



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

***“LIXIVIACIÓN FÚNGICA DE COBRE A PARTIR DE MINERALES DEL  
DISTRITO MINERO PORTOVELO – ZARUMA – MINAS NUEVAS”***

Tesis previa a la obtención del título  
de Bioquímico Farmacéutico.

**AUTORAS:**

MAYRA FERNANDA ESPINOSA ARMIJOS  
KARINA SOLEDAD LUDEÑA GONZALEZ

**DIRECTOR:**

ING. FABIÁN HUMBERTO CARRIÓN MOGROVEJO

**LOJA – ECUADOR**

2007

## CERTIFICACIÓN

Ingeniero Fabián Carrión Mogrovejo

CATEDRÁTICO DE LAS ESCUELAS DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA E  
INGENIERÍA QUÍMICA Y DIRECTOR DE TESIS.

**Certifica:**

Que el trabajo de investigación: ““Lixiviación Fúngica de Cobre a partir de minerales del Distrito Minero Portovelo – Zaruma – Minas Nuevas”. Reúne los requisitos que exige el reglamento de la Escuela, por tal razón autoriza su presentación.

---

**Ing. Fabián Carrión Mogrovejo**

## CERTIFICACIÓN

Ingeniero Fabián Carrión Mogrovejo

CATEDRÁTICO DE LAS ESCUELAS DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA E  
INGENIERÍA QUÍMICA Y DIRECTOR DE TESIS.

**Certifica:**

Que el trabajo de investigación: ““Lixiviación Fúngica de Cobre a partir de minerales del Distrito Minero Portovelo – Zaruma – Minas Nuevas”. Reúne los requisitos que exige el reglamento de la Escuela, por tal razón autoriza su presentación.

---

**Ing. Fabián Carrión Mogrovejo**

## **DEDICATORIA**

A Dios por guiarme por el camino de la sabiduría, a mis padres que por su sacrificio y apoyo incondicional me han permitido alcanzar mi propósito anhelado, a mis hermanos y sobrino porque en todo momento estuvieron conmigo. A mis amigas y amigos; gracias a todos por haber depositado toda su confianza en mí.

**Mayra Fernanda**

A Dios por mostrarme su luz, a mis padres y hermanas por su apoyo incondicional que me brindaron durante mi carrera, gracias a ellos he podido alcanzar un triunfo en mi vida profesional.

**Karina Soledad**

## AUTORÍA

Las ideas, opiniones y conclusiones del presente trabajo de tesis son de exclusiva responsabilidad de las autoras

---

Mayra Fernanda Espinosa Armijos

---

Karina Soledad Ludeña González

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Técnica Particular de Loja por permitirnos realizar nuestro proyecto de tesis en los laboratorios del CBCM, así mismo hacer extensivo nuestro agradecimiento a todo el personal que labora en el mismo: Docentes, Tesistas y Becarios que generosamente colaboraron en nuestra investigación.

Nuestro más sincero agradecimiento al Ing. Fabián Carrión que de forma desinteresada supo guiarnos a culminar con éxito nuestra investigación.

A los docentes de la Escuela de Bioquímica y Farmacia e Ingeniería Química, que a lo largo de nuestra vida estudiantil supieron impartir sus conocimientos para formarnos no solo como profesionales sino como personas integrales.

## RESUMEN

Se evaluó la capacidad de solubilizar minerales de cobre con una cepa de *Penicillium sp.* aislada del distrito minero Portovelo – Zaruma – Minas Nuevas, en la Provincia de El Oro.

La fermentación se realizó usando un medio mínimo enriquecido con diferentes concentraciones de sucrosa [5%,10%,15%, 20%] suplementado con mineral [10%], se agitaron durante 28 días a 30°C y 110 rpm. Periódicamente se tomó muestras para determinar el consumo de glucosa, pH, ácido cítrico y cobre en solución.

La mejor solubilización biológica fue de 26.667ppm de Cu usando el 10 % de sucrosa, y la mayor solubilización, aplicando lixiviación química, fue de 228.00 ppm de Cu usando 5.057 gr/L de ácido cítrico que corresponden al valor obtenido en lixiviación biológica.

## I INTRODUCCIÓN

La creciente contaminación ambiental y la necesidad de buscar alternativas sustentables al uso de la biodiversidad hacen que la ciencia oriente sus esfuerzos a involucrar mecanismos biotecnológicos que permitan mitigar el daño ambiental mediante el uso de organismos capaces de aprovechar desechos industriales y transformarlos en productos de interés. La Biominería se encuentra en una etapa de evolución, en la cual, se busca utilizar el potencial de hongos y bacterias para obtener valores metálicos y reducir así el uso de productos químicos nocivos para el suelo y el agua, además de potenciar los niveles de recuperación metalífera.

Ecuador dispone de grandes recursos minerales como: oro, plata, cobre, cobalto y uranio; debiéndose destacar que, el de mayor importancia es el oro, que es utilizado como fuente generadora de riqueza y principal rubro de producción minera. La exploración y explotación de minerales se da en los distritos mineros de: Zaruma - Portovelo, Ponce Enríquez y Nambija. A través del Proyecto de Desarrollo Minero y Control Ambiental PRODEMİNCA, se ha probado que en 16 depósitos metálicos explorados existen reservas de aproximadamente 700 TM de oro, 1.600 TM de plata y 1.500.000 TM de cobre; yacimientos que demandan una exploración



detallada para determinar su verdadera magnitud y rentabilidad económica [18].

Ecuador posee la mayor biodiversidad y endemismo en todo el mundo, su riqueza biológica se refleja en la gama de plantas, animales y microorganismos. Los de mayor interés en procesos biotecnológicos son los microorganismos, capaces de producir metabolitos secundarios de interés comercial tales como: antibióticos, biopolímeros, ácidos orgánicos, enzimas<sup>1</sup>.

En la actualidad el ácido cítrico se produce mediante fermentación fúngica; aunque es posible la síntesis química, no se ha creado ningún proceso comercial basado en ella, que sea más eficaz que la fermentación. El 70% del ácido cítrico producido se usa en la industria de alimentos y bebidas, 12% en productos farmacéuticos y 18% para usos industriales [29]. Se ha demostrado que las principales especies fúngicas productoras de ácidos orgánicos: *Penicillium sp.* y *Aspergillus sp.*; juegan un importante rol en los diversos procesos para la solubilización de metales, principalmente de cobre [3]. Wehmer demostró la producción de ácido cítrico con especies de *Penicillium* desarrollados en medios que contenían azúcares y sales orgánicas [29].

---

<sup>1</sup> <http://www.cti.espol.edu.ec/citela/documentos/exposicion/unidad/ecuador.htm>

La Biolixiviación se ha descrito como la interacción entre microorganismos y metales, los cuales pueden ser disueltos por estas especies microbianas que transforman compuestos sólidos en elementos solubles y capaces de ser separados y recuperados [4]. Así mismo, muchos procesos industriales que permiten obtener ácidos orgánicos son excelentes ejemplos de la aplicación de la biotecnología microbiana como una herramienta para implementar la producción de metabolitos de interés económico [16].

Entre los principales países que hacen uso de la Biominería, como una herramienta de mejoramiento de las condiciones operativas de los procesos metalúrgicos, está Chile; el cual se destaca por la producción de cobre, hierro, molibdeno, manganeso, plomo, zinc, oro y plata; de estos productos, el de mayor interés es el cobre<sup>2</sup>. Actualmente un 30% del cobre que se produce en Chile se logra a través de la Biolixiviación, y el gran desafío es incrementar significativamente la producción mediante este proceso de bajo costo<sup>3</sup>.

En el Ecuador no existen reportes que indiquen el uso de sistemas biotecnológicos para la producción de ácidos orgánicos y su uso en la biolixiviación de minerales, por ello el área de Biotecnología Microbiana del

---

<sup>2</sup> <http://peru.infomine.com/news/editorials/bnamericas/2006/0829.asp>

<sup>3</sup> <http://www.explora.cl/otros/biotec/biolixi.html>

CBCM con su línea de investigación en Biominería pretende contribuir al desarrollo del conocimiento científico a través del presente estudio al determinar el potencial de especies fúngicas, presentes en drenajes ácidos de minas, y su capacidad de producir ácido cítrico, el cual, es usado para ayudar al proceso de solubilización de cobre presente en minerales del distrito minero Zaruma – Portovelo – Minas Nuevas.

Para cumplir con los objetivos propuestos el CBCM cuenta con la infraestructura básica necesaria para el estudio biológico, bioquímico y biotecnológico de especies bacterianas y fúngicas, de donde forma parte el área de Biotecnología Microbiana, en el cual se realizará cultivos y aislamiento de la especie fúngica obtenida de efluentes mineros, extracción de DNA, métodos espectrofotométricos y volumétricos para cuantificar la producción de ácidos orgánicos y disolución de minerales. Empleando algunas de estas técnicas se pretende llevar a cabo el estudio de la bioactividad fúngica a fin de cuantificar la producción de ácido cítrico y verificar la capacidad que estos ácidos tienen de ayudar en la disolución de minerales de cobre.

