



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, 20 de junio de 2019.

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad, Neiva.

Los suscritos:

Leandro Argotte Ibarra, con C.C. No. 1.053.766.575,

Oscar Fernando Barreiro Quino, con C.C. No. 1.020.738.894,

Autores de la tesis de investigación titulado **Evaluación de la solubilidad de los fosfatos de la roca fosfórica a partir de tratamientos con edta y con vinazas de cacota de café inoculadas con *Aspergillus niger* Y *Penicillium sp.***

Presentado y aprobado en el año 2019 como requisito para optar al título de **Maestría en Ingeniería y Gestión Ambiental**;

Autorizamos al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS**



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

EL AUTOR/ESTUDIANTE: Leandro Argotte Ibarra.

EL AUTOR/ESTUDIANTE: Oscar Fdo. Barreiro Quino.

Firma: _____

Firma: _____

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

Título completo del trabajo: evaluación de la solubilidad de los fosfatos de la roca fosfórica a partir de tratamientos con edta y con vinazas de cacota de café inoculadas con *Aspergillus niger* Y *Penicillium* sp.

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Argotte Ibarra.	Leandro
Barreiro Quino	Oscar Fernando

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Castro Salazar	Hans Thielin
Cerquera Peña	Néstor Enrique

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Maestría en Ingeniería y Gestión Ambiental.

FACULTAD: Ingeniería.

PROGRAMA O POSGRADO: Maestría en Ingeniería y Gestión Ambiental.

CIUDAD: Neiva **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2019 **NÚMERO DE PÁGINAS:**150

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías_X_ Grabaciones en discos_X_ Ilustraciones en general_X_ Grabados___
Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas
o Cuadros_X_

Vigilada mieducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana



SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria): Tesis Meritoria.

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. Fosfatos	Phosphate	6. _____	_____
2. Pulpa de café	Coffee pulp	7. _____	_____
3. Roca Fosfórica	Phosphorus rock	8. _____	_____
4. Quelatos	Chelates	9. _____	_____
5. biorremediación	Remediation	10. _____	_____

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

Se evaluó la solubilidad del fosfato de muestras de roca fosfórica (RF) homogenizadas, obtenidas de la mina Media Luna ubicada en Aipe (Huila), por dos vías: una química con disoluciones de EDTA-disódico y la otra biológica con vinazas de pulpa de café inoculadas con *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* Las muestras de RF utilizadas se analizaron previamente mediante las técnicas FT-IR, DRX y SEM-EDS para su caracterización.

Los tratamientos químicos sobre muestras de RF se hicieron con disoluciones de EDTA disódico en concentraciones 0.0025, 0.010, 0.015, 0.035, 0.050, y 0.100 M; y con tratamientos de H_2SO_4 al 40% vol como parámetro de referencia. También se hizo un análisis del sistema reaccionante y del mecanismo de formación de complejos en el proceso de la solubilización de los fosfatos, para ello, experimentalmente, se hizo seguimiento de la reacción durante 24h con diferentes concentraciones de EDTA, luego, conceptualmente, se modelaron las moléculas de los posibles complejos de EDTA-Ca, y la estructura cristalina de la apatita usando los programas *ChemSketch 10.0* y *Vesta 3.4.6*, con lo cual se propuso un mecanismo de reacción para la disolución de un cristal de fluorapatita usando EDTA como ligando. Se obtuvo la mayor disolución de fosfatos con el tratamiento 0.035M de EDTA (hasta un 16.9% del fosfato solubilizado en H_2SO_4 40%v/v), y se identificó que existe un rango óptimo de concentraciones de EDTA en donde se favorece la disolución de los fosfatos de RF, también se observó que las reacciones ocurren en dos zonas de velocidad, una rápida (inferior a 2 minutos) y la otra lenta progresiva (más de 2 minutos).

En la vía biológica se trataron muestras de RF durante 6 semanas con vinazas de pulpa de café (*Coffea arabica*) e inóculos de *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* Los hongos fueron obtenidos en Agar Papa Dextrosa (PDA), y aislados e identificados en Agar Extracto de

Vigilada mieducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana



Malta (MEA) de acuerdo con métodos estándar de identificación morfológica. Se encontró que el *Aspergillus niger* se adaptó mejor y mostró mayor crecimiento micelial en las vinazas (cuyo pH inicial fue 4.0) que el *Penicillium sp.* La solubilización de la RF fue efectiva con las vinazas solas, y con las inoculadas con *Aspergillus niger*, obteniéndose los mejores resultados al inocular el consorcio *Aspergillus niger* – *Penicillium sp.* (hasta un 32.22% del fosfato soluble en H_2SO_4 40%v/v)). Los resultados encontrados se proponen, desde una perspectiva ambiental y de agricultura orgánica, como una alternativa a los tratamientos de acidulación convencional de la roca fosfórica con ácido sulfúrico.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Phosphate solubility was evaluated on homogeneous samples of phosphoric rock (PR) gathered from Media Luna mine located on Aipe city (Huila - Colombia), by two ways: one chemical using disodic-EDTA and the other biological using coffee pulp lixiviates inoculated with *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* The samples of PR were previously analyzed by FT-IR, DRX and SEM-EDS techniques for its characterization.

Chemical treatments on PR samples was made with disodic EDTA solutions at 0.0025, 0.010, 0.035, 0.050, 0.100 M concentration; and 40% v/v of H_2SO_4 treatment was taken as a reference. Also, an analysis of the reactive system and the mechanism of chelates formation in the solubilization process was made, for this, experimentally, reaction was followed for 24 hours at different concentrations of disodic EDTA, then, conceptually, the shapes of the possible complexes between EDTA-Ca and the crystalline structure of apatite was modelled using *Chemsketch 10.0* and *Vesta 3.4.6* computer software, with which a reaction mechanism for the solubilization of a fluorapatite crystal using EDTA as ligand was proposed. The grater phosphate solubilization was achieved with 0.035M disodic EDTA treatment (up to 16.9% of the solubilized phosphate with H_2SO_4 40%v/v)), and an optimal gap for EDTA concentrations was identified in which PR phosphate solubilization is viable, also, was observed that reactions occurred in two speed zones, one quick (less than 2 minutes) and the other progressive slow (over 2 minutes).

Biological treatments prepared with coffee (*Coffea arábica*) pulp lixiviates inoculated with *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* were applied for 6 weeks to several PR samples. The fungus species were obtained from environmental media on PDA, then isolated and identified on MEA, in according to standard morphological identification methods. It was found that *Aspergillus niger* species shows better mycelial growth than *Penicillium sp.* on coffee pulp lixiviates (initially at pH 4.0). PR phosphate solubilization was effective with single coffee pulp lixiviates and those inoculated with *Aspergillus niger*, getting the best results with *Aspergillus niger* – *Penicillium sp.* consortia inoculated (up to 32.22% of the solubilized phosphate with H_2SO_4 40%vol). Findings are proposed, from an environmentally friendly and organic agriculture perspective, as an alternative to conventional acidulation of phosphoric rock with sulfuric acid.

Vigilada mieducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Armando Torrente Trujillo.

Firma:

Nombre Jurado: Armando Torrente Trujillo.

Firma:

Nombre Jurado: Jennifer Katiusca Castro Camacho

Firma: Jennifer Katiusca Castro C

Vigilada mieducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

**EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LOS FOSFATOS
DE LA ROCA FOSFÓRICA A PARTIR DE TRATAMIENTOS
CON EDTA Y CON VINAZAS DE CACOTA DE CAFÉ
INOCULADAS CON *Aspergillus niger* Y *Penicillium sp.***

Leandro Argotte Ibarra

Ingeniero Químico

Oscar Fernando Barreiro Quino

Ingeniero Ambiental

**EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LOS FOSFATOS
DE LA ROCA FOSFÓRICA A PARTIR DE TRATAMIENTOS
CON EDTA Y CON VINAZAS DE CACOTA DE CAFÉ
INOCULADAS CON *Aspergillus niger* Y *Penicillium sp.***

Leandro Argotte Ibarra

Oscar Fernando Barreiro Quino

Tesis de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Magister en Ingeniería y Gestión Ambiental

Director

Ph.D., Hans Thielin Castro Salazar

Codirector

MSc., Néstor Enrique Cerquera Peña

Universidad Surcolombiana

Facultad de Ingeniería

Neiva, Colombia

2019

Dedicatoria

A Dios.

Dedico esta tesis a mi papá Gilberto Barreiro; mi mamá Ligia Quino y mi hermano Daniel Barreiro quienes me apoyaron todo el tiempo

A mi amigo y compañero Leandro Argotte, quien fue un gran compañero de tesis durante el tiempo en que escribíamos esta tesis.

A Hans Castro director de tesis, quien nunca desistió al enseñarme, al que continúa depositando su esperanza en mí.

A mi tíos, abuelos, primos y amigos quienes fueron un gran apoyo emocional durante el tiempo en que escribía esta tesis.

A QN ingeniería s.a.s. que me apoyaron en todo el porceso.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

Oscar Fernando Barreiro Quino.

Dedicatoria

A mi hermano, por abrir para mí tantas puertas

Leandro Argotte Ibarra

Agradecimientos

Son muchas las personas que directa o indirectamente fueron participes en este proyecto y nos sentimos agradecidos de ellos; de nuestras familias, de nuestros amigos.

Queremos agradecer especialmente a nuestro tutor Hans Thielin Castro, por su sabiduría, su apoyo y la motivación constante; a Carlos Ríos Reyes en la UIS por la colaboración en los análisis espectroscópicos DRX y SEM-EDS; a la universidad CORHUILA por apoyar este proyecto, también a don Eder y a Manuel quienes nos asistieron constantemente en el los laboratorios; a Nelson Gutiérrez en la USCO por la colaboración con los análisis de laboratorio FT-IR; a Fosfatos del Huila SA por su vinculación a este proyecto, y por poner a nuestra disposición las muestras de roca fosfórica de la mina Media Luna de Aipe. Finalmente, a la USCO y al programa de maestría en ingeniería ambiental liderado por nuestro codirector Néstor Cerquera, generadores de este espacio de formación.

Contenido

EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LOS FOSFATOS DE LA ROCA FOSFÓRICA A PARTIR DE TRATAMIENTOS CON EDTA Y CON VINAZAS DE CACOTA DE CAFÉ INOCULADAS CON <i>Aspergillus niger</i> Y <i>Penicillium sp.</i>	1
EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LOS FOSFATOS DE LA ROCA FOSFÓRICA A PARTIR DE TRATAMIENTOS CON EDTA Y CON VINAZAS DE CACOTA DE CAFÉ INOCULADAS CON <i>Aspergillus niger</i> Y <i>Penicillium sp.</i>	2
Agradecimientos	6
Contenido	8
Lista de Ilustraciones	11
Lista de cuadros	13
Lista de Abreviaturas	14
Resumen	16
Abstract	17
Introducción	18
Problemática	18
Justificación	21
Hipótesis	24
Objetivos	25
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	25
Referencias	26
Capítulo 1. Estado del Arte	31
1.1 Dinámica del fósforo en suelos tropicales.	31
1.2 La formación de quelatos en la solubilización del fósforo	32
1.2.1 El ácido etilendiaminotetraacético – EDTA	32
1.2.2 Reacciones de solubilización con EDTA	33
1.3 La roca fosfórica (RF)	34
1.3.1 La roca fosfórica del Huila	36
1.3.2 Fertilización con roca fosfórica	37

1.3.3	La solubilidad de la roca fosfórica.....	37
1.4	Los microorganismos solubilizadores de fósforo – MSP.....	38
1.4.1	El <i>Aspergillus niger</i>	40
1.4.2	El <i>Penicillium sp.</i>	42
1.5	La pulpa de café.....	43
1.6	Referencias.....	45
Capitulo 2.	Evaluación de la solubilidad de los fosfatos de la roca fosfórica del Huila vía formación de complejos con EDTA disódico.....	52
	Resumen.....	52
	<i>Abstract</i>	53
2.1	Introducción.....	54
2.2	Materiales y Métodos.....	55
2.2.1	Obtención de muestras de roca fosfórica.....	55
2.2.2	Análisis previo de las muestras de RF.....	55
2.2.3	Evaluación de los tratamientos con EDTA disódico.....	57
2.2.4	Estudio de la reacción de solubilización por formación de complejos.....	60
2.2.5	Análisis estadístico de los resultados experimentales.....	60
2.3	Resultados y Discusión.....	61
2.3.1	Obtención de las muestras.....	61
2.3.2	Análisis previo de las muestras.....	61
2.3.3	Evaluación de los tratamientos con EDTA disódico.....	74
2.3.4	Estudio de la reacción de solubilización por formación de complejos.....	76
2.4	Conclusiones.....	90
2.5	Recomendaciones.....	91
2.6	Referencias.....	92
Capitulo 3.	Evaluación de la solubilidad del fósforo de la roca fosfórica del Huila, tratadas con vinazas de pulpa de café inoculadas con los hongos de las especies <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium sp.</i>	95
	Resumen.....	95
	<i>Abstract</i>	96
3.1	Introducción.....	97
3.2	Materiales y Métodos.....	99

3.2.1	Preparación de las muestras.	99
3.2.2	Obtención, Identificación y cultivo de colonias de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium</i> sp.	100
3.2.3	Evaluación de los tratamientos con vinazas y hongos <i>Aspergillus niger</i> , y <i>Penicillium</i> sp.	103
3.2.4	Análisis estadístico de los resultados experimentales.	105
3.3	Resultados.....	106
3.3.1	Obtención, identificación y cultivo de colonias de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium</i> sp.	106
3.3.2	Evaluación de los tratamientos con vinazas y hongos <i>Aspergillus niger</i> , y <i>Penicillium</i> sp.	108
3.4	Discusión.....	114
3.5	Conclusiones.....	116
3.6	Recomendaciones.....	116
3.7	Referencias.....	117
Capitulo 4.	Resumen comparativo entre los tratamientos aplicados sobre RF con EDTA y con vinazas de PC inoculadas con <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium</i> sp.	121
4.1	Comentarios Finales.....	122
4.2	Referencias.....	122
Anexo A1.	Difractogramas DRX de la roca fosfórica.....	123
A2.	Micrografías SEM.....	125
Anexo A3.	Análisis estadístico de los resultados experimentales del tratamiento con EDTA.....	129
Anexo A4.	Análisis estadístico de los resultados experimentales del tratamiento biológico.	133
Anexo A5.	Seguimiento de los tratamientos biológicos - Fotografías.....	136
Anexo A6.	Algunas imágenes de archivo	141

