FeGL03 colonizando la superficie de una partícula de mineral de hierro durante el biobeneficio. Se aprecia como las bacterias conforman una biopelícula sobre el mineral. (d) Espectro EDX de la biopelícula y su cuantificación, destacando la presencia de hierro, fósforo y nitrógeno.



**Figura 8.** (a) Filamentos del hongo *Aspergillus niger* HNA-1 colonizando partículas de mineral de hierro durante el biobeneficio. (b) y (c) Detalles de los filamentos, en los que se aprecia la presencia de abundantes partículas adheridas a los mismos, que pueden ser minerales secundarios. (d) El espectro EDX del filamento mostrado en (c) indica que la hifa contiene hierro y fósforo.



**Figura 9.** Procesos biogeoquímicos que intervienen en la defosforización microbiana del mineral de hierro en el caso de los hongos (a) y de las bacterias (b).

Finalmente, el estudio mediante SEM de las muestras de mineral incubado con microorganismos y el análisis químico del medio líquido lixiviado, permitió definir que procesos biogeoquímicos tales como la producción de ácidos orgánicos, la formación de biopelículas y la bioacumulación de especies químicas en las mismas, intervienen entre los mecanismos de defosforización biológica del mineral de hierro.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Profesores Virginia Ciminelli y Armando Côrrea de Araújo, de la Universidad Federal de Minas Gerais (Brasil), por

suministrar las muestras de mineral de hierro utilizadas en el estudio. P. Delvasto agradece el apoyo económico, en forma de beca Doctoral, del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT-Venezuela) y de la Universidad Simón Bolívar (Venezuela).

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Cuzzol, D. Desenvolvimento de modelos estatísticos de regressão linear múltipla para a previsão dos teores de fósforo em aços e ferro-ligas de manganês durante refino em convertedores a oxigênio.

- Relatório final do programa de iniciação científica. Departamento de Engenharia Metalúrgica. Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais, Brasil, 2006.
- [2]. Kokal, H. R. "The origin of phosphorus in ironmaking raw materials and methods of removal". A review. In: Proceedings of the 63rd Annual Meeting – The Minnesota section AIME and 51st Annual Mining Symposium, Duluth – Minnesota, January 17-18, 1990. p 225-258
- [3]. Jacobi, J. "Removing phosphorus from iron ores" *Journal of the Franklin Institute*. 1872; **93** (4) 228.
- [4]. Feld, I., Franklin, T., Lampkin, M. "Process for removing phosphorus from iron ores" U.S. Patent No. 3,402,041. Sept. 17, 1968
- [5]. Gooden, J., Walker, W., Allen, R. "ADEMPHOS – A chemical process for dephosphorisation of iron ore". National chemical engineering conference. Process industries in Australia – Impact and growth. Surfers Paradise, Queensland, Australia, July 10 to 12th, 1974. pp 38-49
- [6]. Kokal, H. R., Singh, M. P., Naydyonov, V. A. "Removal of phosphorus from Lisakovsky iron ore by roast-leach process". In: Young, C. A., et al., editors. *Hydrometallurgy 2003 – Proceedings of the 5th International Symposium*, Vol. 2. August 22-27, 2003, Vancouver, B. C., Canada. The Minerals, Metals & Materials Society (TMS), Warrendale, PA 15086 U.S.A. p 1517-1530
- [7]. Igual, J.M. Comunicación personal. Departamento de producción vegetal. Instituto de recursos naturales y agrobiología CSIC. Salamanca, España, 2003.
- [8]. Parks, E., Olson, G., Brinckman, F., Baldi, F. *J Ind. Microbiol.*, 1990; **5**: 183-190
- [9]. Buis, P. "Bioremediation techniques for the removal of phosphorus from iron ore" PhD. Dissertation. Mining engineering. Michigan Technological University, U.S.A. 1995.
- [10]. He, L. J., Wei, D. Z. *Mining Metall. (China)*, 2000; **9**: 31-35. (*En chino con resumen en inglés*)
- [11]. Benavides, M. Comunicación Personal. Departamento de Metalurgia. Universidad Politécnica "Antonio José de Sucre", Puerto Ordaz, Edo. Bolívar, Venezuela, 2003.
- [12]. Pradhan, N., Das, B., Acharya, S., Kar, R. N., Sukla, L. B., Misra, V. N. *Min. Metall. Process.* 2004; **21**: 149-152
- [13]. Delvasto, P., Ballester, A., Muñoz, J. A., González, F., Blázquez, M. L., García, C. "Exploring the possibilities of biological beneficiation of iron-ores: The phosphorus problem". In: Proceedings of the 15th Steelmaking Conference, 5th Ironmaking Conference & 1st Environment and Recycling Symposium IAS (CD-ROM). Argentinean Steelmaking Institute (IAS). San Nicolás, Buenos Aires, Argentina, November 7-10, 2005. pp 71-82
- [14]. Delvasto, P. "Estudios sobre la solubilización microbiana de minerales que contienen fósforo y su aplicación al mejoramiento biohidrometalúrgico de minerales de hierro". Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias de los Materiales e Ingeniería metalúrgica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid, España, 2007.
- [15]. Cheng, C., Misra, V., Clough, J., Mun, R. *Min. Eng.*, 1999; **12**: 1083-1092
- [16]. Delvasto, P., Ballester, A., García, C., Igual, J. M., Muñoz, J.A., González, F., Blázquez, M.L. "Mineral-phosphate solubilization activity of iron ore associated microflora" In: Mendez-Vilas, A., editor. *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology, Exploiting Microbes and Their Interactions*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2006. p 241-245
- [17]. Nautiyal, C.S. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999; **170**: 265-270
- [18]. Banfield, J., Barker, W., Welch, S., Taunton, A. *Proceed. Ntnl. Acad. Sci. USA* 1999; **96**: 3404-3411
- [19]. Illmer, P., Schinner, F. *Soil Biol. Biochem.*, 1995; **27**: 257-263
- [20]. Deacon, J. "Fungal Biology" Fourth Edition. Blackwell Publishing, U.K., 2006.
- [21]. Fomina, M., Burford, E.P., Gadd, G.M.