## **OBJETIVO GENERAL**

Biolixiviar cobre mediante ácido cítrico producido por una cepa fúngica aislada en drenajes ácidos del distrito minero Portovelo.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Aislar y caracterizar la especie fúngica involucrada.
- Cuantificar la producción de ácido cítrico.
- Cuantificar la producción de cobre lixiviado.
- Comparar la producción de cobre lixiviado biológicamente con el cobre obtenido por lixiviación química.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

**H0.** El Ácido Cítrico obtenido por fermentación fúngica no lixivia cobre.

## DISEÑO EXPERIMENTAL A UTILIZAR Y VARIABLES DE ESTUDIO

**DISEÑO A UTILIZAR:** Diseño factorial

### VARIABLES DE ESTUDIO:

- **Variables Independientes:** Concentración de Sucrosa [5%] [10%]  
[15%] [20%]
- **Variables Dependiente:** pH; metales disueltos.
- **Variable de Respuesta:** Cu lixiviado, Concentración de Acido Cítrico

### ESQUEMA DEL EXPERIMENTO

#### DESIGNACIÓN

H: Hongo

S: Sustrato (Sucrosa). [S1:5%; S2:10%; S3:15%; S4:20%]

P: Promedio de las concentraciones de sucrosa

C: Blanco

AC: Ácido Cítrico

M: Mineral [10%]

MB: Medio Basal

R: Repeticiones

LT: Lectura de Tratamiento

### **EXPERIMENTO 1:**

E1: H + S1 + MB x 3R

E2: H + S2 + MB x 3R

E3: H + S3 + MB x 3R

E4: H + S4 + MB x 3R

C+: H + MB

C-: P + MB

### **EXPERMIENTO 2:**

E5: H + S1 + MB + M x 3R

E6: H + S2 + MB + M x 3R

E7: H + S3 + MB + M x 3R

E8: H + S4 + MB + M x 3R

C+: H + MB + M

C- : MB + P + M

### **EXPERIMENTO 3:**

E9: MB + M + LT1 x 3R

E10: MB + M + LT2 x 3R

E11: MB + M + LT3 x 3R

E12: MB + M + LT4 x 3R

**Constantes**

Temperatura: 30 °C

RPM: 110

Tiempo: 28 días

Tamaño partícula: 180  $\mu\text{m}$

Volumen del Medio: 150 ml

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 Generalidades de los Hongos**

Los hongos se conocen como organismos unicelulares y pluricelulares principalmente con estructuras hifales, los cuales obtienen sus nutrientes por absorción. Estas definiciones comprenden los organismos heterogéneos convencionalmente estudiados por micólogos. La nutrición heterotrófica puede ser lograda por diferentes estilos de vida saprofitica, parásita o simbiótica [7].

#### **2.1.1 Clasificación**

La clasificación de los hongos esta sujeta a muchos cambios como consecuencia de intensas investigaciones en años recientes [11]. El reino fungí se clasifica generalmente en cinco phylum: Zigomycota (zigomicetes); Ascomycota (ascomicetes); Basidiomycota (basidiomicetes); Chytridiomycota (chitridiomicetes); Deuteromycota (deuteromicetes): los criterios usados para distinguir estas cinco divisiones incluyen tanto características de la estructura básica como patrones de reproducción [7].

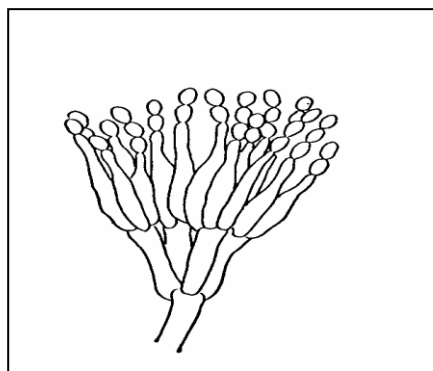
##### **2.1.1.1 Deuteromicetes**



Se han descrito aproximadamente más de 25000 especies; dentro de ellos los Hyphomycetes y son estos Deuteromycetes u Hongos Conidiales, esporulan asexualmente (conidios) fuera del cuerpo de las frutas, pero algunas veces con agregación de conidio esporas: las asociaciones telomórficas son algunas veces conocidas y permiten su integración en el sistema Ascomycete (Basidiomicetes). A pesar de eso los anamorfos pueden estar clasificados independientemente en el género anamorfico, en cultivos puros. Muchos hongos del suelo y otros hongos saprófitos solo tienen su forma anamórfica y se comportan como Hyphomycetes. Algunos importantes géneros dentro de los hyphomycetes encontramos al género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Paecilomyces* [11].

- **Género *Penicillium*:**

Los penicilios son mohos comunes que se desarrollan sobre los más diversos substratos: granos, paja, cueros, frutas, etc. Su identificación en base a las características morfológicas fue caótica hasta que Pitt (1980) normalizó las condiciones de cultivo, y Frisvad (1981) consideró la formación de los metabolitos secundarios en la descripción de las especies. La importancia de estos mohos en la alimentación humana y animal se debe a que, además de causar deterioro, producen toxinas [6].



**Figura 1. Estructura Penicillium**

**Fuente: Carrillo. L.**

## **2.2 Importancia de los Hongos**

Uno de los usos principales de los hongos es el desarrollo de productos bioquímicos como ácidos orgánicos (cítrico, fumárico, láctico e itacónico) y giberilinas. Las penicilinas naturales y semisintéticas son también productos de importancia económica, de lo que puede ser considerado como micología aplicada tradicional. Nuevos agentes farmacológicamente importantes tales como, antitumorales o inmunomoduladores como la ciclosporina, son productos fúngicos que han adquirido trascendencia reciente. Los hongos filamentosos y las levaduras pueden también ser utilizadas para transformar o modificar compuestos de utilidad médica,

como la cortisona. Tales avances iluminan el interesante potencial de hongos manipulados genéticamente [31].

También se está produciendo un significativo desarrollo en el uso de hongos para la biotecnología agrícola y medioambiental, así como en biotecnología industrial diferente de las tradicionales industrias de fermentación. En el ámbito agrícola se ha intentado utilizar hongos como agentes de control biológico para reducir las poblaciones dañinas de insectos, malas hierbas y microorganismos patógenos de plantas. La biotecnología medioambiental está actualmente dedicada en su mayor parte a tecnologías para el tratamiento de residuos peligrosos como cianuro y a la biorremediación (descontaminación) de suelos contaminados por pesticidas, metales pesados y otros compuestos químicos [31].

### **2.2.1 Biominería**

La Biominería se empezó a usar entorno a uno de los metales cuyo uso intenso por la humanidad lleva más de 4000 años: el cobre. Este metal tiene múltiples aplicaciones como la de ser conductor eléctrico debido a su uso intensivo. Pocas veces se encuentra en la naturaleza bajo forma metálica, en general se lo localiza como parte de diferentes metales, como en aquellos a los cuales está asociado al azufre (sulfuros) [9].

La explotación tradicional de este tipo de mineral se realiza a través de la pirometalurgia; dicho proceso es aplicado principalmente para minerales en presencia de formas oxidadas tales como hierro y aceros, o, minerales que pueda convertirse en óxidos, tales como trazas a través del sulfuro de plomo [14].

Los procesos de pirometalurgia son fácilmente explicados en la reacción de un agente reductor con el no metal y la parte del componente metálico.



Generalmente el propósito del agente reductor puede tener una gran afinidad del oxígeno bajo las condiciones del tratamiento después este proceso es operado a muy altas temperaturas, el consumo de energía es muy alto. El estado de reductibilidad de los compuestos a bajas temperaturas podría hacer que el proceso sea eficientemente costoso [14]. Esta metodología no solo es inviable económicamente para minerales con bajo contenido metálico sino que es altamente contaminante debido a que libera cantidades enormes de dióxido de azufre [9].

El uso de metodologías que funcionen a bajas temperaturas y con soluciones acuosas capaces de extraer el metal de los minerales (lixiviar) es claramente preferible desde el punto de vista de su rentabilidad y de su

impacto ambiental. No obstante, hace algo más de medio siglo se descubrió que la hidrometalurgia (como es llamado este último proceso) debería llamarse en realidad biohidrometalurgia ya que se aislaron microorganismos cuya presencia se mostró esencial para que el proceso de recuperación de cobre fuera eficaz [9].

El cobre es el metal que se recupera en mayor medida por esta metodología. Chile, que comparte la cordillera y sus recursos mineros con Argentina, es el mayor exportador mundial de cobre y obtiene aproximadamente el 30 % del metal por biolixiviación. De todos modos, la más importante aplicación comercial de la biominería es la Biooxidación. Este proceso es aplicable a minerales refractarios de oro en los cuales éste se encuentra incluido dentro de una matriz mineral de sulfuros, lo cual dificulta su posterior recuperación [9].

### **Biohidrometalurgia**

La biohidrometalurgia o extracción biológica del metal, es asistida por microorganismos en el proceso de lixiviación de minerales, el cual, involucra microorganismos y/o productos metabólicos, en esta técnica los microorganismos cumplen el rol más importante [14].

Los procesos de biohidrometalurgia son menos costosos, siempre libre de desperdicios y menos gastos energéticos en comparación con otros procesos convencionales [14].

- **Interacción entre Microorganismos y Metales**

En la última década numerosas revistas, documentos y literaturas concernientes a metales y su interferencia con microorganismos están publicados [14].

Los mecanismos de concentración de metales pueden ser categorizados por lo siguiente:

- Interacción Extracelular.
- Interacción Célula – Superficie.
- Interacción Intracelular.

**Interacción Extracelular-**. Esta interacción envuelve principalmente polímeros extracelulares, proteínas, metabolitos ácidos y cambios en el medio ambiente local, debido a procesos bioquímicos; en este tipo de interacción los microorganismos no tienen un contacto directo con metales. Los microorganismos pueden entrar en contacto con los metales indirectamente por la producción de metabolitos o por algunas reacciones

bioquímicas, este proceso beneficia al medio ambiente en algunas vías [14]:

- a. Lixiviación de aleaciones metálicas o minerales nativos por la producción de ácidos.
- b. Descarga de metales con un límite de oxido de hierro y manganeso por reducción microbiana.
- c. Inmovilización de metales por la formación de sales insolubles.

**Interacción Célula – Superficie.-** Algunos metales tienden a unir la superficie celular microbiana a resultados de grupos funcionales. Una de la más importante interacción célula – superficie es la biosorción; que es uno de los mecanismos más significantes por lo cual los microorganismos remueven los metales concentrados de una solución [14].

**Interacción Intracelular.-** Algunos procesos particulares de transporte causan efectos de acumulación de metales en la célula microbiana. Estos pueden causar detoxificación del medio ambiente a través de la conversión de metales insolubles a formas más volátiles. [14].

- **Lixiviación Microbiana**

La lixiviación microbiana es un proceso hidrometalúrgico especial. En este proceso está implicada la actividad metabólica o productos de microorganismos. Hasta ahora se conoce dos tipos de lixiviación microbiana [14].

**Lixiviación Quimioautotrófica:** es un término que abarca los organismos autotróficos que oxidan el azufre como fuente de energía, principalmente el tipo *Thiobacillus* que lixivía minerales ricos en sulfuros de azufre.