Lista de Ilustraciones

Ilustración 1-1 El ciclo del fósforo. Adaptado de Frossard, 2000	31
Ilustración 1-2 Estructura del Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	32
Ilustración 1-3 Complejo tipo garra EDTA – Metal Hexa dentado.....	33
Ilustración 1-4 Complejo tipo garra 2EDTA-Fe tridentado.	33
Ilustración 1-5 Complejo EDTA-Ca. Estructura tridimensional octaédrica de los enlaces formados en el complejo Hexa-coordinado	34
Ilustración 1-6 Fotografía de una vesícula de <i>Aspergillus niger</i> (H. El-Fadaly, El-Kadi, & El-Gayar, 2016). (Barra 10 μ m).....	41
Ilustración 1-7 Morfología del hongo <i>Aspergillus</i> . Publicado por M. Piepenbring (2015).....	41
Ilustración 1-8 Fotografía con microscopio de barrido electrónico del hongo <i>Penicillium</i> (Barsainya, Chandra, & Singh, 2016)	43
Ilustración 1-9 Morfología del hongo <i>Penicillium</i> . M. Piepenbring, 2015	43
Ilustración 1-10 Composición del Fruto del café. Adaptado de López (López, 2017).....	44
Ilustración 2-1 Curva de calibración. Absorbancia a 400nm vs concentración de fosfato	59
Ilustración 2-2 imágenes al microscopio de las muestras de RF	61
Ilustración 2-3 Espectro FT-IR de la muestra IR1	62
Ilustración 2-4 Espectro FT-IR de la muestra IR2	63
Ilustración 2-5 Espectro FT-IR de la muestra IR3	63
Ilustración 2-6 Superposición de los espectros obtenidos para las muestras de RF analizadas.....	64
Ilustración 2-7 Espectro FT-IR de muestras de roca fosfórica reportados por Elouaer y otros, 2008	64
Ilustración 2-8 Espectro patrón IR del fosfato hidróxido de Calcio, reportado en la base de datos de NIST, 2018.	65
Ilustración 2-9 Muestra de RF 1 - Imagen principal – 3000μm \times 2500μm = 7.5 \times 106μm² = 7.5mm²	67
Ilustración 2-10 Muestra de RF 2 - Imagen principal – 3000μm \times 2500μm = 7.5 \times 106μm² = 7.5mm²	67
Ilustración 2-11 Características superficiales Muestra 1	71
Ilustración 2-12 Características superficiales Muestra 2	72
Ilustración 2-13 Resultados colorimetría. Tratamientos con EDTA disódico dihidrato – La intensidad del amarillo es proporcional al fosfato disuelto	74
Ilustración 2-14 Disolución de fosfato en función de la concentración de EDTA para un tiempo de reacción de 24 horas.....	75
Ilustración 2-15 Efecto del incremento de la concentración de EDTA disódico a intervalos de tiempo.....	76

Ilustración 2-16 Evolución de la reacción de solubilización de RF con el tiempo a diferentes concentraciones de EDTA disódico: a) 0-20min, b) 0-200min, c) 0 – 1400min	77
Ilustración 2-17 Complejos de EDTA-Ca: a) complejo tetradentado con 4 enlaces coordinados Ca-O, b) complejo hexadentado con 4 enlaces coordinados Ca-O y 2 enlaces coordinados Ca-N	80
Ilustración 2-18 a) Diagrama de laso, Dependencia del pH y la ionización del EDTA (Y). Adaptado de Harris (2007). b) especies ionizadas de EDTA: H6Y2+ , H4Y , H2Y2- , y Y4- (No se incluyeron las formas H5Y+ , H3Y- , y HY3-).....	81
Ilustración 2-19 Cadena EDTA-Ca bidentado	83
Ilustración 2-20 Vistas de una celda unitaria de fluorapatita. Modelo reportado por Huges (1989), visualizado en el software Vesta (Mamma & Izumi, 2011)	86
Ilustración 2-21 Cristal de fluorapatita compuesto por 2x2x3 celdas unitarias. Construido en el software Vesta a partir del modelo de celda unitaria reportada por Huges (1989)	87
Ilustración 2-22 gráfico de superficie que correlaciona el tiempo, la concentración de ligando [EDTA] y el fósforo obtenido en fase acuosa en ppm.	90
Ilustración 3-1 Quelato de Citrato de calcio	98
Ilustración 3-2 Quelatos de Oxalato de calcio	99
Ilustración 3-3 Aspecto de las vinazas preparadas.....	100
Ilustración 3-4 Conidióforos del <i>Penicillium</i> sp. A. Conidióforos con filiales solitarias. B. Monoverticiadas. C. Bifurcadas. D, E. Biverticiadas. F. Terverticiada. G. Cuaterticiado. Barra=10µm (Visagie y otros., 2014).....	102
Ilustración 3-5 Conidióforo de <i>Aspergillus niger</i> . Barra 20µm (Visagie y otros., 2014).....	102
Ilustración 3-6 Preparación de los tratamientos biológicos	105
Ilustración 3-7 Configuración del sistema de aireación de los tratamientos. A) esquema, B) fotografía del experimento.....	105
Ilustración 3-8 Identificación macroscópica y microscópica del hongo <i>Penicillium</i> sp.....	107
Ilustración 3-9 Identificación macroscópica y microscópica del hongo <i>Aspergillus niger</i>	108
Ilustración 3-10 Tratamiento V. Fosfatos solubles en ppm vs tiempo	110
Ilustración 3-11 Tratamiento V. Cambio del pH en el tiempo del tratamiento.....	110
Ilustración 3-12 Tratamiento VA. Fosfatos solubles en ppm vs tiempo	111
Ilustración 3-13 Tratamiento VA. Cambio del pH en el tiempo del tratamiento	111
Ilustración 3-14 Tratamiento VP. Fosfatos solubles en ppm vs tiempo	112
Ilustración 3-15 Tratamiento VP. Cambio del pH en el tiempo del tratamiento	112
Ilustración 3-16 Tratamiento VAP. Fosfatos solubles en ppm vs tiempo.....	113
Ilustración 3-17 Tratamiento VP. Cambio del pH en el tiempo del tratamiento	113

Lista de cuadros

Cuadro 1-1 Yacimientos de roca fosfórica más importantes en el Huila. Adaptado de Camacho, 2002	36
Cuadro 1-2 composición química de los minerales beneficiados en el departamento del Huila. Adaptado de Canteras y otros, 2008	37
Cuadro 2-1 Descripción de los tratamientos con EDTA disódico	57
Cuadro 2-2 Preparación del patrón para el método colorimétrico	59
Cuadro 2-3 Fases cristalinas identificadas en el espécimen seleccionado de la muestra DRX1	65
Cuadro 2-4 Fases cristalinas identificadas en el espécimen seleccionado de la muestra DRX2	66
Cuadro 2-5 Escaneo SEM-EDS del punto P1	68
Cuadro 2-6 Escaneo SEM-EDS del punto P2	68
Cuadro 2-7 Escaneo SEM-EDS del punto P3	69
Cuadro 2-8 Escaneo SEM-EDS del punto P4	69
Cuadro 2-9 Escaneo SEM-EDS del punto P5	70
Cuadro 2-10 Análisis Elemental a partir de los datos obtenidos con los métodos DRX y SEM-EDS	74
Cuadro 2-11 Resultados obtenidos con los tratamientos de EDTA disódico en la RF	75
Cuadro 2-12 Estructuras tridimensionales tubulares o de enlace (izquierda) y espaciales (derecha) de los complejos de EDTA-Ca.....	81
Cuadro 3-1 Descripción de los tratamientos aplicados	103
Cuadro 3-2 Resultados obtenidos con los tratamientos biológicos	109
Cuadro 4-1 Resumen de los resultados	121

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
RF	Roca Fosfórica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDTA-Na	Edeteato de sodio di hidrato
RVM	Reactivo de Vanadato-Molibdato
PC	Pulpa de Café
DRX	Espectroscopía de difracción de rayos X
SEM-EDS	Microscopía electrónica de barrido con escaneo de dispersión de energía de rayos X
FT-IR	Espectroscopia de absorción infrarroja con transformada de Fourier
MSP	Microorganismos solubilizadores de fosfato
HSP	Hongos solubilizadores de fosfato

Resumen

Se evaluó la solubilidad del fosfato de muestras de roca fosfórica (RF) homogenizadas, obtenidas de la mina Media Luna ubicada en Aipe (Huila), por dos vías: una química con disoluciones de EDTA-disódico y la otra biológica con vinazas de pulpa de café inoculadas con *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* Las muestras de RF utilizadas se analizaron previamente mediante las técnicas FT-IR, DRX y SEM-EDS para su caracterización.

Los tratamientos químicos sobre muestras de RF se hicieron con disoluciones de EDTA disódico en concentraciones 0.0025, 0.010, 0.015, 0.035, 0.050, y 0.100 M; y con tratamientos de H_2SO_4 al 40%vol como parámetro de referencia. También se hizo un análisis del sistema reaccionante y del mecanismo de formación de complejos en el proceso de la solubilización de los fosfatos, para ello, experimentalmente, se hizo seguimiento de la reacción durante 24h con diferentes concentraciones de EDTA, luego, conceptualmente, se modelaron las moléculas de los posibles complejos de EDTA-Ca, y la estructura cristalina de la apatita usando los programas *ChemSketch 10.0* y *Vesta 3.4.6*, con lo cual se propuso un mecanismo de reacción para la disolución de un cristal de fluorapatita usando EDTA como ligando. Se obtuvo la mayor disolución de fosfatos con el tratamiento 0.035M de EDTA (hasta un 16.9% del fosfato solubilizado en H_2SO_4 40%v/v)), y se identificó que existe un rango óptimo de concentraciones de EDTA en donde se favorece la disolución de los fosfatos de RF, también se observó que las reacciones ocurren en dos zonas de velocidad, una rápida (inferior a 2 minutos) y la otra lenta progresiva (más de 2 minutos).

En la vía biológica se trataron muestras de RF durante 6 semanas con vinazas de pulpa de café (*Coffea arabica*) e inóculos de *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* Los hongos fueron obtenidos en Agar Papa Dextrosa (PDA), y aislados e identificados en Agar Extracto de Malta (MEA) de acuerdo con métodos estándar de identificación morfológica. Se encontró que el *Aspergillus niger* se adaptó mejor y mostró mayor crecimiento micelial en las vinazas (cuyo pH inicial fue 4.0) que el *Penicillium sp.* La solubilización de la RF fue efectiva con las vinazas solas, y con las inoculadas con *Aspergillus niger*, obteniéndose los mejores resultados al inocular el consorcio *Aspergillus niger* – *Penicillium sp.* (hasta un 32.22% del fosfato soluble en H_2SO_4 40%v/v)). Los resultados encontrados se proponen, desde una perspectiva ambiental y de agricultura orgánica, como una alternativa a los tratamientos de acidulación convencional de la roca fosfórica con ácido sulfúrico.

Palabras clave: Fosfatos, pulpa de café, roca fosfórica, Quelatos, biorremediación

Abstract

Phosphate solubility was evaluated on homogeneous samples of phosphoric rock (PR) gathered from Media Luna mine located on Aipe city (Huila - Colombia), by two ways: one chemical using disodic-EDTA and the other biological using coffee pulp lixiviates inoculated with *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* The samples of PR were previously analyzed by FT-IR, DRX and SEM-EDS techniques for its characterization.

Chemical treatments on PR samples was made with disodic EDTA solutions at 0.0025, 0.010, 0.035, 0.050, 0.100 M concentration; and 40% v/v of H_2SO_4 treatment was taken as a reference. Also, an analysis of the reactive system and the mechanism of chelates formation in the solubilization process was made, for this, experimentally, reaction was followed for 24 hours at different concentrations of disodic EDTA, then, conceptually, the shapes of the possible complexes between EDTA-Ca and the crystalline structure of apatite was modelled using *Chemsketch 10.0* and *Vesta 3.4.6* computer software, with which a reaction mechanism for the solubilization of a fluorapatite crystal using EDTA as ligand was proposed. The grater phosphate solubilization was achieved with 0.035M disodic EDTA treatment (up to 16.9% of the solubilized phosphate with H_2SO_4 40%v/v), and an optimal gap for EDTA concentrations was identified in which PR phosphate solubilization is viable, also, was observed that reactions occurred in two speed zones, one quick (less than 2 minutes) and the other progressive slow (over 2 minutes).

Biological treatments prepared with coffee (*Coffea arabica*) pulp lixiviates inoculated with *Aspergillus niger* and *Penicillium sp* were applied for 6 weeks to several PR samples. The fungus species were obtained from environmental media on PDA, then isolated and identified on MEA, in according to standard morphological identification methods. It was found that *Aspergillus niger* species shows better mycelial growth than *Penicillium sp* on coffee pulp lixiviates (initially at pH 4.0). PR phosphate solubilization was effective with single coffee pulp lixiviates and those inoculated with *Aspergillus niger*, getting the best results with *Aspergillus niger* – *Penicillium sp* consortia inoculated (up to 32.22% of the solubilized phosphate with H_2SO_4 40%vol). Findings are proposed, from an environmentally friendly and organic agriculture perspective, as an alternative to conventional acidulation of phosphoric rock with sulfuric acid.

Keywords: Phosphate, coffee pulp, phosphoric rock, bioremediation

Introducción

Problemática.

La materia prima principal de este estudio es la roca fosfórica, en adelante RF, cuyo elemento fundamental es el fósforo. El fósforo es un elemento esencial para la vida y está presente en todos los seres vivos, de hecho, hace parte del ADN de innumerables especies. Naturalmente la dinámica del fósforo incluye la absorción de este por las plantas desde minerales fosforados en el suelo, con la ayuda de microorganismos solubilizadores de fosfato (MSP), y desde aquí a todos los demás seres vivos por medio de la cadena alimenticia.

El ser humano por medio de la agricultura consume grandes cantidades de fósforo para la fertilización de sus cultivos, este exceso de fósforo es obtenido desde yacimientos de RF, los cuales se consideran un recurso no renovable por su lento ciclo biogeoquímico. No existe un sustituto para el fósforo en la agricultura (Zapata & Roy, 2007); la (USGS) United States Geological Surveys en su reporte del 2017 presenta el estado actual del mercado de minerales de roca fosfórica (USGS, 2017), donde se estima que en unos 50 años, entre 2040 y 2060 (FAO, 2007) las fuentes convencionales de RF empezaran a escasear (Li y otros., 2015), y en unos 100 años las minas de fácil acceso a este mineral se agotarían (Gilbert, 2009); de manera que se tendría que recurrir a fuentes más complicadas para su extracción y de menor producción, lo que repercutiría directamente en el precio, el cual aumenta constantemente (Restrepo-Franco y otros., 2015), además del desbalance que generaría una menor oferta ante una demanda creciente de fertilizantes fosforados (Dibb, 2004). Por esto, de continuarse con las mismas prácticas de fertilización, se llegaría a un posible escenario de crisis en la producción agrícola, que preocupa a buena parte de la comunidad científica (Cordell, 2010; Cordell, Drangert, & White, 2009; Walan, 2014; Edixhoven, 2013).

La solubilidad o reactividad de la RF es el término acuñado para significar el grado de iones fosfato solubles en agua. Esta propiedad es muy importante, pues solo disuelto (se denomina también fósforo disponible) puede ser metabolizado por las plantas. Aunque el porcentaje de fósforo total presente en la roca fosfórica puede estar alrededor del 30%, la solubilidad de estos minerales de fósforo no alcanza el 1% en agua destilada, o expresado también como la solubilidad en citrato de amonio (parámetro recomendado por la FAO por aproximarse a las condiciones fisicoquímicas que se esperarían en el suelo) inferior al 9% de los fosfatos totales (Van Kauwenbergh, 2010), esto significa que el fósforo disponible en la RF es muy bajo (Pérez, de la Ossa, & Montes, 2012); por lo anterior, al aplicar RF directamente como fertilizante se espera una *eficiencia agronómica* baja (definición utilizada para medir la efectividad de un fertilizante) comparada con fertilizantes químicos los cuales ofrecen compuestos solubles de fósforo (Valenzuela, Barrera, & Pinochet, 2002);

aunque se debe aclarar que dependiendo de las condiciones físico-bio-geo-químicas del suelo la solubilización de la RF puede ser favorable (Morillo y otros., 2007).