- “Fungal dissolution and transformation of minerals: significance form nutrient and metal mobility” En: Gadd, G. M. (Editor). *Fungi in biogeochemical cycles*. Cambridge University Press, 2006. Cambridge, UK. pp 236-266.
- [22]. Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. “Brock: biología de los microorganismos” 10a edición. Pearson-Prentice Hall, 2004. Madrid. 1011 pp.
- [23]. Sarangbin, S., Watanapokasin, Y. *Carbohydr. Polym.* 1999; **38**: 219-224
- [24]. Demirel, G., Yaykash, K.O., Yasar, A. *Food Chem.* 2005; **89**: 393-396
- [25]. Kim, J.W., Barrington, S., Sheppard, J., Lee, B. *Process Biochem.* 2006; **41**: 1253-1260
- [26]. Steinböck, F.A., Held, I., Choojun, S., Harmsen, H., Röhr, M., Kubicek-Pranz, E.M., Kubicek, C.P. *Acta Biotechnol.*, 1991; **11**: 571-581.
- [27]. Flückiger-Isler, R., Mörikofer-Zwez, S., Kahn, J.M., Water, P. *J. Nutrition*, 1994; **124**: 1647-1653
- [28]. Ishii, S., Koki, J., Unno, H., Hori, K. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004; **70**: 5026-5029
- [29]. Ehrlich, H. “Microbes for biohydrometallurgy”. En: Ross, W. y Misra, M. (Editores). *Mineral Bioprocessing. The minerals, Metals & Materials Society*. Warrendale, PA. USA. 1991. p 27-41
- [30]. Groudev, S.N. “Biobeneficiation of mineral raw materials” *Min. Metall. Process.*, 1999; **16**: 19-28.
- [31]. Ehrlich, H. “Geomicrobiology”. Fourth edition. Marcel Dekker, Inc., 2002. New York. p 271-273
- [32]. Fortin, D. *Science*, 2004; **303**: 1618-1619