**Lixiviación Heterotrófica:** abarca organismos que necesitan fuente de carbono orgánica para sobrevivir, los microorganismos excretan metabolitos producto de las reacciones químicas entre mineral y microorganismo. Esta forma de lixiviar puede ocurrir bajo varios regímenes: pH bajos, debido a la producción de ácidos orgánicos por microorganismos; pH altos, debido a la producción de amonio por el catabolismo de proteínas.

### **Lixiviación Fúngica**

Los hongos son de importancia en los procesos de lixiviación heterotrófica.



Entre las ventajas y desventajas de los hongos asociados a la lixiviación, se pueden sugerir las siguientes pautas:

- Generalmente el hongo requiere de grandes cantidades de carbón orgánico para el crecimiento y generación del agente lixivante.
- Los biohidrometalurgistas no tienen un tratamiento conocido con el hongo.
- Los procesos de lixiviación con hongos es más lenta que la lixiviación con bacterias.

Sin embargo estos puntos son menos significantes después de los siguientes factores a considerar:

- Algunos materiales engloban metales con aumento de pH del medio durante el proceso de lixiviación.
- La formación de complejos con iones metálicos por el cual uno u otro es más soluble en medio ambiente neutral o menos tóxico, es otra superioridad por la presencia del hongo como agente lixivador.

- Los procesos de lixiviación convencional son solo aplicables a materiales que contienen compuestos sulfurados.
- Los hongos como microorganismos son capaces de consumir fuentes de carbón orgánico por el cual muchos pueden estar supliéndose de desechos orgánicos de fácil acceso.

La acción de metabolitos en la lixiviación fúngica no ha tenido una investigación total y esto es controversial acerca de diferentes metabolitos y su acción de solubilización sobre metales. Sin embargo se sugiere 3 mecanismos por el cual los compuestos de metales sólidos pueden ser lixiviados:

- Acidófilos.
- Complexólisis.
- Redoxólisis.

**Acidófilos.-** los átomos de oxígeno se encuentran alrededor de la superficie protonada del metal.

**Complexólisis.-** La capacidad complejante de la molécula puede resultar en la solubilización del ión metálico. Este mecanismo puede tener lugar más lentamente que la acidólisis.

**Redoxólisis.-** La reducción de iones metálicos en medio ácidos tal como la reducción del ión férrico y manganeso bajo la influencia de ácido oxálico.

### **2.2.1.1 Lixiviación de Cobre**

El cobre es un elemento metálico que provino de las profundidades de la Tierra hace millones de años, impulsado por los procesos geológicos que esculpieron nuestro planeta y al llegar cerca de la superficie dio origen a diversos tipos de yacimientos <sup>4</sup>.

Puede aparecer como vetas con alto contenido de cobre, e incluso como cobre nativo o natural, una peculiaridad que permitió su descubrimiento por parte de sociedades primitivas cuando apenas se iniciaban en el conocimiento de los metales. Estos yacimientos son conocidos como vetiformes<sup>4</sup>.

En la actualidad la mayor parte del cobre disponible aparece disperso en grandes áreas, mezclado con material mineralizado y con roca estéril. Estos son los yacimientos porfíricos, que sólo pudieron ser explotados cuando se desarrollaron las habilidades metalúrgicas necesarias para separar y recuperar el metal <sup>4</sup>.

Hay una gran cantidad de compuestos que contienen cobre, que se clasifican en dos grupos:

- los minerales sulfurados y
- los minerales oxidados.

El porcentaje de cobre presente en estos minerales es conocido por los especialistas como 'ley de cobre', y su valor es variable. En algunos yacimientos esa ley es de 1 a 1,8 por ciento, y con frecuencia resulta menor, así que la mayor parte del material explotado en las minas es desechado <sup>4</sup>.

El metal rojizo es utilizado en forma pura para fabricar una amplia gama de productos como cables y tuberías, pero también forma parte de aleaciones para diversos usos logradas a partir de su combinación con otros compuestos como zinc, estaño, plata, plomo, sílice, berilio, hierro, aluminio <sup>4</sup>.

La clave para entender el uso intensivo del cobre por parte de la humanidad está en sus propiedades básicas: es un metal manipulable en caliente y en frío, con gran resistencia a la corrosión, de un color atractivo, con una alta conductividad térmica y eléctrica, ideal para la transmisión de comunicaciones, no es magnético y es completamente reciclable<sup>4</sup>

---

<sup>4</sup> <http://plata.ude.cl/minas/apuntes/Geologia/geologiageneral/ggcap02b>

## **Pórfidos Cupríferos.**

Los depósitos de pórfidos de cobre son depósitos minerales grandes que contienen el cobre ampliamente disperso y de bajo grado y asociado con rocas intrusivas intermedias a félsicas, comúnmente porfíricas. Los depósitos cupríferos deberían tener al menos 20 millones de toneladas con un mínimo de 0.1% de cobre para ser llamado pórfido de cobre [18].

Las características geológicas generales de depósitos de pórfidos de cobre son las siguientes:

- Están espacial y genéticamente relacionados con intrusiones ígneas.
- Las intrusiones son epizonales e invariablemente porfíricas.
- Las intrusiones y las rocas de cajas envolventes están intensamente fracturadas.

Sus principales productos son: Cobre, cobre-molibdeno, cobre y oro.

Precisamente son los grandes tonelajes y la minería de bajo costo los que los convierten en atractivos objetivos para las compañías mineras [18].

### **2.2.2 Ácidos Orgánicos**

Uno de los principales usos biotecnológicos de los hongos es la producción por fermentación de un conjunto de ácidos orgánicos, como el cítrico, oxálico, glucónico, entre otros; siendo el cítrico el más importante para la lixiviación [31].

#### **Ácido Cítrico**

El ácido cítrico es ampliamente utilizado en la industria de alimentos para la producción de bebidas no alcohólicas, sales efervescentes y medicina, para el plateo de espejos y como aditivo en los tintes. El ácido cítrico se producía a partir de los frutos cítricos, pero ahora casi el 99% de la producción mundial se obtiene por fermentación de hongos, en la actualidad la producción anual de este compuesto excede las 200.000 toneladas [31].

El ácido cítrico es fundamentalmente producido por 2 especies de *Aspergillus* llamadas *Aspergillus niger* y *Aspergillus wentii* [31].

El ácido cítrico es un tricarbónico con 6 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 muchos frutos cítricos [29].

Aunque desde 1893 Wehmer había demostrado que ciertos mohos del género *Penicillium* y *Mucor* podían producir ácido cítrico en un medio con sucrosa, hasta los inicios del siglo XX el ácido cítrico se producía principalmente del jugo de limón [29].

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. Aproximadamente el 70% de ácido cítrico producido se usa en la industria de los alimentos y bebidas: el 12% en productos farmacéuticos y cerca del 18% para otros usos industriales [29].

La producción de ácido cítrico se ha incrementado considerablemente en años recientes debido a su fácil biodegradabilidad, lo cual permite usarlo en lugar de fosfato en la industria de detergentes, y para la remoción de azufre de los gases de chimenea en estaciones de energía [29].

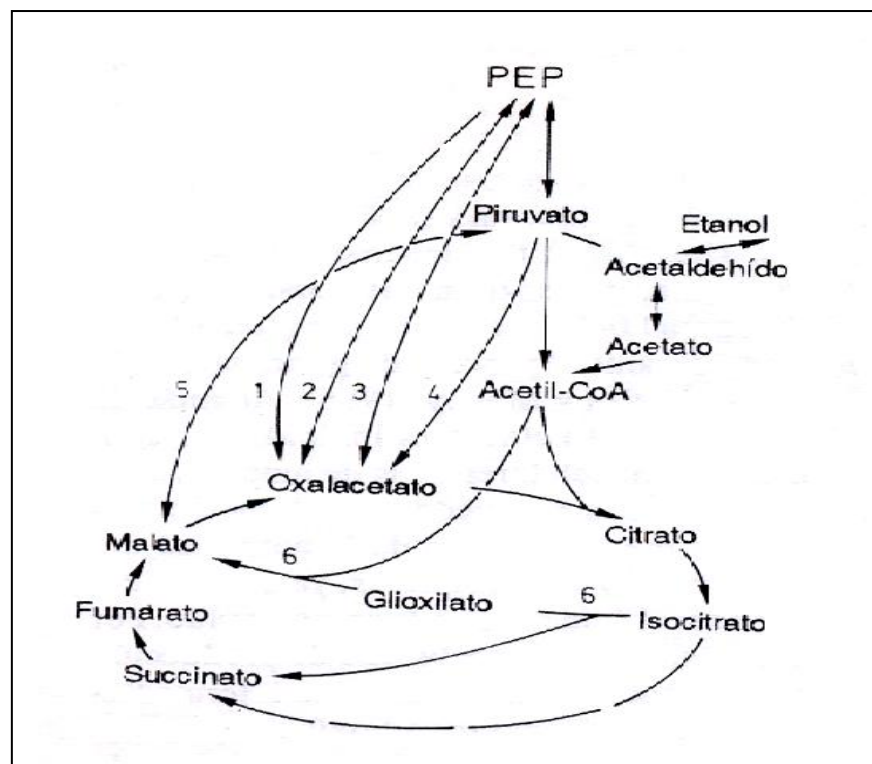
- **Biosíntesis Fúngica del Acido Cítrico**

El ácido cítrico (ácido 2 hidroxipropano- 1,2,3 tricarboxílico) es un producto metabólico primario y se forma en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La glucosa es la principal fuente de carbono utilizada para la producción de ácido cítrico. En muchos microorganismos el 80% de la glucosa utilizada para la biosíntesis de ácido cítrico se metaboliza por reacciones de la vía de Embden – Meyerhof – Parnas (EMP) y 20% por reacciones del ciclo de las pentosa fosfato. Durante la fase de crecimiento la relación entre estas dos vías es de 2:1. En los microorganismos productores de ácido cítrico las enzimas de la vía EMP están presentes a lo largo del proceso de fermentación y la actividad de la vía esta regulada en forma positiva por la fosfofructoquinasa y en forma negativa por la piruvato quinasa. Cuando el piruvato es descarboxilado con formación de acetil-CoA, el residuo de acetato se canaliza hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Durante la idiofase se expresan todas las enzimas del ciclo de Krebs excepto la  $\alpha$  – cetoglutarato deshidrogenada. La actividad citrato sintasa (enzima condensante) aumenta por un factor de 10 durante la producción del ácido cítrico, mientras las actividades de las enzimas que catabolizan ácido cítrico, como la aconitasa y la isocitrato deshidrogenada, se reducen drásticamente en comparación con su actividad durante la trofofase. Una de las tres isoenzimas isocitrato deshidrogenada, una enzima mitocondrial

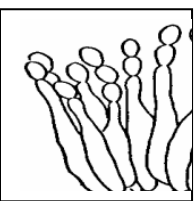


que es específica para NADP, se inhibe por glicerol, que se acumula durante el proceso de germinación de las esporas. Además la producción de ácido cítrico es inhibida por concentraciones intracelulares altas de amonio [8].