La producción de fertilizantes de fósforo a partir de RF es un proceso con un alto requerimiento energético y cuesta 4 billones de dólares anuales en orden de suplir la necesidad global (Goldstein, Rogers, & Mead, 1993). Esto es un desperdicio de esfuerzo y recursos, teniendo en cuenta que entre el 75-90% del fertilizante aplicado, se inactiva formando compuestos insolubles con cationes metálicos como Al^{3+} , Fe^{2+} , o se pierde disuelto en procesos pluviales (Stevenson, 1986); de hecho, Goldstein (1993) afirma que con el fósforo fijo acumulado en los suelos sería suficiente para sostener la producción agrícola mundial por unos 100 años. Por tal razón, la comunidad científica considera urgente el desarrollo e implementación de nuevas prácticas de fertilización (Khan y otros, 2007).

El fósforo en forma de fosfatos solubles es un nutriente indispensable y escaso en los suelos de Colombia. Si el fósforo no se encuentra en cantidades suficientes y en la forma adecuada en el suelo para la producción agrícola, se retrasa la madurez en las cosechas en cultivos como arroz, maíz, algodón, soja, entre otras; además, la cantidad y calidad de la cosecha también se ven afectadas (Pérez, de la Ossa, & Montes, 2012). Según Trujillo y otros (2017) dado que Colombia es un país de la región tropical, es cálido, lluvioso en un 80% de su territorio; con el exceso de precipitaciones en la mayor parte del área nacional se lixivian los cationes (calcio, magnesio, aluminio e hierro) y consecuentemente los suelos en las zonas montañosas son ácidos, mientras que en la región caribe y una amplia zona de la región interandina son suelos de neutros a alcalinos (Trujillo y otros, 2017). Estas condiciones naturales encontradas en suelos tropicales característicos de regiones montañosas de Colombia actúan como sumideros de fósforo, por ser suelos ácidos y a veces con elevados contenidos de aluminio y hierro, se favorece la fijación del fósforo en forma de minerales no asimilables directamente por las plantas. Además, con la erosión, que es incrementada por las malas prácticas de labranza en suelos con topografías montañosas de media y alta pendiente, se maximiza el impacto negativo en los suelos. En efecto, todas estas problemáticas conllevan al agricultor colombiano, residente en estas áreas, a aplicar fertilizantes en exceso y a un elevado costo, hasta finalmente bloquear del suelo; esto es la incapacidad para la producción agrícola, consecuencia de la erosión y/o acumulación en exceso de nutrientes minerales al punto de acabar con la capa orgánica o alcanzar niveles tóxicos de compuestos minerales; la aplicación excesiva de fertilizantes también genera la contaminación de los cuerpos de agua, lo cual conduce a problemas por eutrofización (Chien, Prochnow & Snyder, 2011); y así, en muchos casos, el campesino migra a nuevas zonas de cultivo, ante la improductividad generada por malas prácticas de labranza, poca educación en las prácticas agrícolas y las dificultades sociales, lo que conlleva a un escenario de devastación progresiva del suelo y del medio ambiente (Beltrán & Pineda, 2014).

El registro más reciente de la caracterización de la roca fosfórica del Huila fue realizado por Chien & Hammond en 1978, donde se reportó concentraciones de fosfatos alrededor de 9.1% y que su solubilidad en citrato de amonio neutro es inferior a 3.5% (Chien &

Hammond, 1978). En ese tiempo se consideraba que la roca fosfórica del Huila tenía un gran potencial de explotación, sin embargo, con el tiempo el horizonte promisorio cambió, y la roca fosfórica del Huila pasó a un segundo plano debido a su baja concentración y baja solubilidad (Chien, Prochnow & Snyder, 2011) en comparación con otras rocas fosfóricas que empezaron a explotarse masivamente como en Carolina del Norte (Estados Unidos), desde donde se importa hacia Colombia alrededor del 70% del consumo nacional de fertilizantes fosfatados, tipo superfosfatos; o Marruecos que actualmente es el país con la mayor producción de RF a nivel mundial. En la actualidad, en el Huila se explota y refina la roca fosfórica como fertilizante de aplicación directa, enmienda de suelos y producción en pequeña escala de fertilizantes químicos.

Por otra parte, como en este trabajo se usó pulpa de café (PC) en la formulación de la alternativa de la biosolubilización de la RF, también se abordó la problemática relacionada esta, la cual es un subproducto de la producción del café; la PC se utilizó por ser un sustrato rico en carbohidratos, nutrientes y humedad, adecuados para el crecimiento de varios microorganismos (Blandon, Davila, & Rodriguez, 1999). La selección de la PC en este estudio se debe a que ha sido identificada por tener un elevado potencial de contaminación si no se trata o dispone adecuadamente (Pierre, Rosell, Quiroz, & Granda, 2009); por ejemplo: estudios han reportado que en el procesamiento de 100 kg de frutos de café maduros, se produce un 20% de café trillado, y el 80% restante está formado por subproductos de pulpa fresca (López, 2017); otro estudio reporta que para la producción de 25kg de café pergamino seco se produce una contaminación equivalente a la generada por las excretas y orina de 100 personas en un día (Blandon, Davila, & Rodriguez, 1999); específicamente en Colombia, teniendo en cuenta que la producción de PC es de $0.225 \frac{kg}{m^2 \cdot año}$ por cada millón de sacos de 60kg de café en almendra que Colombia exporta, se están generando $1.629 \times 10^9 kg$ de pulpa fresca, que producirían una contaminación equivalente a la generada durante un año en excretas y orina por una población de 868,736 habitantes (Rodríguez & Zambrano, 2010). Por lo anterior, este trabajo propone una alternativa para el reúso de la PC en la producción de fertilizantes orgánicos, lo cual permitiría un impacto ambiental positivo.

Justificación.

En respuesta a lo señalado en la problemática, este trabajo se justifica desde varios puntos de vista:

Con los resultados obtenidos, se proponen nuevas alternativas para contrarrestar la fijación del fósforo en el suelo. Al fertilizar, el fósforo disponible en la rizosfera disminuye rápidamente porque éste reacciona con las sustancias presentes antes de ser asimilados por las plantas, formando compuestos insolubles; este proceso se denomina fijación y depende del tipo de suelo, su composición química y su pH (Kar, Peak & Schoenau, 2012). El fosfato reacciona comúnmente con cationes metálicos como el Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{3+} y Al^{3+} presentes en una gran variedad de minerales orgánicos e inorgánicos en el suelo, por ejemplo: en suelos ácidos con el catión Fe^{3+} se forman variedades de fosfato de hierro ($FePO_4$) como la strengita ($FePO_4 \cdot 2H_2O$), con Al^{3+} se forman variedades de fosfato de Aluminio ($AlPO_4$) como la variscita ($AlPO_4 \cdot 2H_2O$); en suelos calcáreos ricos en cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} se forman, variedades de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_3$) denominados apatitas, y de fosfato de magnesio $Mg_3(PO_4)_2$, como catteita, estruvita, holtedalita y bobierita (Posso & De Prager, 2017). En estos procesos de fijación de fosfato también participan algunas especies de microorganismos y vegetales, los cuales generan metabolitos que contribuyen a la fijación de los fosfatos al suelo. En consecuencia, se acumula el fósforo en formas minerales inactivas (insolubles), de manera que la fertilización suele hacerse en exceso para contrarrestar la rápida fijación, lo que a largo plazo puede dejar el suelo estéril (Stutter y otros., 2012).

El estudio del efecto, de los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSP) y su actividad sobre residuos orgánicos como la PC, sobre la RF Aporta elementos para la comprensión de los procesos de solubilización natural de minerales de fosfato. El suelo es un ambiente delicado y complejo, allí, muchos factores influyen en su capacidad productiva. La variabilidad del suelo condiciona la aplicación de un fertilizante, donde variables como la acidez, la capacidad de intercambio iónico, la humedad, las precipitaciones, la materia orgánica, y los minerales presentes tienen una gran influencia (Jianbo y otros, 2011); también depende de las formas de biomasa y las especies de microorganismos que allí prosperan generando todo tipo de metabolitos capaces de movilizar nutrientes fijos en el suelo (Posso & De Prager, 2017). Por lo anterior, existe la necesidad de continuar estudiando en detalle los roles precisos y funciones de los metabolitos y enzimas capaces de movilizar el fósforo en los suelos (Frossard y otros, 2000; Beltrán, 2014), ya que la fertilidad del suelo depende de la presencia de los microorganismos en rizosfera (Phillips & Fahey, 2008).

En esta dirección, diversos estudios han demostrado, como las plantas tienen la capacidad de alcanzar compuestos de fósforo insoluble en una zona especial denominada micorriza,

donde ocurre una simbiosis entre el sistema radicular de la planta y diferentes microorganismos; de la actividad físico-bio-geo-química de esta zona se obtienen metabolitos y enzimas capaces de movilizar el fósforo insoluble; por ejemplo, se han identificado especies de árboles como el *Pinus radiata* (Liu, Loganathan, Hedley, & Skinner, 2006), el ciprés calvo *Taxodium distichum* (Moorberg, Vepraskas, & Niewoehner, 2015), entre otras plantas, los cuales sobreviven en suelos poco fértiles desarrollando un abundante sistema radicular, entrelazando sus raíces en clústeres, creando el entorno para el desarrollo de las micorrizas capaces de acceder a los escasos nutrientes (Wang, Kelly, & Kovar, 2004).

Por esto, es importante profundizar en el estudio de la dinámica fisicoquímica y la composición del suelo, las rizosfera y las micorrizas (Wasaki y otros., 2005; Jianbo y otros., 2011; Villegas & Fortin, 2001), y de los procesos biológicos que gobiernan la disponibilidad del fósforo para el crecimiento vegetal (Frossard y otros., 2000); de hecho, el uso de métodos espectroscópicos, como los usados en este trabajo, ha permitido estudiar la composición del suelo en un nivel más profundo (Ajiboye, Akinremi, Hu, & Jürgensen, 2008). Entre otras, algunas propuestas biotecnológicas para la bio-solubilización de fosfatos (Osorno, 2013; Beltrán, 2014) incluyen: el uso del ácido fítico segregado del excremento animal para promover la disolución de fosfatos en suelos calcáreos (Leytem, Smith, Applegate, & Thacker, 2006); el estudio de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y la producción de metabolitos solubilizadores de fosfatos (Pérez, de la Ossa, & Montes, 2012); el estudio de la simbiosis entre los hongos *Mortierella sp* y *Aspergillus niger* en la solubilización de RF (Osorio & Habte, 2013); el uso de biosólidos para la remediación de suelos bloqueados (Ippolito, Barbarick, & Norvell, 2007); el uso de estiércol de animales y aguas residuales domésticas como sustrato para microorganismos especializados (Tariq Siddique & Robinson, 2003), la utilización de biosólidos en la fabricación y aplicación de fertilizantes (Ajiboye y otros., 2008); el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, principalmente las solubilizadoras de fosfato y fijadoras de Nitrógeno, puede reducir el uso de fertilizantes químicos (Restrepo y otros., 2015), la aplicación de la bio-inoculación para disminuir la dosis de roca fosfórica a la mitad (Patiño & Sánchez, 2014), el uso del ácido cítrico para la movilización del fosfato (Lesage y otros., 2005). Adicionalmente, se deben desarrollar metodologías de cultivo y cosecha para optimizar la aplicación de los fertilizantes y el uso adecuado del suelo, esto implica integrar los procesos biológicos; lo cual se aborda en este trabajo al evaluar el efecto particular de los MSP seleccionados sobre el sustrato formulado, compuesto por RF y PC.

Brinda elementos para avanzar en la intensificación e innovación necesarios en los procesos industriales en el ambiente regional y nacional. Colombia es uno de los países de Latinoamérica con más consumo de fertilizantes, superando la producción interna, por lo que deben ser importados; el mercado de la producción interna de RF, aunque significativo, es regional, y su industrialización es pequeña. De acuerdo con la FAO, los principales países consumidores de fertilizantes son Brasil, Argentina, México, Chile, Venezuela,

Colombia y Perú (Zapata & Roy, 2007), mientras que los principales países productores en Latinoamérica son Brasil, México, Venezuela, Colombia y Perú (León, 1991).

Además, se ha determinado que la reactividad de la roca fosfórica en el suelo depende de la concentración de iones hidronio (H_3O^+), esto significa que la solubilidad de la roca fosfórica puede ser favorable cuando el pH del suelo es ácido (Morillo, Sequera, & Ramirez 2007). Por lo anterior, teniendo en cuenta que el pH característico de las montañas colombianas es ácido, como en las regiones cafeteras del Huila, entonces el uso de RF directamente como fertilizante sería favorable, permitiendo una mayor eficiencia agronómica de la RF; sin embargo este factor puede ser interferido por la presencia de los cationes intercambiables como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , y Fe^{3+} en el suelo.

Teniendo en cuenta que el departamento del Huila cuenta con yacimientos de RF, con reservas alrededor de 138 millones de toneladas métricas, que representan el 38 % del total nacional, lo cual equivale a cerca de 34.5 millones de toneladas métricas de fosfato (P_2O_5) (Canteras y otros, 2008), se considera que el Huila puede ser competitivo en el mercado de fertilizantes (Trujillo y otros., 2017). Además, de acuerdo con Trujillo, el Huila está en una posición estratégica, siendo el eje de la región andina, le rodea el 57% de la zona agrícola de Colombia; también, se tiene la posibilidad de aumentar la frontera agrícola en el territorio y de tecnificar el sector agropecuario. Adicionalmente, es importante mencionar que la RF califica como fertilizante orgánico, lo cual incentiva su uso en el marco de los objetivos del milenio, donde se resalta la importancia del uso de tecnologías sostenibles y la intensificación de los procesos para que se garantice la seguridad alimentaria y el uso eficiente de las fuentes naturales (Zapata & Roy, 2007). Para lograr esto, la acción del estado y de la empresa privada también es importante para el cuidado del ambiente con políticas de sostenibilidad y uso eficiente de las fuentes naturales de fosfato; por ejemplo, el gobierno de China se propuso como meta al año 2030 tener implementados modelos sostenibles de fertilización (Li y otros., 2015).

Se espera que este trabajo aporte nuevo conocimiento sobre la solubilización de la RF del Huila, y ofrezca elementos importantes para el desarrollo de nuevas alternativas para la agricultura; lo cual a largo plazo permita la formulación de mejores productos fertilizantes y de las técnicas de fertilización, con una buena productividad y uso eficiente de las fuentes naturales. Además, de brindar nuevas alternativas para el aprovechamiento de subproductos y/o efluentes de la actividad agrícola, como la pulpa de café, lo cual permita un impacto ambiental positivo.

Hipótesis.

De acuerdo con la problemática identificada, se propone que:

Es posible alcanzar un incremento en la solubilización efectiva de fosfatos de muestras de roca fosfórica originarias de yacimientos del Huila a partir de tratamientos bioquímicos que imitan los procesos de disolución que naturalmente ocurren en el suelo, utilizando fuentes naturales de fertilizantes y residuos de la actividad agrícola.

Este proceso, que incluye la preparación de un sustrato de vinazas de pulpa de café con roca fosfórica y la inoculación de hongos ambientales *Aspergillus niger* y *Penicillium sp*, permitirá la disolución de fosfatos por el mecanismo de formación de complejos con los cationes presentes en la roca fosfórica, promovido por los ácidos orgánicos producidos por los hongos.

Objetivos.

Objetivo General.

Evaluar el efecto sobre la solubilidad de los fosfatos de la roca fosfórica con tratamientos en fase acuosa preparados con EDTA disódico y con vinazas de pulpa de café inoculadas con *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*

Objetivos Específicos.

- i. Caracterizar las muestras de roca fosfórica mediante técnicas espectroscópicas de absorción infrarroja (FT-IR), de difracción de rayos X (DRX); y de microscopía electrónica de barrido con análisis elemental por espectroscopía de emisión de rayos X (SEM-EDS).
- ii. Evaluar la solubilidad de la roca fosfórica con disoluciones de edeteato disódico.
- iii. Evaluar la solubilidad de la roca fosfórica con tratamientos biológicos preparados con vinazas de pulpa de café e inóculos de *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*

Referencias

- Ajiboye, B., Akinremi, O. O., Hu, Y., & Jürgensen, A. (2008). XANES Speciation of Phosphorus in Organically Amended and Fertilized Vertisol and Mollisol. *Soil Science Society of America Journal*, 72(5), 1256. <https://doi.org/10.2136/sssaj2007.0078>
- Beltrán Pineda, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu*, 15(1), 101–113.
- Blandon Castaño, G., Davila Arias, M. T., & Rodriguez Valencia, N. (1999). Caracterización microbiológica y físico-química de la pulpa de café sola y con mucílago. *Cenicafé*, 50(1), 5–23.
- Canteras, V., Mateus, E., Muñoz, F., Montoya, C., Herrera, J., & Loy, J. (2008). Selección de la mejor alternativa para la industrialización de la roca fosfórica del Departamento del Huila.
- Chien, S. H., Prochnow, L. I., Tu, S., & Snyder, C. S. (2011). Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 89(2), 229-255.
- Chien, S. H., & Hammond, L. L. (1978). A Comparison of Various Laboratory Methods for Predicting the Agronomic Potential of Phosphate Rocks for Direct Application 1. *Soil Science Society of America Journal*, 42(6), 935-939.
- Cordell, D. (2010). *The Story of Phosphorus: Sustainability implications of global phosphorus scarcity for food security* (Doctoral dissertation).
- Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global environmental change*, 19(2), 292-305.
- Dibb, D. D. W. (2004). ¿Nos quedaremos sin fósforo? *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*, 22, 4. <https://bit.ly/2Px3Sbb>
- Edixhoven, J. D., Gupta, J., & Savenije, H. H. G. (2013). Recent revisions of phosphate rock reserves and resources: reassuring or misleading? An in-depth literature review of global estimates of phosphate rock reserves and resources. *Earth System Dynamics Discussions*, 4(2).
- Frossard, E., Condrón, L. M., Oberson, A., Sinaj, S., & Fardeau, J. C. (2000). Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of Environment Quality*, 29(1), 15–23. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900010003x>

- Gilbert, N. (2009). Environment: the disappearing nutrient. *Nature News*, 461(7265), 716-718.
- Goldstein A.H., Rogers R.D., Mead G. (1993) Mining by microbe, *Bio. Technol.* 11, 1250–1254.
- Ippolito, J. A., Barbarick, K. A., & Norvell, K. L. (2007). Biosolids impact soil phosphorus accountability, fractionation, and potential environmental risk. *Journal of Environmental Quality*, 36(3), 764–772. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0308>
- Jianbo, S., Lixing, Y., Junling, Zhang. Haigang, L., Zhaohai, B., Xiping, Chen. Weifeng, Z., & Fusuo, Z. (2011). Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology*, 156(3), 997–1005. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>
- Kar, G., Peak, D., & Schoenau, J. J. (2012). Spatial distribution and chemical speciation of soil phosphorus in a band application. *Soil Science Society of America Journal*, 76, 2297–2306. <https://doi.org/10.2136/sssaj2012.0146>
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. *Agronomy for sustainable development*, 27(1), 29-43.
- León, L. (1991). La experiencia del Centro Internacional para el Desarrollo de Fertilizantes en el uso de rocas fosfóricas en América Latina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 17(1-4), 49-69.
- Lesage, E., Meers, E., Vervaeke, P., Lamsal, S., Hopgood, M., Tack, F., & Verloo, M. (2005). Enhanced phytoextraction: ii. effect of edta and citric acid on heav. *International Journal of Phytoremediation*, 7, 143–152.
- Leytem, A. B., Smith, D. R., Applegate, T. J., & Thacker, P. A. (2006). The influence of manure phytic acid on phosphorus solubility in Calcareous Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 70(5), 1629–1638. <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0003>
- Li, H., Liu, J., Li, G., Shen, J., Bergström, L., & Zhang, F. (2015). Past, present, and future use of phosphorus in Chinese agriculture and its influence on phosphorus losses. *Ambio*, 44(2), 274–285. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0633-0>
- Liu, Q., Loganathan, P., Hedley, M. J., & Skinner, M. F. (2006). Root processes influencing phosphorus availability in volcanic soils under young *Pinus radiata* plantations. *Canadian Journal of Forest Research*, 36(8), 1913–1920. <https://doi.org/10.1139/X06-083>
- López Núñez, J. C. (2017). Producción de bio-alcoholes, a partir de mucílago obtenido con tres tecnologías utilizadas en el beneficio ecológico del café. Universidad de Manizales.

- Moorberg, C. J., Vepraskas, M. J., & Niewoehner, C. P. (2015). Phosphorus Dissolution in the Rhizosphere of Bald Cypress Trees in Restored Wetland Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 79(1), 343–355. <https://doi.org/10.2136/sssaj2014.07.0304>
- Morillo, A., Sequera, O., & Ramírez, R. (2007). Roca fosfórica acidulada como fuente de fósforo en un suelo ácido con o sin encalado. *Bioagro*, 19(3), 161-168.
- Osorno Bedoya, L. (2013). Bio-acidulación de roca fosfórica bajo condiciones in vitro. Universidad Nacional de Colombia.
- Osorio, N. W., & Habte, M. (2013). Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany*, 91(4), 274-281.
- Patño Torres, C., & Sánchez de Prager, M. (2014). Efecto de la aplicación de roca fosfórica y la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el crecimiento del ají (*Capsicum annum*). *Acta Agronómica*, 63(2).
- Pérez, C., de la Ossa, V. J., & Montes, V. (2012). Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del departamento de Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 4(1), 35-45.
- Phillips, R. P., & Fahey, T. J. (2008). The Influence of Soil Fertility on Rhizosphere Effects in Northern Hardwood Forest Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 72(2), 453–461. <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0389>
- Pierre, F., Rosell, M., Quiroz, A., & Granda, Y. (2009). Evaluación química y biológica de compost de pulpa del café en caspito municipio andrés Eloy blanco , estado Lara, Venezuela. *Bioagro*, 21(2), 105–110.
- Pilar-Izquierdo, M. C., Ortega, N., Perez-Mateos, M., & Busto, M. D. (2012). Barley seed coating with free and immobilized alkaline phosphatase to improve P uptake and plant growth. *Journal of Agricultural Science*, 150, 691–701. <https://doi.org/10.1017/S0021859612000019>
- Posso, E. J. S., & De Prager, M. S. (2017). Production of organic acids by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. *Acta Agronomica*, 66(2). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/acag.v66n2.56148>
- Restrepo - Franco, G. M., Marulanda - Moreno, S., de la Fe - Pérez, Y., Díaz - de la Osa, A., Lucia - Baldani, V., & Hernández - Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 46(1).
- Rodríguez Valencia, N., & Zambrano Franco, D. (2010). Los subproductos del café: fuente de energía renovable. *Avances Técnicos Cenicafé*, (3), 8. <https://doi.org/ISSN-0120-0178>

- Stevenson F.J. (1986) Cycles of soil carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur micronutrients, Wiley, New York
- Stutter, M. I., Shand, C. A., George, T. S., Blackwell, M. S. A., Bol, R., MacKay, R. L., ... Haygarth, P. M. (2012). Recovering phosphorus from soil: A root solution? *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es2044745>
- Tariq Siddique, M., & Robinson, J. S. (2003). Phosphorus Sorption and Availability in Soils Amended with Animal Manures and Sewage Sludge. *Journal of Environmental Quality*, (Speciale).
- Trujillo, A. T., Gómez, V. H. P., Cárdenas, E. M., Dussan, A. M., & Herrera, C. H. B. (2017). Oportunidades para el departamento del Huila en el mercado de fertilizantes. *Revista RETO: Revista Especializada en Tecnologías Transversales de la Organización*, 3(3), 93-104.
- USGS. (2017). *Mineral Commodity Mineral Commodity*.
- Van Kauwenbergh, S. J. (2010). *World phosphate rock reserves and resources* (p. 48). Muscle Shoals: IFDC.
- Valenzuela, E., Barrera, S., & Pinochet, D. (2002). Solubilización de roca fosfórica Carolina del Norte con cepas de *Aspergillus niger* aisladas desde un suelo trumao. *Boletín micológico*, 17.
- Villegas, J., & Fortin, J. A. (2001). Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NH₄⁺ as nitrogen source. *Canadian Journal of Botany*, 79(8), 865–870. <https://doi.org/10.1139/cjb-79-8-865>
- Walan, P., Davidsson, S., Johansson, S., & Höök, M. (2014). Phosphate rock production and depletion: Regional disaggregated modeling and global implications. *Resources, Conservation and Recycling*, 93, 178-187.
- Wang, Z. Y., Kelly, J. M., & Kovar, J. L. (2004). In Situ Dynamics of Phosphorus in the Rhizosphere Solution of Five Species. *Journal of Environment Quality*, 33(4), 1387. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.1387>
- Wasaki, J., Rothe, A., Kania, A., Neumann, G., Römheld, V., Shinano, T., ... Kandeler, E. (2005). Root Exudation, Phosphorus Acquisition, and Microbial diversity in the rizosphere of White Lupine as Affected by Phosphorus supply and Atmospheric Carbon Dioxide concentration. *Journal of Environment Quality*, 34(6), 2157.
- Zapata, F., & Roy, R. N. (Eds.). (2007). *Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible*. Roma, Italia: FAO.

Capítulo 1. Estado del Arte.

1.1 Dinámica del fósforo en suelos tropicales.

El fósforo se moviliza en el suelo y en el agua como componente esencial de todos los seres vivos. Aquí, el rol de los microorganismos es fundamental en la dinámica del fósforo en el suelo, pues ellos son capaces de asimilar formas minerales imposibles para las plantas, por medio de metabolitos como ácidos orgánicos y enzimas especializadas (Beltrán, 2014). Las plantas fabrican compuestos orgánicos a partir de minerales de fósforo disponibles en el suelo con la ayuda de los microorganismos en un proceso sinérgico que ocurre en la micorriza, a la vez que los herbívoros obtienen el fósforo de las plantas, y así desde el suelo a través de toda la cadena alimenticia (Frossard y otros, 2000).

El fósforo en el suelo existe en forma de compuestos minerales llamados apatitas, las cuales pueden ser de origen volcánico y orgánico; las variedades de apatita de origen orgánico se forman por la acumulación de restos óseos en procesos sedimentarios. Los yacimientos de apatita de origen orgánico se forman en procesos geológicos de acuerdo con el ciclo del fósforo por la acumulación de restos fósiles y posterior conformación de sustratos minerales en el subsuelo, este proceso toma miles de años y, por tanto, se considera que el fósforo es una fuente no renovable (Ilustración 1-1). Contrariamente con la afirmación de Dibb (2004), quien presenta una opinión optimista respecto a los avances tecnológicos en el futuro y la relativa abundancia de este elemento, es claro que el efecto del uso ineficiente del mismo tendrá consecuencias directas sobre la producción agrícola y seguridad alimentaria de no actuarse a tiempo, como lo señala Gilbert (2009).

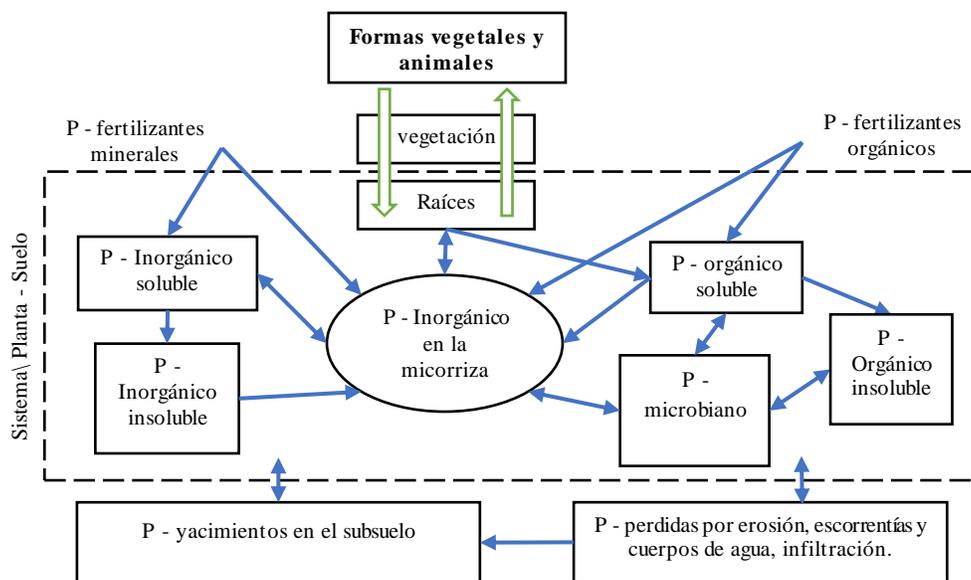


Ilustración 1-1 El ciclo del fósforo. Adaptado de Frossard, 2000

Las plantas toman el fósforo soluble disponible en el suelo, en formas de aniones fosfato: $H_2PO_4^{-1}$ y HPO_4^{-2} , los cuales son suministrados por la actividad microbiana en la rizosfera, o artificialmente con fertilizantes. Sin embargo, se han identificado diferentes rutas de fijación del fósforo en el suelo (Sanyal & Datta, 1991). Algunos microorganismos solubilizan, mientras que otros inmovilizan el fósforo en formas orgánicas insolubles; la inmovilización microbiana del fósforo ha sido tema de interés en varios estudios (Bojinova y otros., 2008; Bünemann y otros., 2011). El fósforo es comúnmente inmovilizado por precipitación con cationes metálicos Al^{3+} y Fe^{3+} en suelos ácidos, y con cationes Ca^{2+} en suelos alcalinos (Wakelin y otros., 2004; Yingben y otros., 2012); de hecho, la cantidad de fósforo soluble, sólo representa entre 0.05 y 0.1% del contenido total del fósforo en el suelo (Deubel & Merbach, 2005; Scervino y otros., 2010; Osorio, 2013). Como los ritmos metabólicos de las plantas son lentos comparados con estos procesos de fijación, en la fertilización ocurre una acumulación de fósforo en el suelo. Adicionalmente las precipitaciones lavan rápidamente del suelo el fósforo soluble, llevando éste a los cuerpos de agua.