La citrato sintasa no puede ser solamente responsable del mantenimiento de la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ya que en el ciclo se detendría si el ácido cítrico fuera removido. Por tanto, deben existir durante la fase de producción distintas secuencias que rellenan los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (secuencias anapleróticas), como se esquematiza en la figura 2.



- |                                 |                         |
|---------------------------------|-------------------------|
| 1. PEP Carboxilasa              | 4. Piruvato carboxilasa |
| 2. PEP Carboxiquinasa           | 5. Enzima málica        |
| 3. PEP Carboxitrans-fosforilasa | 6. Ciclo del glioxilato |



## Figura 2. Biosíntesis del Acido Cítrico.

Fuente: Cruegger. W

La primera enzima anaplerótica presente en *Aspergillus* es una piruvato carboxilasa que convierte piruvato y CO<sub>2</sub> en oxalacetato, fosfato inorgánico y ADP (mientras consume ATP). La reacción depende de iones Mg<sup>2+</sup> y K; no se necesitaba acetil – CoA para la reacción, en contraste con sus requerimientos en las reacciones metabólicas de otros microorganismos. La piruvato descarboxilasa es la enzima clave para la producción de ácido cítrico [8].

La segunda secuencia anaplerótica implica una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, que convierte PEP y CO<sub>2</sub> en oxalacetato y ATP en la presencia de ADP. El sistema requiere iones Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> y K o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [8].

Si se utilizan como fuente de carbono acetato o compuestos alifáticos superiores, como n – alcanos (C<sub>9</sub> – C<sub>23</sub>), se encuentran en *Aspergillus Níger* una secuencia anaplerótica. En ausencia de glucosa opera el ciclo del glioxalato; la isocitrato liasa se induce, y está presente la malato sintasa. Si se añade glucosa el ciclo del glioxalato se reprime, aunque la isocitrato liasa es todavía parcialmente activa [8].

### **III MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Aislamiento y Purificación de Especies Fúngicas**

La recolección de muestras se realizó en el sector de Portovelo – Zaruma – Minas Nuevas, que por sus características mineralógicas, temperatura, pH y presencia de iones metálicos resulta un hábitat muy adecuado para la reproducción de microorganismos (hongos y bacterias), siendo de interés para nuestro proyecto los hongos.

El aislamiento se realizará en medios sólidos MYP (Anexo 1.1) enriquecidos para hongos, en los cuales se introducirá las muestras recogidas en zonas estériles. A partir de estos cultivos se empieza a realizar el aislamiento de *Penicillium sp.* Después de tener resultados positivos en el aislamiento se realizará las purificaciones en medio sólido PDA (Anexo 1.2), la cepa purificada será caracterizada por claves taxonómicas (Anexo 1.5 macroscópicas y microscópicas).

##### **3.1.1 Crioconservación de las cepas fúngicas**

La cepa fúngica debe ser sometida al siguiente procedimiento:

## **- Conservación en Glicerol**

En cajas petri que contienen medio PDA con micelio de hongo crecido se lavan las esporas con 3,75ml de caldo agar saboraud, se coloca esta suspensión en un frasco que contiene 1,25ml de glicerol estéril (autoclavado). Homogenizar por vortex y alicutar a razón de 1,5ml en microtubos estériles (3 por cepa) rotular los tubos con la identificación correspondiente. Conservar los tubos a – 20°C en el congelador [1]

## **3.2. Muestreo y Preparación del Mineral**

### **3.2.1 Muestreo de mineral**

De las zonas de Portovelo – Zaruma – Minas Nuevas, a la salida de las relaveras de cada concesión minera, se realizó la toma de una muestra representativa del sólido circundante, valiéndose de la técnica de cuarteo.

### **3.2.2 Concentración Gravimétrica**

En una mesa vibratoria que permite concentrar, sobre una superficie plana inclinada, en donde circulan los relaves con una corriente de agua para que se produzca el fraccionamiento de los minerales en tres fracciones: concentrados, mixtos y livianos (Anexo 2.5 Fig. 8 y 9). La

fracción de interés es la que contiene el mayor porcentaje de sulfuros, el cual es secado a 80 °C en una estufa y pesado previo a la tostación [5].

### **3.2.3 Tostación del Concentrado**

El concentrado inicial se somete a oxidación en dos etapas. La primera a 450 °C por un periodo de 3 horas y una segunda a 750 °C por 4 horas. Este ensayo se lo realizó en un horno refractario. El producto se sometió a análisis químico para determinar el contenido de cobre (Tabla 6) [26].  
(Anexo 2.6 Fig. 10)

### **3.3. Fermentación para la producción de Ácido Cítrico**

Se llevaron a cabo 3 experimentos con el hongo aislado (*Penicillium sp.*) desde el sector Portovelo – Zaruma – Minas Nuevas, para cuantificar así la producción de ácido cítrico, consumo de sucrosa y disolución de cobre presente en los minerales.

En erlenmeyers de 250 ml, que contienen 150 ml de medio de cultivo (Anexo 1.3), se ajusta el pH a 3.5 con ácido sulfúrico 1 N, luego se adiciona sucrosa y/o mineral. La concentración de sucrosa varía entre el 5%, 10%, 15% y 20%; y la concentración del mineral del 10%, se autoclava a 121°C por 20 minutos.

En los medios estériles se inocula un disco de 1.00 cm de diámetro de micelio. Los frascos fueron agitados a 110 rpm y mantenidos en una cámara termostatzada a 30° C. durante 28 días. Cada 8 días se extrajeron alícuotas (30ml), estas fueron centrifugadas a 5000 rpm y en los sobrenadantes se determinó: pH, ácido cítrico y glucosa (Anexo 2.2 Fig. 5).

### **3.3.1 Determinación de Glucosa**

La determinación de glucosa se realizó por el método enzimático de TRINDER [25], el cual se basa en que el agua oxigenada en presencia de la enzima peroxidasa produce la copulación oxidativa del fenol con la 4 – aminofenazona dando lugar a la formación de un cromógeno rojo – cereza con una absorbancia máxima a 505 nm.

Para la determinación de glucosa se utilizan 3 tubos de reacción: B (Blanco), S (estándar) y M (muestra).

#### **Reactivos**

Solución estándar: glucosa 1gr/L

Reactivo de trabajo: glucosa oxidasa (GOD), peroxidasa (POD), 4 – aminofenazona (4 – AF) y ácido salicílico. pH 7.4.

### - Desarrollo de la Técnica

	<b>B</b>	<b>S</b>	<b>M</b>
<b>Estándar</b>	----	10 ul	----
<b>Muestra</b>	----	----	10 ul
<b>Rvo. De Trabajo</b>	1 ml	1 ml	1 ml

Incubar 10 minutos en Baño María a 37° C. Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm. Llevar a cero con el blanco. (Anexo 2.4 Fig.7

Tabla 7)

### Cálculos

**Glucosa g/L = M \* f**

**Factor (f) = 1.00 g/L / S**

### 3.3.2 Determinación de Ácido Cítrico

La determinación de ácido cítrico se realizó por el método de Hartford. [25].

### Reactivos:

Piridina.

Anhídrido Acético.

Se utilizó una solución de ácido cítrico de concentración 0.30 g/L como estándar.

Se trabajo con 3 tubos de hemólisis: B (Blanco), S (estándar) y M (muestra).

### **Desarrollo de la Técnica**

	<b>B</b>	<b>S</b>	<b>M</b>
<b>Muestra</b>	----	----	0.15 ml
<b>Estándar</b>	----	0.15 ml	----
<b>Piridina</b>	0.20 ml	0.20 ml	0.20 ml
<b>Anhídrido acético</b>	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml

Incubar a 30° C durante 30 minutos a Baño María. Leer a 435 nm., antes de 15 minutos, en cubeta de vidrio. Llevar a cero con el blanco. [25] (Anexo 2.4 Fig.7 Tabla 8).

### **3.3.3 Determinación de cobre lixiviado.**

La determinación de cobre lixiviado se realizó en un equipo de absorción atómica (Varian SpectroAA – 55 Multielemental) de doble haz a una longitud de onda de 327,4 nm. (Anexo 2. Tabla 12)



### **3.4 Lixiviación Química**

En erlenmeyers de 250ml se coloca 150ml de medio de cultivo (Anexo 1.3) y 10 gr. de mineral el pH del medio se regula a 3.5 con ácido sulfúrico 1 N, luego se adiciona ácido cítrico en las diferentes concentraciones obtenidas en el proceso de biolixiviación y se esteriliza a 121°C por 20 min.

Los erlenmeyers fueron agitados a 110 rpm y mantenidos en una cámara termostatzada a 30°C. El tiempo de agitación fue de 48 horas [14]; se extrajeron alícuotas de 25ml y se analizó Cu por absorción atómica. (Anexo 2. Tabla 13)

## **IV RESULTADOS Y DISCUSION**

### **4.1 Análisis Estadístico.**

Usando 4 diferentes concentraciones de glucosa se evaluó la actividad fúngica para determinar la capacidad biosintética de formar ácido cítrico y solubilizar minerales de cobre. Los datos obtenidos de acuerdo al diseño experimental se analizaron utilizando el software XLSTAT 7.5.3.

### **HIPOTESIS 1.**

Ho: La concentración de sucrosa no influye en la producción de Acido Cítrico.

Hi: La concentración de sucrosa influye en la producción de Acido Cítrico.

## **HIPOTESIS 2.**

Ho: La concentración de sucrosa no influye en la solubilización de cobre.

Hi: La concentración de sucrosa influye en la solubilización de cobre.

- **Prueba de comparación múltiple para la variable concentración de sucrosa (Producción de Acido Cítrico).**

**Tabla 1. Análisis estadístico de diferencias entre grupos. Prueba de Duncan.**

<b>Categorías</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Diferencia estandarizada</b>	<b>Valor crítico</b>	<b>Pr. &gt; Dif</b>	<b>Alfa (modificado)</b>	<b>Significativo</b>
C4 ~ C1	0.873	0.726	2.342	0.885	0.143	No
C4 ~ C2	0.687	0.571				No
C4 ~ C3	0.319	0.266				No
C3 ~ C1	0.554	0.461	2.281	0.891	0.098	No
C3 ~ C2	0.367	0.306				No
C2 ~ C1	0.186	0.155				No

**Tabla 2. Ordenación y agrupamientos de los grupos no significativamente diferentes.**

<b>Categorías</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupamientos</b>
C4	1.552	A

C3	1.232	A
C2	0.865	A
C1	0.679	A

El análisis estadístico muestra que no existen diferencias significativas para la hipótesis nula planteada en la hipótesis estadística 1; por lo tanto, la hipótesis estadística se rechaza demostrando que la concentración de sucrosa influye en la producción de ácido cítrico en el proceso fermentativo.

**- Prueba de comparación múltiple para la variable concentración de sucrosa (Solubilización de Cobre).**

**Tabla 3. Análisis estadístico de diferencias entre grupos. Prueba de Duncan.**

Categorías	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr. > Dif	Alfa (modificado)	Significativo
C2 ~ C4	6.300	1.525	2.342	0.454	0.143	No
C2 ~ C3	3.833	0.928				No
C2 ~ C1	0.825	0.200				No
C1 ~ C4	5.475	1.326	2.281	0.409	0.098	No
C1 ~ C3	3.008	0.728				No
C3 ~ C4	2.467	0.597				No

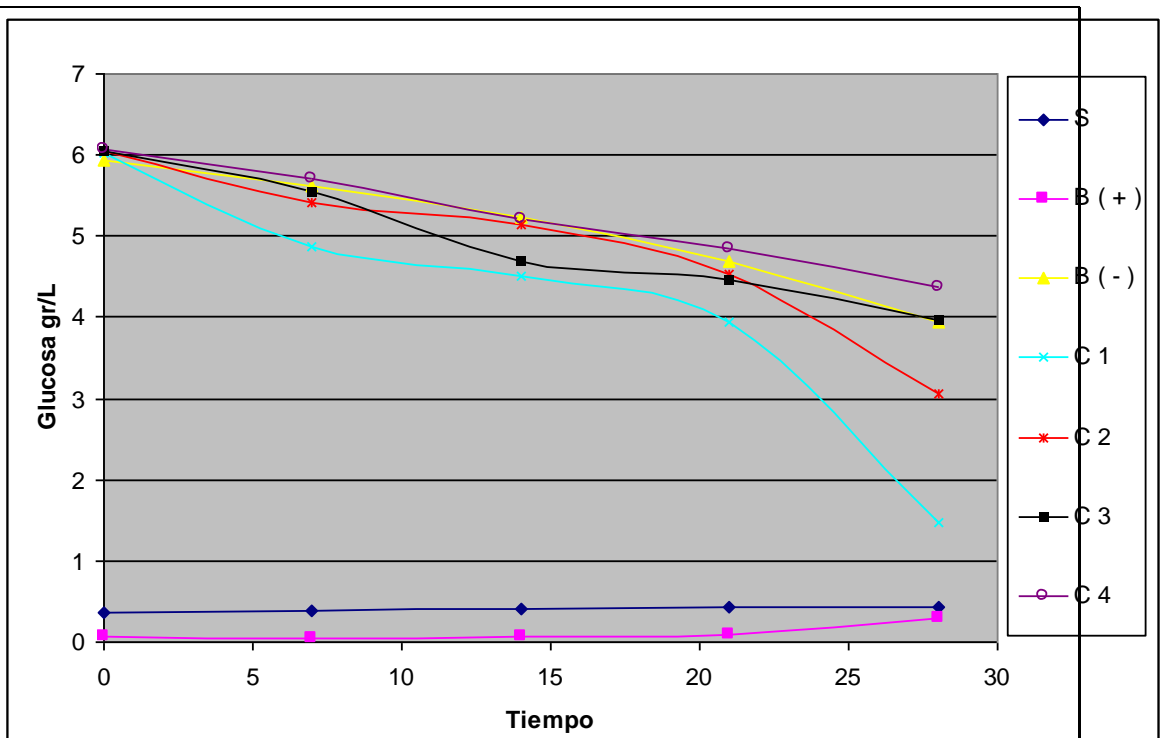
**Tabla 4. Ordenación y agrupamientos de los grupos no significativamente diferentes.**

<b>Categorías</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupamientos</b>
C2	17.308	A
C1	16.483	A
C3	13.475	A
C4	11.008	A

Para la hipótesis nula planteada en la hipótesis estadística 2 se rechaza demostrando que la concentración de sucrosa influye en la solubilización de cobre.

#### **4.2 Análisis y Discusión de Resultados**

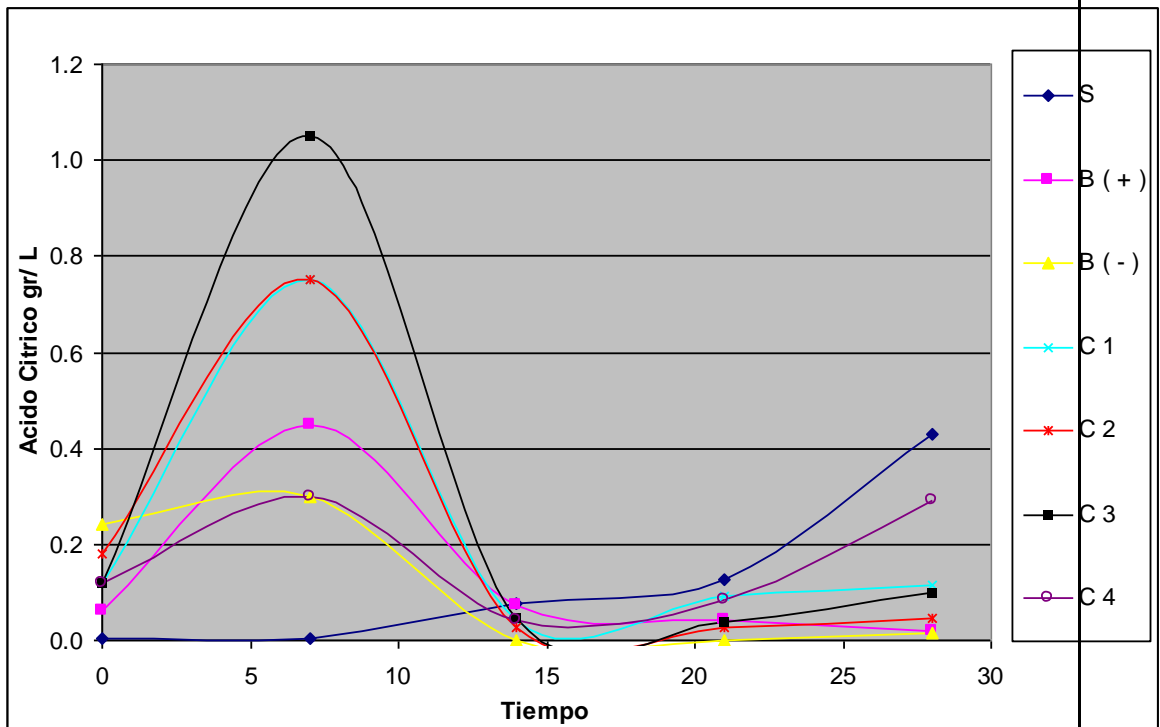
En la grafica 1 se puede observar que todas las muestras presentan un comportamiento relativamente similar [15], diferenciándose únicamente la muestra C1 (5%) que al final del proceso tiene un marcado consumo de sustrato limitante, posiblemente debido a que en concentraciones mas bajas existe mayor inducción a la producción de metabolitos secundarios y el hongo tiende a asimilar más rápido el sustrato en la ultima fase del proceso fermentativo, es decir después del día 20.



**Gráfica 1. Consumo de Glucosa.**

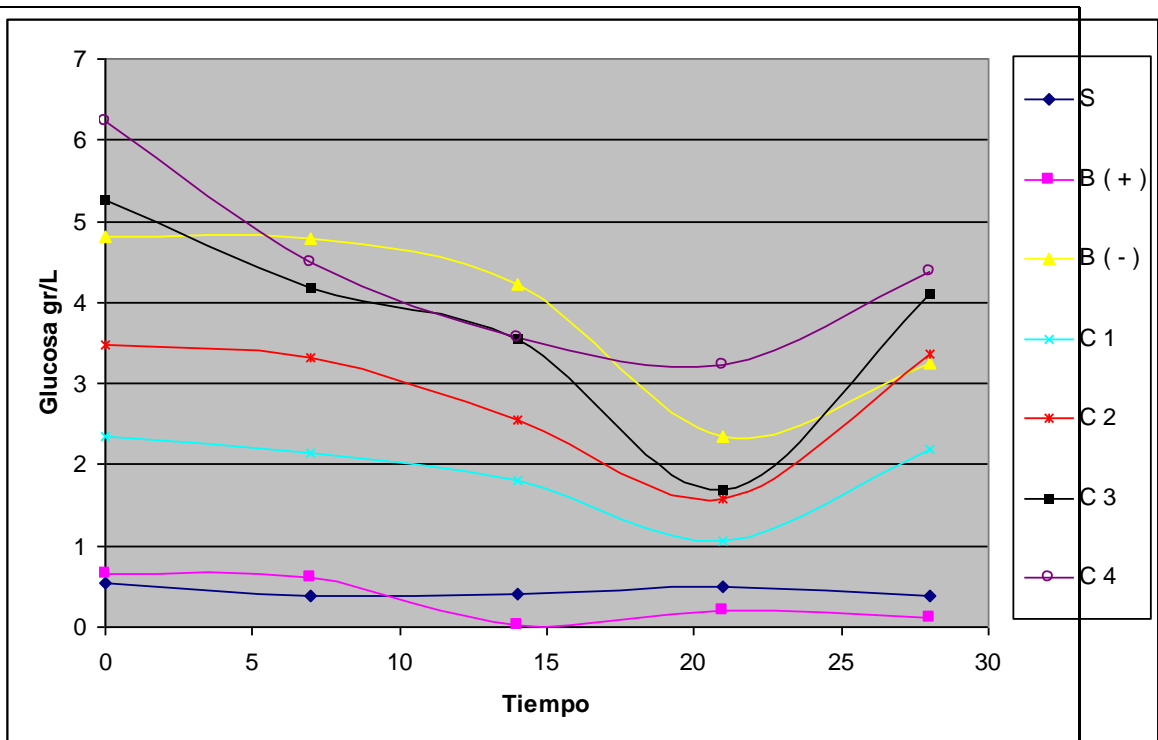
La biosíntesis de sucrosa por la influencia del hongo se manifiesta en la producción de ácido cítrico (Graf. 2) que en las mismas concentraciones de sucrosa se verifica la presencia del ácido, observándose la producción más alta en el día 7 para todas las concentraciones ensayadas. A diferencia de lo observado en la grafica anterior se verifica que la producción más elevada de ácido es con C3 (15%) (Anexo 2. tabla 8), lo cual sugiere que el sustrato limitante si influye en la producción de ácidos orgánicos. Una nueva comparación entre la grafica 1 y 2 permite distinguir que, a concentraciones menores, la biosíntesis es más activa para el consumo de sustrato, sin embargo, cuando se trata de un metabolito específico observamos que a mayor concentración C4 (20%) se tiene