1.2 La formación de quelatos en la solubilización del fósforo.

Los quelatos, o también llamados compuestos complejos, son sustancias que presentan la formación de dos o más enlaces coordinados desde los grupos funcionales de una misma molécula con iones metálicos; este proceso se denomina quelación y es de especial interés, pues tiene la capacidad de secuestrar cationes metálicos, permitiendo la movilidad de los aniones fuertemente enlazados a estos. En el caso de la roca fosfórica y otros minerales de fósforo presentes en el suelo, la quelación permite la movilidad del anión fosfato desde las formas fijas (insolubles) en el suelo, a formas disponibles (solubles), asimilables para las plantas. El ácido etilendiaminotetraacético (Ilustración 1-2) es un buen representante de los quelatos, también llamados ligandos (Harris, 2007).

1.2.1 El ácido etilendiaminotetraacético – EDTA.

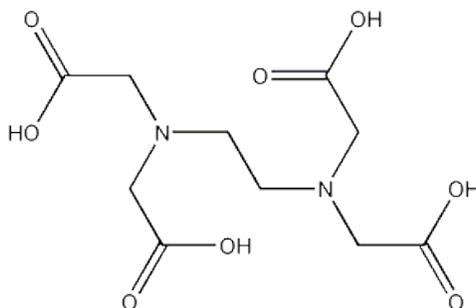


Ilustración 1-2 Estructura del Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

En la ilustración 1-2 se muestra la molécula de EDTA desplegada, en ella los oxígenos grupos hidroxilo son las áreas activas de la molécula y son precisamente estos, los que se

encargan de secuestrar los cationes metálicos formando así un compuesto complejo (Ilustraciones 1-3 y 1-4); es así, como la competencia por el catión por parte de los grupos hidroxilo es capaz de atacar sustratos minerales bastante estables químicamente, como los fosfatos de calcio, de hierro y de aluminio.

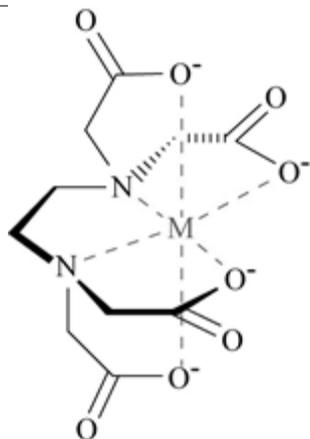


Ilustración 1-3 Complejo tipo garra EDTA – Metal Hexa dentado.

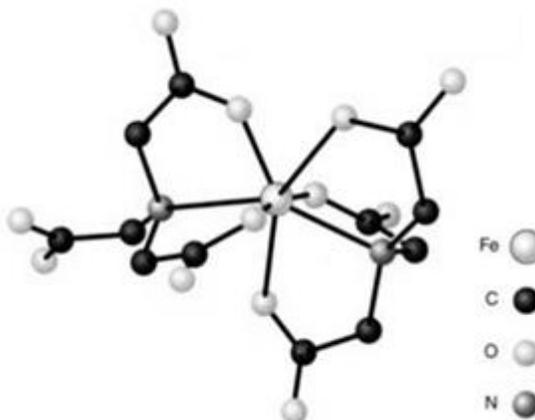
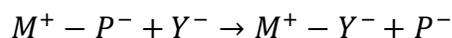


Ilustración 1-4 Complejo tipo garra 2EDTA-Fe tridentado.

1.2.2 Reacciones de solubilización con EDTA.

La reacción se puede entender simplemente como una reacción de intercambio iónico.

Reacción global



Dónde:

M^+ : *cation metálico*

Y^- : *anión EDTA*

P^- : *anión fosfato*

Por ejemplo: La molécula de EDTA al formar un complejo envuelve al catión Ca^{2+} desde seis orientaciones diferentes. De aquí la fuerza para lograr secuestrar el calcio de minerales bastantes estables al formar seis enlaces coordinados; en esta forma el complejo formado se denomina Hexa-coordinado, al sumarse las acciones de 4 grupos carboxilo y de los pares de electrones libres de los dos nitrógenos de la molécula de EDTA (Ilustración 1-5).

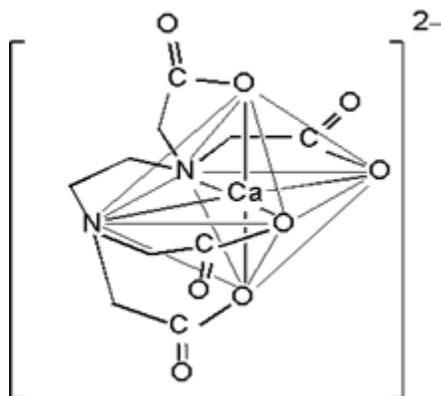


Ilustración 1-5 Complejo EDTA-Ca. Estructura tridimensional octaédrica de los enlaces formados en el complejo Hexa-coordinado

Por otra parte, por la complejidad del suelo considerado como un sistema reaccionante, es necesario estudiar los mecanismos de solubilización de los compuestos de fósforo, pues, existe una gran variedad de especies orgánicas e inorgánicas de fósforo en el suelo que son desconocidas y permanecen sin identificar (Jianbo y otros., 2011). Por ejemplo, Turner y otros (2003) reportaron información detallada de compuestos de fósforo identificados en el suelo; allí, las especies de fósforo solubles fueron cuantificadas por extracción con *EDTA-Na*, posteriormente analizadas con el método de resonancia magnética nuclear $^{31}\text{P-NMR}$, donde consiguieron identificar un numeroso conjunto de sustancias. El valioso trabajo de Turner generó un banco de espectros patrón NRM para los compuestos de fósforo identificados (Turner, Mahieu, & Condrón, 2003).

Entre otras aplicaciones de la quelación, Meers y otros (2008) sugieren como alternativa para la remediación de suelos contaminados con metales pesados, el uso de fito-extracción asistida con EDTA y ácido cítrico, lo cual permite que los metales pesados pasen del suelo a especies vegetales especializadas, hiper-acumuladoras y resistentes a éstos, para su posterior eliminación (Lesage y otros., 2005).

1.3 La roca fosfórica (RF).

La roca fosfórica (RF) está constituida principalmente por fosfato tricálcico $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, en sus formas cristalinas generalmente se encuentra con sustituyentes, carbonato, fluoruro, hidroxilo, cloruro e hidrato, entre otros, formando así los llamados compuesto de apatita. Este mineral se extrae principalmente, de yacimientos de origen biológico marino, también de depósitos superficiales formados por la acumulación de excremento de aves marinas; o también de origen ígneo, producto de procesos volcánicos e hidrotermales. A continuación, se presentan las fórmulas químicas de los compuestos más comunes de apatita presentes en la RF:

Hidroxiapatita	$3Ca_3(PO_4)_2 \cdot Ca(OH)_2$
Carbonato-apatita	$Ca_3(PO_4)_2 \cdot CaCO_3$
Fluorapatita	$3Ca_3(PO_4)_2 \cdot CaF_2$
Cloro-apatita	$3Ca_3(PO_4)_2 \cdot CaCl_2$

El nombre comercial “roca fosfórica” es usado para identificar al menos 300 minerales de fosfato de origen natural, con diferentes características alrededor del mundo (Hammond & Day, 1992); Por ejemplo, las rocas fosfóricas de origen sedimentario pueden presentar variaciones en el contenido de fosfatos entre 3 y 36%, además, propiedades como su solubilidad y la presencia de elementos menores como metales pesados, entre otros, diferencian unas de otras.

Para la caracterización de las especies minerales de fósforo presentes en la RF es necesario recurrir a diferentes técnicas (Turner, 2003), por ejemplo: XANES (X-ray Adsorption Near Edge Structure), NMR (Nuclear Magnetic Resonance), FT-IR (Fourier transform Infrared), DRX (difracción de rayos X), microscopía electrónica de barrido SEM-EDS, Espectroscopía Raman, entre otras. Estas técnicas de análisis deben ser utilizadas en conjunto, pues cada una permite identificar específicamente cierto tipo de sustancias y/o grupos funcionales (Kizewski, Liu, Morris, & Hesterberg, 2011).

La roca fosfórica es utilizada a nivel mundial para la fabricación de fertilizantes principalmente, con un 90% de la producción, el 10% restante se emplea en la fabricación de alimentos para animales, en la manufactura detergentes y en la síntesis de productos químicos (Zapata & Roy, 2007). Los principales países productores de roca fosfórica son USA, China, Marruecos y Rusia, con una participación del 90% de la producción mundial, además, se estima que poseen las mayores reservas del mineral. Gran parte de estos son depósitos sedimentarios contienen fluorapatita carbonatada (o carbonato-fluorapatita) (Zapata & Roy, 2007); otras formas de apatita, se encuentra en grandes yacimientos en Noruega, Suecia, Canadá, Rusia, Suiza, España, Uganda, Zimbabue, Finlandia y Brasil. En Latinoamérica los principales productores son Brasil, México, Venezuela, Colombia y Perú; y los principales consumidores son Brasil, Argentina, México, Chile, Venezuela, Colombia y Perú (Trujillo y otros, 2017).

En Colombia las reservas de RF inferidas reportadas son de unas 366.48 Mton (Nielson & Sarudiansky, 2005). Estas reservas son yacimientos de origen sedimentario y se encuentran a lo largo de la cordillera oriental, se estima que se formaron en el cretáceo superior y componen 4 grandes formaciones: Formación Guadalupe en el Centro del país, formación La Luna en Norte de Santander, formación Monserrate en Tolima y Huila, y formación Villeta en el Putumayo. En Norte de Santander, en los municipios de Lourdes y Gramalote; en Santander, en San Vicente de Chucuri; en Boyacá, en Sogamoso, Monguít, Tota, Tunja, Samaná, Turmequé, Toca, Pesca, y Jenesano; en el Huila, en Palermo, Aipe, Teruel, Yaguará y Tesalia; y en el Tolima, en Coyaima, Ortega, Icononzco y Pandi. Estas rocas fosfóricas se presentan en fases geológicas de tipo areniscas, de lutitas y de calizas. Las

minas más importantes y actualmente en explotación son: Sardinata en Norte de Santander, Pesca en Boyacá, y Aipe en el Huila; también de gran importancia son las reservas en Boyacá (Zanguña y otros., 2017; Georecursos, 2005).

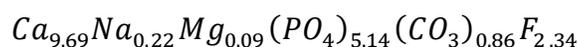
1.3.1 La roca fosfórica del Huila.

En el departamento del Huila los yacimientos de RF son de origen sedimentario marino, que afloran sobre la cuenca de Monserrate, formada en el cretáceo superior. Se estima una reserva total de 138.0 millones de toneladas métricas, que representan el 38 % del total nacional, lo cual equivale a cerca de 34.5 millones de toneladas métricas de P_2O_5 (Canteras y otros, 2008); los municipios con reservas de RF de interés económico son: Palermo, La Guagua, Baraya, Aipe, Teruel, Yaguará y Tesalia (UPME, 2005; Camacho, 2002); en los cuadros 1-1 y 1-2 se presentan datos reportados para los yacimientos encontrados en el departamento del Huila.

Cuadro 1-1 Yacimientos de roca fosfórica más importantes en el Huila. Adaptado de Camacho, 2002.

Localidad y yacimiento	Reservas inferidas [$\times 10^6 ton$]	Espesor de capa sedimentaria [m]	Tenor de fosfatos % P_2O_5
Palermo	12	0.5 – 1.6	19 – 28
- La Guagua			
Baraya	20	< 2	< 28
- Los pinos			
- Los andes			
Aipe	17	0.65 – 1.0	25 – 30.8
- Sinclinal de Mapatá			
- Media Luna			
Teruel	15	0.9 – 2.2	15 – 25
- La Juanita			
Yaguará			
- Sector occidente	5	1.0 – 2.4	18 – 31
- Sector norte	10	0.7 – 2.0	13 – 23
Tesalia	6	0.8 – 1.2	20 – 31

Con respecto a las características de estas reservas, se encontraron registros de 1978, en dónde Chien y Hammond (1978) determinaron la composición relativa de la RF, e identificaron los componentes Ca, Na, Mg, PO_4, CO_3 y F de muestras obtenidas en el yacimiento Media Luna. La fórmula química empírica obtenida en ese estudio se presenta a continuación:



Cuadro 1-2 composición química de los minerales beneficiados en el departamento del Huila. Adaptado de Canteras y otros, 2008.

Municipio	Yacimiento	%P₂O₅	%SiO₂	%Fe₂O₃	%CaO	%Al₂O₃	%MgO
Apie	Media Luna	31,59	10,79	0,56	39,34	0,79	0,12
Yaguará	La Cañada	24,55	25,05	0,85	38,96	0,45	0,15
Baraya	San Camilo	28,95	21,36	1,06	34,72	0,93	0,13
Teruel	La Juanita	24,46	19,62	0,43	36,61	0,45	0,20

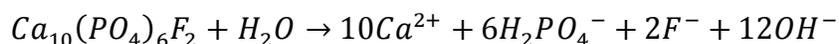
1.3.2 Fertilización con roca fosfórica.

La RF es usada como enmienda para el suelo, también, por su alto contenido de calcio, permite acondicionar el pH en suelos ácidos. Algunos estudios han evidenciado que puede ser efectiva en la inmovilización de Pb en suelos contaminados; asimismo, otros metales pesados y fitotóxicos, por ejemplo, en la inmovilización de Zn, Cu y Pb (Cao, Wahbi, Ma, Li, & Yang, 2009); entre otros estudios, la detoxificación del suelos cargados con Cd, Cu y Pb (Campbell y otros, 2006).

El principal inconveniente para el uso extensivo de RF como fertilizante es la baja solubilidad de los fosfatos. La comercialización del mineral en su forma natural, en donde solo se le aplica un beneficio primario que consiste en secado, molienda y granulación, está limitada por los altos costos de transporte, por lo que solo es viable en regiones aledañas al lugar de producción. Sin embargo, actualmente se estudian alternativas de tratamientos, que permitan mejorar la solubilidad de la RF, para que sea un producto competitivo; con especial interés se evalúa la aplicación de alternativas biotecnológicas (Ivanova, 2006), esto acorde con el creciente interés en la agricultura orgánica y de responsabilidad ambiental. De hecho, es una oportunidad de innovación, pues el uso descontrolado de fertilizantes industriales es perjudicial para el medio ambiente; estos, cada día crecen en costos, y se desperdician exageradamente, lo que acarrea múltiples problemáticas ambientales (Gyaneshwar y otros., 2002; Jianbo y otros., 2011). Por lo anterior, el uso eficiente de la RF ligado a procesos biológicos es una necesidad con miras a un futuro de agricultura sostenible.