menor presencia de ácido cítrico, lo cual puede explicarse en función del fenómeno de inhibición por el sustrato [29].



**Grafica 2. Producción de Acido Cítrico**

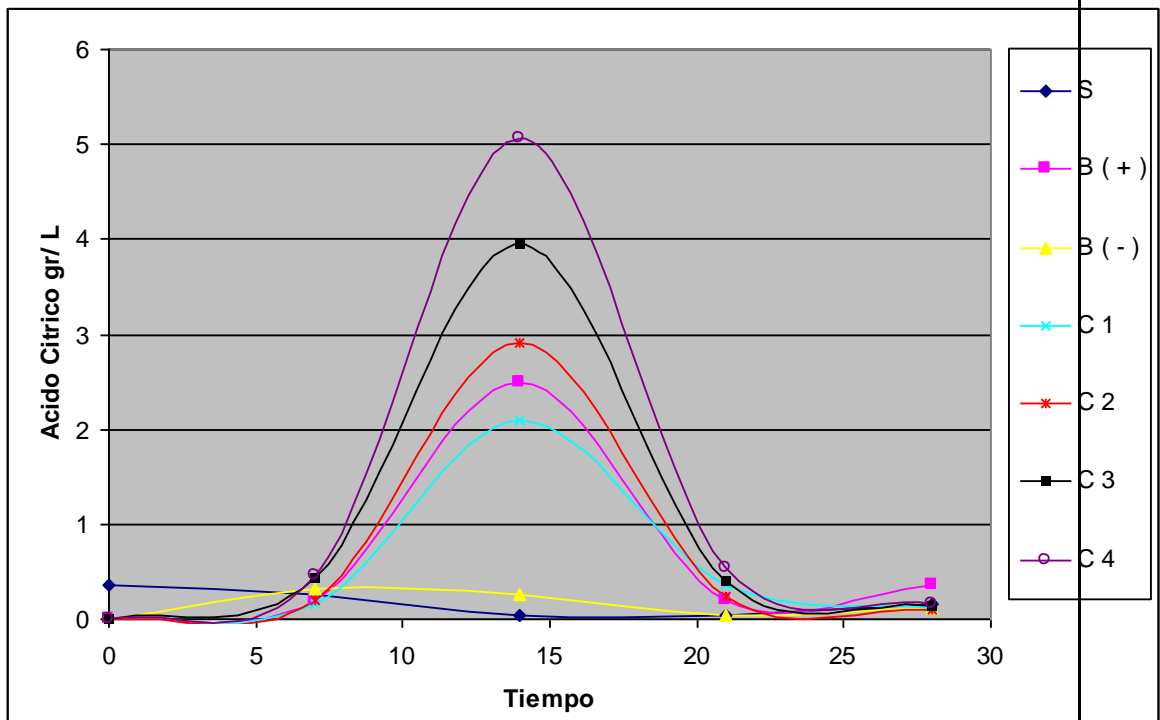
Comparando las gráficas 3 y 1 podemos notar que la tendencia al consumo de sustrato limitante en el tiempo es similar, aunque, en el tiempo cero se nota una rápida descomposición del carbohidrato posiblemente debido a la influencia de los componentes del mineral sobre las diferentes concentraciones de sucrosa.



**Grafica 3. Efecto de la presencia de mineral en el consumo de glucosa.**

La producción de ácido cítrico se ve influenciada por la presencia del mineral y la cepa fúngica (Graf. 3) manteniendo las mismas concentraciones de glucosa para la biosíntesis de la misma, observándose que la producción más alta de ácido se da en el día 14 a una concentración de 30 gr/L de sucrosa, es decir una producción de 5.057 gr/L en comparación con la fermentación sin mineral (Graf. 2). Es notoria la gran adaptación del hongo al medio con mineral, lo que se evidencia al obtener valores mas altos cuando el medio es rico en mineral y valores mas bajos cuando el medio solo contiene sucrosa. Esto puede deberse a que la cepa fue encontrada, en estado natural, en drenajes ácidos de mina

ricos en minerales, por lo tanto, el hongo activa mejor su capacidad metabólica en presencia de mineral antes que sin él.



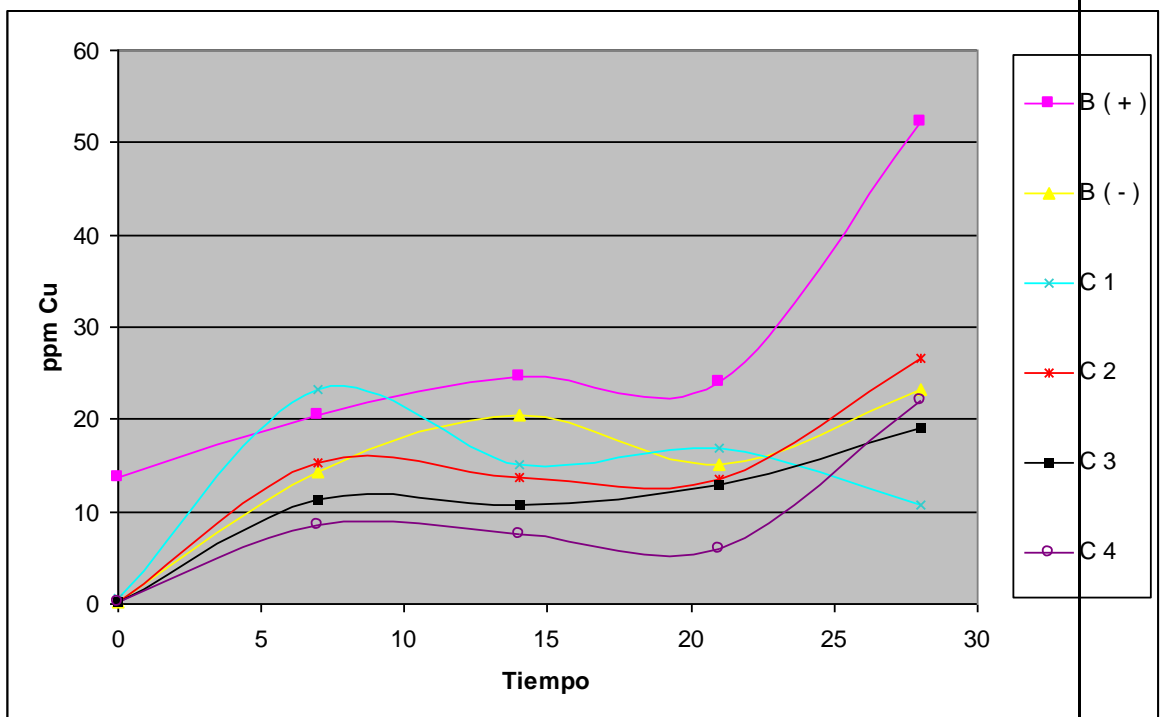
**Grafica 4. Efecto de la presencia de mineral en la producción de Acido Cítrico**

Comparando el gráfico 4 y 5 se verifica que la producción de ácido cítrico no está relacionada con la mejor solubilización de cobre en el proceso; como se puede notar la mejor liberación se da en el blanco positivo con una solubilización del 52.33ppm de cobre durante los 28 días que dura el proceso fermentativo, esto quizá se explique por los antecedentes de procedencia de la cepa. Es evidente la diferencia que existe entre la producción de ácido cítrico y la solubilización de cobre, es decir, que



mientras mayor concentración de sucrosa exista mayor será la producción de ácido cítrico, pero no así la recuperación de cobre; como se observa (Graf. 5) el blanco positivo no contiene sucrosa, sin embargo, existe crecimiento de biomasa y mayor disolución de cobre. En tiempo 0 se aprecia que de alguna manera la sucrosa impide la disolución de sales de cobre y posiblemente debido a que el hongo toma el carbono de los carbonatos presentes en el mineral.

En el ensayo C4 muestra el menor índice de recuperación de metal a pesar de que es donde mayor cantidad de ácido se produce, esto se debe a que una gran cantidad de ácido es consumida por la ganga del mineral [20].



**Grafica 5. Solubilización de Cobre**

El ensayo de lixiviación química se realizó usando los valores de ácido obtenidos como resultado de las lecturas periódicas de lixiviación biológica. Comparando los dos ensayos (tabla 5) se observa que los mejores resultados de solubilidad de Cu se obtienen con lixiviación química (228.000 ppm), que con la mejor lixiviación biológica (26.667 ppm), sin embargo cabe mencionar que el proceso biológico ofrece la posibilidad de obtener una gran cantidad de metabolitos secundarios que merecen ser estudiados y evaluar su posible utilidad.