1.3.3 La solubilidad de la roca fosfórica.

Se denomina “solubilidad de la roca fosfórica” al porcentaje de fosfatos de ésta que son disueltos en fase acuosa. Algunas definiciones se hacen con base en la solubilidad de la RF en disoluciones de citrato de amonio neutro, o ácido cítrico, de acuerdo con métodos recomendados por la FAO (Zapata y Roy, 2007). La disolución de la roca fosfórica implica la formación de una variedad de especies en fase iónica, dada su compleja composición. A continuación, se presenta una reacción simplificada de la ionización de la fluorapatita (FAO, 2004).



Reacción de ionización de la fluorapatita.

1.3.3.1 Tratamientos para mejorar la solubilidad de la RF.

Para obtener fosfatos solubles en la producción industrial de fertilizantes se aplica acidulación completa (o digestión) con ácido sulfúrico y fosfórico, a elevada temperatura; (Xiao y otros., 2008). Por otra parte, cuando no es rentable la producción de fosfatos solubles debido a las características del yacimiento, se puede comercializar la roca fosfórica directamente como fertilizante natural; pero su eficiencia agronómica es menor, por esto, se han implementado tratamientos adicionales a los de beneficio básico, que consisten en molienda, tamizado, clasificación y granulación. Estos tratamientos adicionales incluyen: la termoactivación, la acidulación parcial, y la bioacidulación; también se han formulado mezclas activas de RF con biosólidos y/o residuos agroindustriales, y aditivos como el azufre (Morillo, 2007). Otros factores importantes tienen que ver con las técnicas de aplicación del fertilizante, el riego, el acondicionamiento del suelo y el conocimiento del cultivo; también, de acuerdo con la FAO, es muy importante que haya programas de apoyo experto y capacitación para los agricultores (Zapata y Roy, 2007).

1.4 Los microorganismos solubilizadores de fósforo – MSP.

Son microorganismos que dentro de sus actividades metabólicas asimilan sustratos fosfóricos y/o producen sustancias (metabolitos) capaces de reaccionar con estos minerales de fósforo, derivando fosfato en formas solubles aptas para su asimilación por parte de las plantas. En perspectiva, el futuro de la fertilización sostenible depende del uso efectivo de los MSP (Stutter, 2012)

En el estudio de estos procesos se han identificado diferentes mecanismos a través de los cuales los microorganismos consiguen movilizar el fosfato. El autor Osorno (2013) presenta una lista de los mecanismos químicos propuestos en diferentes estudios para explicar la solubilización de minerales de fósforo por la actividad de los MSP. Estos mecanismos incluyen: la producción de ácidos inorgánicos, o de sus bases conjugadas; la excreción de protones debido a la asimilación de cationes amonio NH_4^+ por los MSP; la desorción de iones fosfato de los sitios de adsorción; la quelación de cationes Ca^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} ; y la competencia de los aniones orgánicos producidos por los MSP con los iones fosfato por los sitios de adsorción en las superficies de los minerales.

Como muchos MSP, la capacidad para disolver el fosfato mineral está relacionada con la producción de ácidos orgánicos (Wakelin y otros., 2004). Estos ácidos son productos del metabolismo microbiano, en algunos casos por respiración oxidativa o por fermentación de sustratos carbonáceos ricos en carbohidratos (Gyaneshwar y otros., 2002); estos ácidos liberados en el medio (rizosfera) reducen el pH, y promueven la formación de complejos

órgano-minerales; en la naturaleza estos procesos son esenciales (Scervino y otros., 2010). Algunos de estos ácidos orgánicos, identificados en diferentes estudios (Sanyal & de Datta, 1991), asociados con procesos de quelación son: el ácido glucónico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido aspártico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido láctico, ácido succínico, ácido propiónico, ácido isovalérico, ácido isobutírico, ácido acético y ácido málico (Posso & de Prager, 2017). Asimismo, se han estudiado diferentes situaciones; por ejemplo, Las interacciones en la micorriza entre el suelo, bacterias y hongos, y la solubilización de fosfato (Villegas & Fortin, 2001); también, la relación entre los procesos de descomposición de la biomasa en estiércol animal y la producción de ácidos orgánicos (Leytem y otros., 2006); otros trabajos se han enfocado en la evaluación de especies específicas para la solubilización de fosfato usando diferentes sustratos (Vio, 2014).

Asimismo, en Colombia se han realizado numerosos estudios en biosolubilización de fosfato y en la identificación de MSP (Moratto y otros, 2005; Perez, C, De la Ossa, & Montes, 2012; Pineda, 2015); a continuación se mencionan algunos trabajos:

- En el municipio de Sincé, departamento de Sucre, se realizó un experimento con el objetivo de aislar especies de Hongos solubilizadores de fósforo (HSP) presentes en la rizosfera y endófitos presente en las raíces de pasto *Colosoana*, donde se consiguieron identificar 53 especies de hongos en suelo y 43 en raíces, de los cuales se encontraron 36 HSP (Perez, C y otros., 2012). Es importante resaltar que en ese trabajo se identificó la variedad de hongos *Penicillium sp* y *Aspergillus niger* fueron los HSP predominantes.
- En estudios realizados en zonas de páramo en el municipio de Ventaquemada, Boyacá, y en páramo de Guerrero, Cundinamarca, se lograron aislar 43 HSP, a partir de muestras de la rizosfera de plantas de papa *Solanum tuberosum* (Pineda, 2015); en donde se identificaron dos cepas promisorias para la fabricación de biofertilizantes de fosfato, pertenecientes a los géneros *Scopurialiopsis sp.* y *Penicillium sp*; Pineda sugiere que se puede hacer una fertilización sostenible, en zonas estratégicas del páramo colombiano.
- En otro similar, se evaluó el efecto del suelo sobre diferentes poblaciones de HSP y de bacterias fijadoras biológicas de nitrógeno (BFN), donde los autores aislaron y caracterizaron las especies, para luego evaluar su influencia en cultivos de papa; dentro de los resultados obtuvieron que, aunque predominaron especies de los géneros *Circinella*, *Mucor* y *Zygorrhynchus*, la actividad solubilizadora evaluada en medio líquido, registró los porcentajes más altos (>15% fosfatos), específicamente para los hongos *Trichocladium canadense*, *Mucor sp1* y *Penicillium sp2*, (Moratto y otros., 2005).
- Entre otros ejemplos: Pérez (2012) también reportó, hallazgos similares para *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp*, en donde se han demostrado *in vitro su* actividad como solubilizadores de fosfato. También, la identificación de *Paecilomyces sp* y *Syrialidium sp*, ambos con alta actividad solubilizadora de fosfatos en suelos ultisoles y oxisoles de la Amazonía Colombiana.

Lo anterior muestra que los MSP juegan un papel determinante en la biogeoquímica del suelo colombiano. Por ello, la importancia de profundizar más en este tema, tal como se pretende con este trabajo.

1.4.1 El *Aspergillus niger*.

Taxonomía:

Reino: Fungi,
División: Ascomycota,
Clase: Eurotiomycetes,
Orden: Eurotiales,
Familia: Trichocomaceae,
género: Aspergillus.

Características morfológicas:

Micelio macro sifonado, septado, hialino, presenta cabezas aspergiliares de 25 a 100 μ m, con dos series de fiálides, en un ángulo de 360°, con conidios redondos equinulados y negros. El conidióforo (ilustraciones 1-6 y 1-7) es largo, puede llegar a medir hasta 3mm (Visagie y otros, 2014a).

El género *Aspergillus niger* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza debido a que no presenta condiciones abióticas muy selectivas, crecen en un amplio rango de temperatura (6 – 55°C) y a una humedad relativa baja; adicionalmente pueden desarrollarse sobre una amplia variedad de sustratos (Salazar & Rua, 2012). Las características macroscópicas incluyen: colonias densas de color negro o marrón muy oscuro; granulares a flocosas, con un micelio blanco apenas visible. Sus características microscópicas incluyen: cabezas conidiales bi-seriadas y radiales; estípites de paredes gruesas, lisas, hialinas, de coloración amarillenta o marrón pálido en especial cerca de la vesícula (Abarca, 2000).

El *Aspergillus niger* comúnmente presenta formación de estructuras asexuales con formación de esporas; aunque cerca de un tercio de las especies son reconocidas por presentar una etapa sexual. Varios miembros de su género poseen la habilidad de crecer en ambientes con una alta presión osmótica (altas concentraciones de azúcar, sal, entre otros electrolitos); es oligotrófico, esto es, que puede crecer en ambientes con deficiencia en nutrientes, incluso en ambientes que carecen de nutrientes esenciales; es aeróbico y es encontrado casi siempre en ambientes ricos en oxígeno, comúnmente creciendo en forma de molde sobre la superficie del sustrato del cual se alimenta. Comúnmente, el hongo crece con facilidad en sustratos ricos en carbono, como monosacáridos y polisacáridos. Además, el *Aspergillus niger* es considerado un contaminante común en alimentos ricos en almidones y sus variedades prosperan en muchas especies de plantas y de árboles (Visagie y otros, 2014a; Salazar & Rua, 2012; Abarca, 2000).

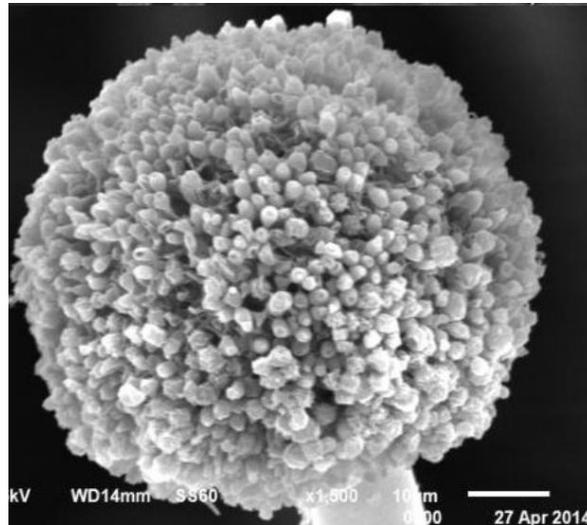


Ilustración 1-6 Fotografía de una vesícula de *Aspergillus niger* (H. El-Fadaly, El-Kadi, & El-Gayar, 2016). (Barra 10µm).

La principal aplicación industrial del *Aspergillus niger* es para la producción de ácido cítrico; de hecho, el 99% de la producción mundial, más de 1.4 millones de toneladas al año (Papagianni, 2007); diferentes variedades del hongo pueden producir, además de ácido cítrico, otros ácidos orgánicos (Rashid y otros, 2004); por ejemplo, ácido glucónico (Chuang y otros, 2007), ácido oxálico (Mai, Lee, & Choi, 2016 ;Alam, 2002), ácido málico (Iyyappan, 2018), ácido succínico (Yank y otros, 2016), entre otros. También se usa en la industria de alimentos para la obtención de enzimas, como glucosa, oxidasa, lisozima, y lactasa; y en la producción de productos farmacéuticos (Ahmed, 2018; Pinakin, Kumar, & Kumar, 2018).

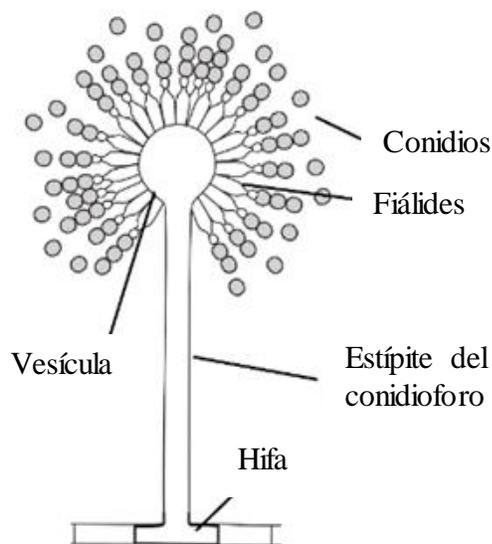


Ilustración 1-7 Morfología del hongo *Aspergillus*. Publicado por M. Piepenbring (2015).

La solubilización de fosfatos de la RF con *Aspergillus niger* ha sido estudiada bajo condiciones *in vitro* (Rashid y otros, 2004; Osorno, 2013), de hecho, diversas cepas del género *Aspergillus* han sido identificadas como MSP, por ejemplo: *Aspergillus aculeatus* (Narsian & Patel, 2010), *Aspergillus awamori* (Jain, Saxena & Sharma, 2010), *Aspergillus fumigatus* (Kaur & Reddy, 2017), *Aspergillus japonicus* (Jiang y otros, 2018), y *Aspergillus niger* (Li y otros, 2016), entre muchos otros. La aplicación de *Aspergillus niger* como MSP ha sido estudiada en RF de diferentes regiones; por ejemplo, en muestras de RF de Marruecos (Bojinova, Velkova, & Ivanova, 2008), en RF de Carolina del Norte (Valenzuela, Barrera, & Pinochet, 2002), también en Colombia (Osorno, 2013; Perez y otros, 2012), entre otros (Narsian y Patel, 2000; Méndez y otros, 2015; Yin y otros, 2015).

1.4.2 El *Penicillium* sp.

Taxonomía:

Reino: Fungi,
División: Ascomycota,
Clase: Eurotiomycetes,
Orden: Eurotiales,
Familia: Trichocomaceae,
Género: Penicillium.

Características morfológicas:

Hifas septadas hialinas (1.5- 5 µm de diámetro), con conidióforos simples o ramificadas, métulas, fiálides y conidios. Las métulas son ramificaciones secundarias que se forman sobre los conidióforos (ilustraciones 1-8 y 1-9), y acarrear fiálides en forma de frasco (Visagie y otros, 2014a). El género *Penicillium sp* es comúnmente encontrado en la rizosfera de cultivos agrícolas (Mahadevamurthy, 2016); también son ampliamente reconocidas por solubilizar fosfatos minerales en varios tipos de suelo (Beltrán, 2014). Estos son hongos filamentosos y están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se hallan en el suelo, la vegetación caída, y en el aire viajando en forma de esporas.

El género *Penicillium* actualmente contiene 354 especies aceptadas (Visagie y otros., 2014a), es bien conocido por ser el hongo más común en un amplio y diverso número de hábitats alrededor del mundo. Algunos de ellos producen la penicilina, antibiótico usado para matar o detener el crecimiento de algunos tipos de bacteria, otras especies son usadas para fabricar quesos madurados. Al igual que el *Aspergillus*, múltiples variedades de *Penicillium sp* han sido identificadas como MSP (Henri y otros, 2014); por ejemplo: *Penicillium sp* (Wakelin, 2014; Handayani & Suratman, 2015), *Penicillium oxalicum* (Li y otros, 2016; Tian y otros, 2018;), y *Penicillium bilaii* (Bhatt, Debnath, & Pareek, 2016); Asimismo se ha identificado que estos hongos producen ácidos orgánicos como el ácido cítrico y el ácido oxálico (Cunningham, Kuiack, 1992). (ilustraciones 1-8 y 1-9).

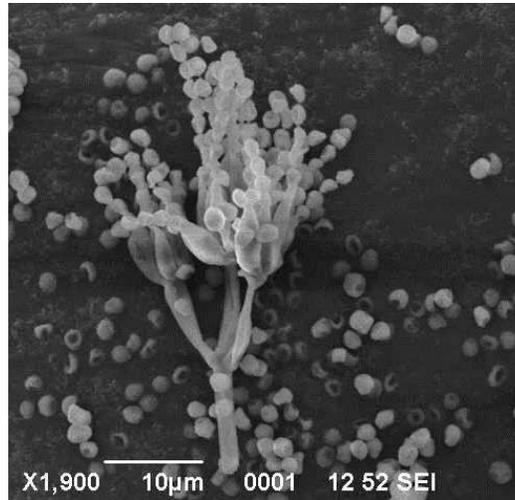


Ilustración 1-8 Fotografía con microscopio de barrido electrónico del hongo *Penicillium* (Barsainya, Chandra, & Singh, 2016).

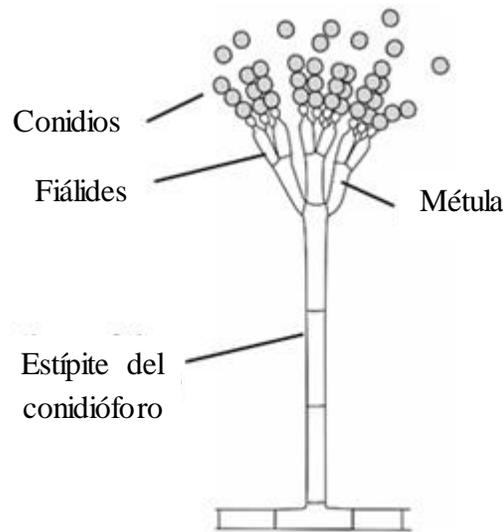


Ilustración 1-9 Morfología del hongo *Penicillium*. M. Piepenbring, 2015.

1.5 La pulpa de café.

La pulpa de Café (ilustración 1-10), En adelante PC, es la cáscara del grano del café formada por el exocarpio (epidermis) y parte del mesocarpio (López, 2017), esta capa tiene un espesor aproximado de 5mm (Puerta & Rios, 2014). En el beneficio del café la PC es uno de los subproductos y se deposita en fosas para su descomposición y posterior utilización en el cultivo, cuando está deshidratada contiene cerca de 10% de proteína cruda, 21% de fibra cruda, 8% de cenizas y 4% de extracto libre de nitrógeno; también se observa que la relación fósforo es de alrededor de 4 a 1 (López, 2017).

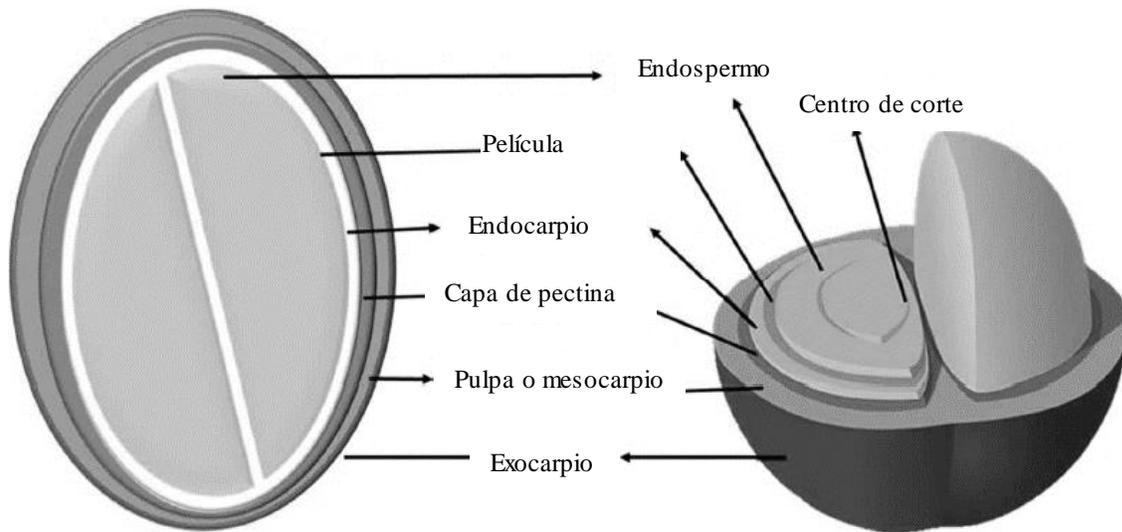


Ilustración 1-10 Composición del Fruto del café. Adaptado de López (López, 2017).

La PC ha sido identificada por tener un elevado potencial de contaminación si no se trata o dispone adecuadamente (Pierre, Rosell, Quiroz, & Granda, 2009); por ejemplo: estudios han reportado que en el procesamiento de 100 kg de frutos de café maduros, se produce un 20% de café trillado, y el 80% restante está formado por subproductos de pulpa fresca (López, 2017), otro estudio reporta que para la producción de 25kg de café pergamino seco se produce una contaminación equivalente a la generada por las excretas y orina de 100 personas en un día (Blandon, Davila, & Rodriguez, 1999); específicamente en Colombia, teniendo en cuenta que la producción de PC es de $0.225 \frac{kg}{m^2 \cdot año}$ por cada millón de sacos de 60kg de café en almendra que Colombia exporta, se están generando $1.629 \times 10^9 kg$ de pulpa fresca, que producirían una contaminación equivalente a la generada durante un año en excretas y orina por una población de 868,736 habitantes (Rodríguez & Zambrano, 2010).

Debido a que la PC es una fuente rica en azúcares, su utilización como medio de crecimiento para microorganismos es de mucho interés (Serrat y otros, 2018). De acuerdo con Blandón y Dávila (1999), la PC es un medio apto para el desarrollo de microorganismos como hongos y bacterias, por a su alto contenido de humedad, carbohidratos y nutrientes; de hecho, estos autores consiguieron aislar en la PC microorganismos como: *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochaceus*, *actinomycetos*; *Penicillium sp*, *Cladosporium sp* y *levaduras* (Blandon & Davila, 1999). Además, se ha comprobado que en el proceso de descomposición natural de la PC se generan lixiviados de ácidos orgánicos, entre otras sustancias, producto de la actividad microbiológica (Escobar y otros, 2012; Arias, 1995); este proceso depende del tiempo de descomposición y de las condiciones fisicoquímicas del mismo (Blandón, Rodríguez & Dávila, 1998); también se ha encontrado que algunos microorganismos son endófitos de la PC, lo que permite comprender su rápido proceso de descomposición (Peterson y otros, 2005).

1.6 Referencias

- Ahmed, M. E. (2018). Extraction and purification of protease from *Aspergillus niger* isolation. *Pharm Pharmacol Int J*, 6(2), 96-99.
- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 19, s79-s84.
- Alexander Perez, C.; V. Jaime De La Ossa; Donicer Montes, V. (2012). Hongos Solubilizadores De Fosfatos En Fincas Ganaderas Del Departamento De Sucre. Solubility Fungi Of Phosphate In Livestock Farms Of The Department Of Sucre. *Rev. Colombiana Cienc. Anim*, 4(1), 35-45.
- Arias Hernández, J. J. (1995). Caracterización de la pulpa de café en diferentes tiempos de descomposición y su efecto en almácigos de café.
- Barsainya, M., Chandra, P., & Singh, D. P. (2016). Investigation of Cr (VI) Uptake in Saline Condition Using Psychrophilic and Mesophilic *Penicillium sp .*, 5(1).
- Beltrán Pineda, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu*, 15(1), 101-113.
- Bhatt, S. C., Debnath, S., & Pareek, N. (2016). Assessment of *Penicillium bilaii* inoculation in wheat (*Triticum aestivum* L.) for improving growth, yield and phosphorus availability in Mollisols of India. *Journal of Applied and Natural Science*, 8(1), 358-367.
- Blandon Castaño, G., Davila Arias, M. T., & Rodriguez Valencia, N. (1999). Caracterización microbiológica y físicoquímica de la pulpa de café sola y con mucílago. *Cenicafé*, 50(1), 5-23.
- Blandón, G., Rodríguez, N., & Davila, M. T. (1998). Caracterización microbiológica y físico química de los subproductos del beneficio del café en proceso de compostaje.
- Bojinova, D., Velkova, R., & Ivanova, R. (2008). Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. *Bioresource technology*, 99(15), 7348-7353.
- Bünemann, E. K., Prusisz, B., & Ehlers, K. (2011). Characterization of phosphorus forms in soil microorganisms. In *Phosphorus in Action* (pp. 37-57). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Camacho, J. 2002. "Mapa De Recursos Minerales De Colombia ". Minerales Industriales. Ingeominas.

- Campbell, C. G., Garrido, F., Illera, V., & García-González, M. T. (2006). Transport of Cd, Cu and Pb in an acid soil amended with phosphogypsum, sugar foam and phosphoric rock. *Applied Geochemistry*, 21(6), 1030–1043.
- Canteras, V., Mateus, E., Muñoz, F., Montoya, C., Herrera, J., & Loy, J. (2008). Selección de la mejor alternativa para la industrialización de la roca fosfórica del Departamento del Huila.
- Cao, X., Wahbi, A., Ma, L., Li, B., & Yang, Y. (2009). Immobilization of Zn, Cu, and Pb in contaminated soils using phosphate rock and phosphoric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2–3), 555–564.
- Chien, S. H., & Hammond, L. L. (1978). A Comparison of Various Laboratory Methods for Predicting the Agronomic Potential of Phosphate Rocks for Direct Application 1. *Soil Science Society of America Journal*, 42(6), 935-939.
- Chuang, C. C., Kuo, Y. L., Chao, C. C., & Chao, W. L. (2007). Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils*, 43(5), 575-584.
- Cunningham, J. E., & Kuiack, C. (1992). Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1451-1458.
- Deubel, A., & Merbach, W. (2005). Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions* (pp. 177-191). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Dibb, D. D. W. (2004). ¿Nos quedaremos sin fósforo? *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*, 22, 4. <https://bit.ly/2Px3Sbb>
- El-Fadaly, H., El-Kadi, S., & El-Gayar, E. (2016). Microbiological examination for some chocolate cake samples. *Journal of Environmental Sciences*, 45(1), 11–27.
- Escobar Escobar, N., Mora Delgado, J., & Romero Jola, N. J. (2012). Identificación De Poblaciones Microbianas En Compost De Residuos Orgánicos De Fincas Cafeteras De Cundinamarca. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 16(1), 75–88.
- FAO. (2007). Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. *Boletín FAO Fertilizantes y Nutrición Vegetal* (Vol. 13).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004). Use of phosphate rocks for sustainable agriculture. *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin*.
- Frossard, E., Condron, L. M., Oberson, A., Sinaj, S., & Fardeau, J. C. (2000). Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of Environment Quality*, 29(1), 15–23.

- Gilbert, N. (2009). Environment: the disappearing nutrient. *Nature News*, 461(7265), 716-718.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J., & Poole, P. S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and soil*, 245(1), 83-93.
- Hammond, L. L., & Day, D. P. (1992). Phosphate rock standardization and product quality. Malaysian Society of Soil Science.
- Handayani, S., & Suratman, S. (2015). Biosolubilization of phosphate rock by *Penicillium sp.* Indonesian Mining Journal, 18(1), 29-38.
- Harris, D. C., Navarro, V. B., & Murcia, Á. B. (2007). *Análisis químico cuantitativo*.
- Henri, F., Laurette, N., Ghislain, N., Vanessa, T., Virginie, T., & Dieudonné, N. (2014). Rock phosphate solubilisation by strains of *Penicillium spp.* isolated from farm and forest soils of three agro ecological zones of Cameroon. *American Journal of Agriculture and Forestry*, 2, 25-32.
- Ivanova, R. P., Bojinova, D. Y., Gruncharov, I. N., & Damgaliev, D. L. (2006). The solubilization of rock phosphate by organic acids. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 181(11), 2541-2554.
- Iyyappan, J., Bharathiraja, B., Baskar, G., Jayamuthunagai, J., & Barathkumar, S. (2018). Malic acid production by chemically induced *Aspergillus niger* MTCC 281 mutant from crude glycerol. *Bioresource technology*, 251, 264-267.
- Jain, R., Saxena, J., & Sharma, V. (2010). The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system. *Applied Soil Ecology*, 46(1), 90-94.
- Jianbo, S., Lixing, Y., Junling, Zhang, Haigang, L., Zhaohai, B., Xiping, Chen, Weifeng, Z., & Fusuo, Z. (2011). Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology*, 156(3), 997-1005.
- Kaur, G., & Reddy, M. S. (2017). Improvement of crop yield by phosphate-solubilizing *Aspergillus* species in organic farming. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(1), 24-34.
- Kizewski, F., Liu, Y.-T., Morris, A., & Hesterberg, D. (2011). Spectroscopic Approaches for Phosphorus Speciation in Soils and Other Environmental Systems. *Journal of Environmental Quality*, 40(3), 751.
- Lesage, E., Meers, E., Vervaeke, P., Lamsal, S., Hopgood, M., Tack, F., & Verloo, M. (2005). Enhanced phytoextraction: ii. effect of edta and citric acid on heavy metals. *International Journal of Phytoremediation*, 7, 143-152.

- Leytem, A. B., Smith, D. R., Applegate, T. J., & Thacker, P. A. (2006). The influence of manure phytic acid on phosphorus solubility in Calcareous Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 70(5), 1629–1638.
- Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., ... & Hu, S. (2016). A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific reports*, 6, 25313.
- López Núñez, J. C. (2017). Producción De Bio-Alcoholes, A Partir De Mucílago Obtenido Con Tres Tecnologías Utilizadas En El Beneficio Ecológico Del Café. Universidad De Manizales.
- M. E. Beltrán Pineda. (2014). Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa (*Solanum tuberosum*). *Ciencia En Desarrollo*, 5(2), 145–154.
- Mahadevamurthy, M., Channappa, T. M., Sidappa, M., Raghupathi, M. S., & Nagaraj, A. K. (2016). Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere soil and its effect on seed growth parameters of different crop plants. *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol*, 4(06), 022-026.
- Mai, H. T. N., Lee, K. M., & Choi, S. S. (2016). Enhanced oxalic acid production from corn cob by a methanol-resistant strain of *Aspergillus niger* using semi solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 51(1), 9-15.
- Mendes, G. D. O., da Silva, N. M. R. M., Anastácio, T. C., Vassilev, N. B., Ribeiro Jr, J. I., da Silva, I. R., & Costa, M. D. (2015). Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. *Microbial biotechnology*, 8(6), 930-939.
- Moratto, Claudia; Martínez, Luis Joel; Valencia, Hernando; Sánchez, J. (2005). Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía Colombiana*, 23(2), 299–309.
- Morillo, Venezuela; Sequera, Omaira; Ramírez, R. (2007). Roca fosfórica acidulada como fuente de fósforo en un suelo ácido con o sin encalado. *Bioagro*, 19(3), 161–168.
- Narsian, V., & Patel, H. H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(4), 559-565.
- Nielson, H., & Sarudiansky, R. (2005). *Minerales para la Agricultura en Latinoamérica*. CEPS, Centro de Estudios para la Sustentabilidad.
- Osorno Bedoya, L. (2013). *Bio-Acidulación De Roca Fosfórica Bajo Condiciones In Vitro*. Universidad Nacional de Colombia.
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology advances*, 25(3), 244-263.