**Tabla 5. Comparación entre la Lixiviación Química y Biológica.**

CONC.	TIEMPO / DIAS	LIXIVIACION BIOLOGICA		TIEMPO / DIAS	LIXIVIACION QUIMICA	
		Ac. Cítrico gr / L	Solubilización de Cu ppm		Ac. Cítrico gr / L	Solubilización de Cu ppm
C1	7	0.154	23.300	2	0.154	20.333
C1	14	2.097	15.033	2	2.097	168.333
C1	21	0.35	16.933	2	0.35	30.333
C1	28	0.114	10.667	2	0.114	21.667
C2	7	0.192	15.367	2	0.192	21.333
C2	14	2.913	13.733	2	2.913	189.667
C2	21	0.247	13.467	2	0.247	24.667
C2	28	0.107	26.667	2	0.107	22.000
C3	7	0.447	11.267	2	0.447	31.833
C3	14	3.95	10.733	2	3.95	217.333
C3	21	0.391	12.900	2	0.391	33.333
C3	28	0.141	19.000	2	0.141	21.833
C4	7	0.454	8.600	2	0.454	39.000
C4	14	5.057	7.500	2	5.057	228.000
C4	21	0.537	5.933	2	0.537	41.500

C4	28	0.158	22.000	2	0.158	22.333
----	----	-------	--------	---	-------	--------

**Tabla 6. Identificación del hongo usado en lixiviación fúngica**

Hongo	Macroscópicas	Microscópicas
<i>Penicillium sp</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Micelio liso reverso</li> <li>- Colonias de color verde oscura anverso</li> <li>- Textura esponjosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Micelio septado</li> <li>- Conidio subglobulares</li> <li>- Conidioforos ter, cuater - verticulados</li> </ul>

## V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 CONCLUSIONES

Del análisis de resultados luego de la fase de experimentación nos permite concluir lo siguiente:

- Se determinó que *Penicillium* sp. tiene una buena producción de Ácido Cítrico (5.057 gr/L ), ratificándose ésta en el consumo de sucrosa.
- La liberación máxima de Cu se la obtuvo con B+, esto es 52.333 ppm.
- La tasa máxima de Cu disuelto por lixiviación química obtenida fue de 228.00 ppm, usando los datos de ácido cítrico obtenidos de la C4 a los 14 días en lixiviación biológica.
- La mayor producción de Ácido Cítrico no esta directamente ligada a la mayor solubilización de Cu.

- La ausencia de fuente de carbono y la presencia de mineral en la fermentación permite una mejor solubilización de Cu.
- Cuando el pH es alcalino no existe precipitación de los metales favoreciendo así la disponibilidad de las sales de cobre.
- La lixiviación a valores bajos de pH activa la reactividad de la ganga mineral.
- La lixiviación química es más eficaz que la lixiviación biológica para esta cepa y en estas condiciones.
- La temperatura del medio es un factor crítico que tiene un efecto profundo en la producción de Ácido Cítrico, siendo los valores óptimos entre 29°C y 31°C; cuando la temperatura es menor a 29°C la actividad enzimática del hongo tiende a disminuir mientras que, cuando la temperatura es mayor a 31°C la biosíntesis del Ácido Cítrico es baja debido a la producción de otros ácidos.
- Mediante claves taxonómicas se determinó que el hongo involucrado corresponde al genero *Penicillum*, la especie está por determinarse molecularmente.

## **5.2 RECOMENDACIONES**

- Se debería probar otras fuentes de carbono para determinar si se mejora la solubilización de cobre.
- Sería importante verificar si otros hongos pueden ayudar a mejorar los rendimientos.
- Estudios futuros deberían complementarse con la ayuda de la biooxidación asistida por bacterias.
- Se recomienda usar diámetros de partícula uniformes de mineral.
- Cuando el mineral posee una gran cantidad de carbonatos, cloritas, silicatos, feldespatos y arcillas mineralógicas se debe aplicar un proceso de curado del mineral, para evitar el consumo excesivo de ácido producto del metabolismo fúngico.
- Las temperaturas de operación deben ser verificadas con regularidad para evitar posibles problemas de desnaturalización de metabolitos.

- La inclinación de la mesa concentradora no debe ser constante, en función de que el mineral primario pueda o no poseer diversas concentraciones de sulfuros.
  
- Para la conservación de la cepa *Penicillium sp.* se recomienda elaborar el medio PDA como se indica en el anexo 1, ya que con el medio sintético no existe un crecimiento uniforme.
  
- Para posteriores investigaciones es conveniente hacer un estudio de que otros ácidos orgánicos se están produciendo y cuál ácido favorece mejor el proceso de biolixiviación.

## **VI BIBLIOGRAFÍA**

1. Alvarez, T. y Pelaez, D. 1998. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.
  
2. Aíslan, F.; Bulut G.; Kangal M.O.; Perek K. T.; Gûl A. y Gûrmen S. 2004. Studies on leaching of massive rich copper ore in acidic ferric sulfate solutions. Scandinavian Journal of metallurgy. 33: 6-14

3. Aung, K.; Ting Y. P. 2005. Biobleaching of spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*. 116: 159-170.
4. Brandl. H; Bosshard. R; Wegmann. M. 2000. Computer-munching microbes: metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungus. *Hydrometallurgy* 59: 319-326.
5. Blazy. P; El Beneficio de los Minerales. Manual de mineralurgia. 400-2433-'9
6. Carrillo, L. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes.
7. Curtis. H. y Barnes. N.S. 1993. Quinta Edición. *Biología*
8. Crueger W.; Crueger A. 1993. *Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial*.
9. Donati. E. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI).
10. Franz, A; Burgstaller W. y Schinner F. 1990. Leaching with *Penicillium Simplicissimum*: Influence of metals and Buffers on Proton on



Extraction and Citric Acid Production. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 769-774.

11. Gams. W; Hoekstra. E. S and Aptroot. A. 1998. *Course of Mycology*.
12. Hillis, D. V, Mortiz, C y Mable, B. K. 1996 *Molecular Systematics*.
13. Johson B., Macvicar J., Rolfe S. 1987. A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and Acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 18: 7-18.
14. Kamali. M. 2001. Recovery of Copper from the Low-Grade Ores by *Aspergillus Niger*.
15. Kiel, H. Guvrin, R. Henis, Y. 1981. Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger* on Low Sugar Concentrations and Cotton Waste. *Applied and Environmental Microbiology*. 42: 1-4
16. Magnuson, J.K. y Lasure.L.L. 2004. Organic Acid Production by Filamentous Fungi. *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine*.

17. Mateos, P. F Producción Industrial de Ácidos Orgánicos.
18. Minería, Minerales y Desarrollo Sustentable en América del Sur; Capítulo 7 - p. 449; Equipo MMSD América del Sur, Coeditado por: Centro de Investigación y Planificación del Medio Ambiente, CIPMA y Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, IDRC Iniciativa de Investigación sobre Políticas Mineras, IIPM; 2002
19. Mohammed M. G. 2002. Biosorption and solubilization of copper oxychloride fungicide by *Aspergillus niger* and the influence of calcium. Botany Department, faculty of Science, Menoufia University, Shebein El- Koom, Egypy.
20. Meruane, G. 1999. Criterios de diseño del circuito de soluciones en la lixiviación bacteriana de sulfuros de cobre en pilas. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
21. Moussa. N. 1999. El desarrollo de la minería del cobre en la Segunda mitad del siglo XX.
22. Rashid. H; Nawaz. H; and Bhattí. T. M. 2001. Bioleaching studies of Bauxite Ore using *Aspergillus níger*. OnLine Journal of Biological Sciences. 1(6): 501-504.

23. Rehman, A; Ali. and S; Haq, I. 2002. Temperatura Optima for Citric Acid Accumulation by *Aspergillus niger*. *Biotechnology*. 2-4: 108-110.
24. Rehman, A; Ali. and S; Haq, I. 2003. Selection of Fermentation for Citric Acid in Bioreactor. *Biotechnology*. 2: 178 - 184
25. Rezza, I. G. 2001 Tesis Doctoral CINDEFI Universidad de la Plata-Argentina.
26. Rios. C; E de la Torre, 1999. "Estudio del proceso de tostación de minerales auríferos refractarios, Tesis de grado EPN – FIQ, octubre
27. Santhiya D.y Ting Y. P. 2006. Use of adapted *Aspergillus niger* in the bioleaching of spent refinery processing catalyst. *Journal of Biotechnology*. 121: 62-74.
28. Schinner, F. and Burgstaller, W. 1989. Extraction of Zinc from Industrial Waste by a *Penicillium sp.* *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 1153-1156.
29. Scragg. A. 2004. *Biotecnología para Ingenieros. Sistemas Biológicos en Procesos Tecnológicos*

30. Qiu. M; Xiong. S; and Zhang. W. 2006. Efficacy of chalcopyrite bioleaching using a pure and a mixed bacterium. Journal of University of Science and Technology Beijing. 13: 7-10.
  
31. Wainwright. M. 1995. Introducción a la Biotecnología de los Hongos. Ed. Acribia. España

## PROTOSCOLOS Y MEDIOS

### 1.1 Medio MYP

Extracto de Malta	7 gr.
Peptona	1 gr.
Extracto de Levadura	0.5 gr.
Agar	15 gr.
Agua Destilada	1000 ml

Mezclar todos los componentes en las cantidades indicadas, esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos. Este medio se utiliza para aislar cepas fúngicas.

### 1.2 Medio PDA

#### Potato Dextrosa Agar

Papa	200 gr.
Agar	20 gr.
Dextrosa	15 gr.
Agua Destilada	1000 ml

Mezclar todos los componentes en cantidades indicadas, esterilizar en autoclave a 120°C por 20 minutos. Este medio se utiliza para conservar y repicar cepas de *Penicillium sp.*

### 1.3 Medio para producir Acido Cítrico

Sacarosa	[ 5% 10% 15% 20% ]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 gr.
Extracto levadura	2.0 gr.
MgSO <sub>4</sub>	0.2 gr.
CuSO <sub>4</sub>	0.078 gr.
Agua Destilada	1000 ml
pH	3.5

Mezclar todos los componentes en cantidades indicadas, esterilizar en autoclave a 120°C por 20 minutos. Este medio se utiliza para producir Acido Cítrico

### 1.4 Extracción de DNA Hongos. (kit QUIAGEN)

1. Recolectar de la muestra
2. Calentar 30ul de buffer AE a 65°C

3. Colocar en nitrógeno líquido  $-90^{\circ}\text{C}$  y sacar inmediatamente. Este rompe el tejido hasta quedar polvo
4. Adicionar 400ul de buffer AP1 y 4ul RNAasa solución stock (100mg/ml) a un máximo de 100mg tejido peso húmedo a 20mg peso seco y mezclar por vortex vigorosamente.
5. Incubar la mezcla por 10 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . Mezclar 2-3 veces durante la incubación invirtiendo el tubo.
6. Añadir 130ul de buffer AP2 para lisar, mezcle e incube en hielo por 5 minutos opcional el lisado por 5 minutos a máxima velocidad.
7. Verter el lisado en una columna lila colocado en un tubo de colección de 2ml y centrifugue por 2 minutos máxima velocidad.
8. Transferir la fracción sobrenadante del paso 7 a un nuevo tubo sin alterar el pelet de células.
9. Añadir 1.5 volúmenes de buffer AP3/E al producto del paso 7 y mezcle por pipeteo
10. Aplicar 50ul de la mezcla del paso 9, incluyendo cualquier precipitado que se pueda haber formado a una columna blanca colocada a un tubo colección de 2ml centrifugue por 1 minuto a 6000g (8000 rpm) y descarte el sobrenadante.
11. Repita el paso 10 con el resto de la muestra descarte el sobrenadante y el tubo de colección.

12. Colocar la columna blanca en un tubo de 2ml colección (incluido) y añada 500ul de buffer AW a la columna y centrifugue por 1 minuto a 6000 g (800r.p.m.).
13. Añadir 500ul de buffer AW a la columna blanca y centrifugue por 2 minutos a máxima velocidad para sacar la membrana.
14. Transferir la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 a 2ml (no incluido) y pipetee 100ul de buffer AE precalentada a 65°C directamente en la membrana. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugue por 1 minuto a 6000g (8000 r.p.m.). Para incrementar la concentración final del DNA se puede reducir la cantidad de buffer AE (25ul paso 14 al paso 15)
15. Repetir el paso anterior deseche la columna y guarde el DNA en congelador a -20°C.

## **1.5 Claves Taxonómicas**

### **Macroscópicas**

*Penicillium* colonias en el anverso de color verde oscuro en agar Extracto de Malta, textura esponjosa, en el reverso textura del micelio lisa

### **Microscópicas**

Los conidios producidos en columna subglobulares y/o elípticas menos comúnmente globulosa, conidioforos usualmente ter, cuater-verticulados estipes pequeños, brazos divergentes mas o menos cilíndricos (11)



## Anexo 2.

### IMÁGENES Y TABLAS

#### 2.1 Aislamiento de la Cepa Fúngica.



**Figura 3. *Penicillium sp.***

**Fuente: Las autoras**



**Figura. 4 Estructura del hongo *Penicillium sp.***

**Fuente: Las autoras**

## **2.2 Fase de fermentación en cultivo sumergido.**



**Figura 5. Muestras en agitación.**

**Fuente: Las autoras**

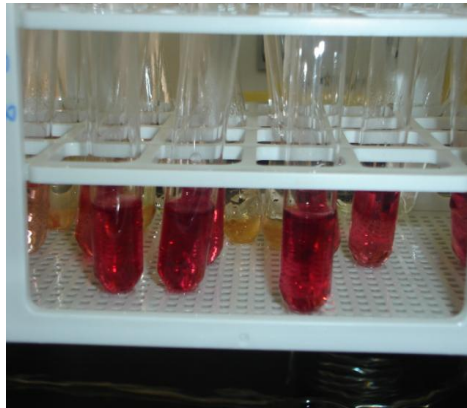
## **2.3 Filtración.**



**Figura 6. Muestras filtradas a los 14 días de fermentación.**

**Fuente: Las autoras**

#### **2.4 Determinación cuantitativa de Glucosa y Acido Cítrico.**



**Figura 7. Determinación Glucosa y Acido Cítrico.**

**Fuente: Las autoras**

#### **2.5 Preparación de Mineral.**



**Figura 8. Relave**

**Fuente: Las autoras**



**Figura 9.** Mesa concentración gravimétrica.

**Fuente:** Las autoras

## 2.6 Horno Refractario.



**Figura 10.** Tostación de relaves.

**Fuente:** Las autoras

**Tabla 6. Análisis de cabeza del concentrado.**

<b>Cobre</b>	2913.6 ppm
<b>Plata</b>	42.4 ppm

**Tabla 7. Consumo de Glucosa**

<b>TIEMPO</b>	<b>ESTANDAR</b>	<b>B ( + )</b>	<b>B ( - )</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
0	0.365	0.058	5.932	6.027	6.038	6.058	6.060
7	0.379	0.047	5.625	4.881	5.409	5.541	5.699
14	0.400	0.068	5.228	4.500	5.133	4.700	5.213
21	0.420	0.083	4.688	3.952	4.524	4.452	4.857
28	0.440	0.289	3.932	1.477	3.068	3.955	4.368

**Fuente:** Las autoras

**Tabla 8. Producción de Acido Cítrico**

<b>TIEMPO</b>	<b>ESTANDAR</b>	<b>B ( + )</b>	<b>B ( - )</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
0	0.005	0.060	0.240	0.120	0.180	0.120	0.120
7	0.002	0.450	0.300	0.750	0.750	1.050	0.300
14	0.076	0.071	0.000	0.043	0.028	0.047	0.043
21	0.125	0.043	0.000	0.094	0.026	0.038	0.084
28	0.430	0.020	0.014	0.115	0.046	0.101	0.292

**Fuente:** Las autoras

**Tabla 9. Influencia del mineral en el consumo de Glucosa**

<b>TIEMPO</b>	<b>ESTANDAR</b>	<b>B ( + )</b>	<b>B ( - )</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
0	0.548	0.666	4.808	2.350	3.471	5.266	6.226
7	0.380	0.618	4.792	2.155	3.325	4.181	4.501
14	0.405	0.020	4.212	1.798	2.557	3.542	3.563
21	0.486	0.194	2.355	1.051	1.591	1.703	3.234
28	0.378	0.107	3.249	2.189	3.360	4.100	4.386

**Fuente:** Las autoras

**Tabla 10. Influencia del mineral en la producción de Acido Cítrico.**

TIEMPO	ESTANDAR	B (+)	B (-)	C1	C2	C3	C4
0	0.355	0	0	0	0	0	0
7	0.262	0.193	0.311	0.154	0.192	0.447	0.454
14	0.030	2.490	0.253	2.097	2.913	3.950	5.057
21	0.040	0.193	0.040	0.350	0.247	0.391	0.537
28	0.158	0.352	0.121	0.114	0.107	0.141	0.158

Fuente: Las autoras

**Tabla 11. Medición de pH de acuerdo al tiempo.**

TIEMPO	B (+)	B (-)	C1	C2	C3	C4
0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
7	7.933	5.733	6.000	5.200	4.900	4.767
14	8.137	6.687	6.300	5.480	5.440	5.393
21	8.060	7.367	6.077	5.717	5.680	5.550
28	8.147	8.392	8.422	8.262	8.148	8.127

Fuente: Las autoras

**Tabla 12. Lixiviación Biológica.**

TIEMPO	B (+)	B (-)	C1	C2	C3	C4
0	13.800	0.200	0.500	0.100	0.200	0.100
7	20.433	14.400	23.300	15.367	11.267	8.600
14	24.600	20.400	15.033	13.733	10.733	7.500
21	24.100	15.133	16.933	13.467	12.900	5.933
28	52.333	23.333	10.667	26.667	19.000	22.000

Fuente: Las autoras

**Tabla 13. Lixiviación Química.**

TIEMPO / DIAS	LIXIVIACION QUIMICA	
	Ac. Cítrico gr /L	Solubilización de Cu ppm
2	0.154	20.333
2	2.097	168.333
2	0.35	30.333
2	0.114	21.667
2	0.192	21.333
2	2.913	189.667
2	0.247	24.667
2	0.107	22.000
2	0.447	31.833
2	3.95	217.333
2	0.391	33.333
2	0.141	21.833
2	0.454	39.000
2	5.057	228.000
2	0.537	41.500
2	0.158	22.333

**Fuente:** Las autoras

## CONTENIDOS

Cesión de derechos en tesis de grado i

Certificación

ii

Autoría

iii

Dedicatoria

iv

Agradecimiento

v

Contenidos

vi

Resumen

ix

### **CAPITULO I**

1. Introducción

1

1.1 Objetivo General

5



1.2 Objetivos Específicos

5

1.3 Hipótesis de trabajo

5

1.4 Diseño experimental y variables de estudio

6

**CAPITULO II**

2. Antecedentes

9

2.1 Generalidades de los Hongos

9

2.1.1 Clasificación de los Hongos

9

2.1.1.1 Deuteromicetes

10

2.2 Importancia de los Hongos

11

2.2.1 Biominería

12

2.2.1.1 Lixiviación de Cobre

20 13 2.2.2 Ácido Orgánicos

23

### **CAPITULO III**

#### **3. Materiales y Métodos**

28

##### **3.1 Aislamiento y Caracterización de la Especie Fúngica**

28

###### **3.1.1 Crioconservación de la Cepa Fúngica**

28

##### **3.2 Preparación del Mineral**

29

###### **3.2.1 Muestreo del mineral**

29

###### **3.2.2 Concentración Gravimétrica**

29

###### **3.2.3 Tostación del Concentrado**

30

##### **3.3 Fermentación.**

30

3.3.1 Determinación de Glucosa

31

3.3.2 Determinación de Ácido Cítrico

32

3.3.3 Determinación de Cobre Lixiviado

33

3.4 Lixiviación Química

34

**CAPITULO IV**

4. Resultados y Discusión

35

4.1 Análisis Estadístico

35

4.2 Análisis y Discusión de Resultados

38

**CAPITULO V**

5. Conclusiones y Recomendaciones

46

5.1 Conclusiones

46

5.2 Recomendaciones

48

**BIBLIOGRAFÍA**

50

**ANEXOS**

55