- Perez, C. A., De la Ossa, J., & Montes, V. D. (2012). Hongos Solubilizadores de Fosfatos en Fincas Ganaderas del Departamento de Sucre. *Revista Colombiana Ciencia de Ciencia Animal*, 4(1), 35–45.
- Peterson, S. W., Vega, F. E., Posada, F., & Nagai, C. (2005). *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. *Mycologia*, 97(3), 659-666.
- Pierre, F., Rosell, M., Quiroz, A., & Granda, Y. (2009). Evaluación química y biológica de compost de pulpa del café en caspito municipio andrés Eloy blanco , estado Lara, Venezuela. *Bioagro*, 21(2), 105–110.
- Pineda, M. B. (2015). Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa [*Solanum tuberosum*]. *Ciencia En Desarrollo*, 5(2), 145–154.
- Posso, E. J. S., & De Prager, M. S. (2017). Production of organic acids by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. *Acta Agronomica*, 66(2).
- Puerta, G., & Ríos, S. (2014). Composición Química del mucílago de café según el tiempo de fermentación y refrigeración. El-Fadaly, H., El-Kadi, S., & El-Gayar, E. (2016). Microbiological examination for some chocolate cake samples. *Journal of Environmental Sciences*, 45(1), 11–27.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., & Latif, F. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak J Biol Sci*, 7(2), 187-196.
- Rodríguez Valencia, N., & Zambrano Franco, D. (2010). Los subproductos del café: fuente de energía renovable. *Avances Técnicos Cenicafé*, (3), 8.
- Salazar, C. L., & Rua, Á. L. (2012). Características morfológicas microscópicas de especies de *Aspergillus* asociadas a infecciones en humanos *Aspergillus species related with infections in humans*, 3(2), 93–96.
- Sanyal, S. K., & De Datta, S. K. (1991). Chemistry of phosphorus transformations in soil. In *Advances in soil science* (pp. 1-120). Springer, New York, NY.
- Scervino, J. M., Mesa, M. P., Della Mónica, I., Recchi, M., Moreno, N. S., & Godeas, A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and fertility of soils*, 46(7), 755-763.
- Serrat-Díaz, M., la Fé-Isaac, D., Daniel, Á., la Fé-Isaac, D., Alberto, J., & Montero-Cabrales, C. (2018). Extracción y caracterización de pectina de pulpa de café de la variedad Robusta. *Revista Cubana de Química*, 30(3), 522-538.

- Stutter, M. I., Shand, C. A., George, T. S., Blackwell, M. S. A., Bol, R., MacKay, R. L., ... Haygarth, P. M. (2012). Recovering phosphorus from soil: A root solution? *Environmental Science and Technology*.
- Tian, D., Wang, W., Su, M., Zheng, J., Wu, Y., Wang, S., ... & Hu, S. (2018). Remediation of lead-contaminated water by geological fluorapatite and fungus *Penicillium oxalicum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9.
- Turner, B. L., Mahieu, N., & Condon, L. M. (2003). Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments of Phosphorus Compounds in Soil NaOH-EDTA Extracts. *Soil Science Society of America Journal*, 67(2), 497-510.
- Trujillo, A. T., Gómez, V. H. P., Cárdenas, E. M., Dussan, A. M., & Herrera, C. H. B. (2017). Oportunidades para el departamento del Huila en el mercado de fertilizantes. *Revista RETO: Revista Especializada en Tecnologías Transversales de la Organización*, 3(3), 93-104.
- UPME, 2005. "Análisis de la Estructura Productiva y Mercados de la roca fosfórica". Informe Final, Contrato 1571-08-2005.
- Valenzuela, E., Barrera, S., & Pinochet, D. (2002). Solubilización de roca fosfórica Carolina del Norte con cepas de *Aspergillus niger* aisladas desde un suelo trumao. *Boletín Micológico*, 17.
- Villegas, J., & Fortin, J. A. (2001). Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NH₄⁺ as nitrogen source. *Canadian Journal of Botany*, 79(8), 865-870.
- Vio, F. J. N. (2014). Evaluación del crecimiento del hongo solubilizador de fósforo *Bjerkandera adusta* (Willd.: Fr.) P. Karst. en diferentes sustratos sólidos. Universidad Austral de Chile.
- Visagie, C. M., Houbraeken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... Samson, R. A. (2014a). Identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78(1), 343-371.
- Visagie, C. M., Houbraeken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... Samson, R. A. (2014b). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(1), 343-371.
- Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R., & Ryder, M. H. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium spp.* closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, 40(1), 36-43.
- Yang, L., Lübeck, M., Ahring, B. K., & Lübeck, P. S. (2016). Enhanced succinic acid production in *Aspergillus saccharolyticus* by heterologous expression of fumarate reductase from *Trypanosoma brucei*. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(4), 1799-1809.

- Yin, Z., Shi, F., Jiang, H., Roberts, D. P., Chen, S., & Fan, B. (2015). Phosphate solubilization and promotion of maize growth by *Penicillium oxalicum* P4 and *Aspergillus niger* P85 in a calcareous soil. *Canadian journal of microbiology*, 61(12), 913-923.
- Yingben, W., Yuelin, H., Hongmei, Y., Wei, C., Zhen, W., Lijuan, X., & Aiqun, Z. (2012). Solubilization of Rock Phosphates. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(23), 1144-1151.
- Zanguña, S. Q., Gómez, L. L., & Triana, Y. P. (2017, December). Characterization and obtainment of phosphate rock concentrates of Turmequé, Boyacá. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 935, No. 1, p. 012008). IOP Publishing.
- Zapata, F., & Roy, R. N. (Eds.). (2007). *Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible*. Roma, Italia: FAO.

Capítulo 2. Evaluación de la solubilidad de los fosfatos de la roca fosfórica del Huila vía formación de complejos con EDTA disódico.

Resumen

En este capítulo se evaluó la solubilidad del fosfato de muestras de roca fosfórica homogenizadas obtenidas de la mina Media Luna ubicada en Aipe (Huila). Los tratamientos se prepararon con soluciones de EDTA disódico di hidrato en concentraciones 0.0025, 0.010, 0.015, 0.035, 0.050, y 0.100 M. Se determinó la solubilidad de la RF con tratamientos de H_2SO_4 al 40%vol como parámetro de referencia. Además, se hizo análisis FT-IR, DRX y SEM-EDS para caracterizar las muestras. Se obtuvo los mejores resultados para las concentraciones 0.015 y 0.035M de EDTA y se encontró que a concentraciones por debajo de 0.01M y por encima de 0.05M el tratamiento no es efectivo.

Se hizo un análisis del sistema reaccionante y el mecanismo de formación de complejos en el proceso de la solubilización de los fosfatos. Para ello se hizo seguimiento de la reacción durante 24h, con diferentes concentraciones de EDTA. Se determinó que la reacción ocurre en dos etapas una rápida y otra lenta. Además, como un acercamiento conceptual, se modelaron las moléculas de los complejos de EDTA-Ca, y la estructura cristalina de la apatita con los programas *ChemSketch 10.0* y *Vesta 3.4.6*, con esto se propuso un mecanismo de reacción para la disolución de un cristal de fluorapatita usando EDTA como ligando.

Palabras clave: roca fosfórica, espectroscopía FT-IR, cristalografía de Rayos-X DRX, microscopía SEM-EDS.

Evaluation of phosphate solubilization from Huila Phosphoric Rock via complex formation with disodium EDTA

Abstract

In this chapter the solubility of phosphate of homogeneous samples of phosphoric rock obtained from Media Luna mine located in Aipe (Huila) was evaluated. Treatments were prepared with dissolutions of *EDTA disodium dihydrate* at concentrations 0.0025, 0.010, 0.015, 0.035, 0.050, 0.100M. Soluble phosphate was determined with treatments of H_2SO_4 at 40%vol as a reference parameter. Also, FT-IR, DRX X-ray crystallography and SEM-EDS were done to characterize the samples. The best results were obtained at 0.015 and 0.035M EDTA and found that treatments under 0.01M and above 0.05M were not effective.

An analysis of the reaction system and the mechanism of complex formation in the solubilization of phosphoric rock process was made. For these, chemical reaction was monitoring for 24h over different EDTA concentration. Quick, and long reaction stages was identified. Also, from a conceptual approach, complex molecules of EDTA-Ca, and crystal structure of apatite was modelled using ChemSketch 10.0 and Vesta 3.4.6 software, with which a reaction mechanism for fluorapatite crystal dissolution using EDTA ligand was proposed.

Keywords: soil remediation, FT-IR spectroscopy, DRX X-ray crystallography, microscopic SEM-EDS analysis.

2.1 Introducción.

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ha sido usado como agente quelante (o ligando) de referencia para investigaciones sobre mecanismos de reacción química que involucra la formación de complejos. Por sus propiedades, este compuesto ha sido propuesto para diversas aplicaciones en agricultura (Li y otros, 2015), por ejemplo: en la remediación y enmienda de suelos agrícolas para remover cobre (Tsang, Zhang & Lo, 2007), en ese trabajo, se reportaron remociones de Cu de más del 85% aplicando lavados con EDTA 10^{-2} y $10^{-3}M$ en suelos contaminados; otro estudio reportó que es efectivo en lavado de metales pesados de suelos contaminados con Zn, Cd, Cu, Pb, con EDTA 0.01M (Sun y otros, 2001); su efectividad como ligando ha sido estudiada y se ha determinado que el pH juega un rol determinante (Norvell & Lindsay, 1969, Harris, 2007); otros trabajos en la remediación de suelos contaminados con metales pesados usando EDTA han sido reportados (Lesage y otros., 2006; Schaidler, Parker & Sedlack, 2006).

La relativa complejidad de la composición de un mineral puede afectar notablemente el proceso de disolución, por ejemplo, Nowack & Sigg estudiaron la disolución de óxidos de Fe por formación de complejos de Fe-EDTA, y reportan, en orden descendente la especificidad al formarse los complejos $CaEDTA \gg PbEDTA > ZnEDTA > CuEDTA > Co(II)EDTA > NiEDTA$ (Ngwack & Sigg, 1997). De acuerdo con esto, la presencia de diferentes iones metálicos afecta directamente la eficacia de disolución de un metal específico, siendo para él Ca^{2+} el mejor de los casos; y en dónde la cinética de disolución es el factor determinante (Norvell y Lindsay, 1969). Por esta razón, resulta interesante evaluar su efectividad al disolver los fosfatos de la RF, teniendo en cuenta que el catión Ca^{2+} es el objetivo para atacar con el EDTA.

Por otra parte, la acidulación con ácido sulfúrico no funciona por mecanismo de formación de complejos, sino por el poder ácido aportando hidronios (H_3O^{1+}) a alta temperatura, los cuales pueden disolver casi completamente el fosfato presente en la roca fosfórica; este proceso es denominado digestión. Este ácido es usado a nivel industrial para acidular RF parcialmente para mejorar su eficiencia agronómica (Trujillo, 2015); sin embargo, su aplicación tiene impactos ambientales negativos, además la RF parcialmente acidulada con este ácido no califica como fertilizante orgánico.

Por lo anterior, en este trabajo se evaluó la capacidad del EDTA para disolver los fosfatos de la RF, como una alternativa al proceso de disolución parcial con ácido sulfúrico; de importancia en agricultura (Stutter y otros, 2012; Morillo & SEquera, 2007; Wang, Kelly, & Tovar, 2004). Aquí, la solubilidad alcanzada al aplicar disoluciones de EDTA disódico (En adelante EDTA-Na) a diferentes concentraciones sobre RF se comparó con la alcanzada con los resultados aplicando tratamientos con H_2SO_4 al 40%. Se usó muestras de RF de la mina Media Luna ubicada en Aipe-Huila con *EDTA disódico dihidrato*, el parámetro de análisis usado IS fue una modificación del índice de solubilidad ISA (Índice de Solubilidad Absoluta), teniendo como referencia el tratamiento con ácido sulfúrico al 40%, para el cual fue asignado un valor de IS del 100%. Adicionalmente, se propuso

caracterizar previamente las muestras de RF utilizadas en este estudio, con el fin de lograr un análisis más robusto de los resultados; debido a que ninguna técnica puede por si sola caracterizar comprensivamente una muestra de RF (Kizewski y otros., 2011), se propuso hacer los estudios de espectro infrarrojo FT-IR, cristalográfico de rayos X (DRX) y de microscopía de barrido electrónico con análisis elemental de espectro dispersión de energía de rayos X (SEM-EDS) para obtener la caracterización correspondiente.

2.2 Materiales y Métodos.

2.2.1 Obtención de muestras de roca fosfórica.

Se tomaron tres muestras de roca fosfórica (RF) que se extrajeron de la mina Media Luna de municipio de Aipe Huila, en las coordenadas N:863.180, E:860.431, a 20 km de la cabecera municipal; la primera, de con Nombre R-1, corresponde a la capa de nivel 6 en presentación molida; R-2 corresponde a la capa de nivel 7 en presentación molida; y R-3 corresponde también a la capa de nivel 7 pero en presentación de rajón. Las muestras fueron secadas, molidas y homogenizadas en una sola mezcla a partir de la cual se tomaron las muestras finales para los análisis realizados en este trabajo.

2.2.2 Análisis previo de las muestras de RF.

Con el objetivo de analizar el comportamiento fisicoquímico de la RF frente a la disolución en los tratamientos realizados, se hizo una serie de pruebas complementarias para caracterizar las muestras de RF de acuerdo con Turner, Mahieu, & Condrón (2003); se incluyeron los análisis de espectro infrarrojo FT-IR para la identificación de grupos funcionales como PO_4^{3-} , OH^{1-} , CO_3^{2-} , entre otros; el análisis de difracción de rayos X (DRX), para la caracterización morfológica y determinación de la composición cristalina de las muestras; y SEM-EDS para la observación en escala nanométrica de las características físicas de las partículas que la componen y el análisis elemental de la composición de las muestras.

2.2.2.1 Obtención del espectro de absorción infrarrojo FT-IR – identificación del grupo funcional fosfato.

Se utilizó FT-IR para la identificación de los especímenes fosfato (PO_4^{3-}) y calcio (Ca^{2+}), que son los elementos fundamentales de la apatita, además de iones característicos de la RF como Si^{4+} , F^{1-} , OH^{1-} , CO_3^{2-} , Al^{3-} , entre otros. Estos análisis se hicieron en el laboratorio de CESURCAFE de la Universidad Surcolombiana, con la ayuda del profesor Nelson

Gutiérrez, Doctor en tecnología de alimentos. El procedimiento se hizo de la siguiente manera: Se analizó muestras de 100g la RF preparada en el equipo CARY 630 FT-IR marca *Agilent Technologies*, los datos obtenidos se procesaron en la computadora usando como interfaz el software *Microlab FT-IR*. Se hizo lecturas por triplicado de las muestras en un rango de $650 - 4000\text{cm}^{-1}$. Una vez obtenidos los espectros, se realizó la identificación de bandas de emisividad por comparación con espectros patrón en bases de datos.

2.2.2.2 Caracterización cristalográfica por difracción de rayos X – DRX.

Los análisis DRX fueron realizados en el laboratorio de rayos X de la UIS (Universidad Industrial de Santander) con la colaboración del profesional analista John D. Bonilla Jaimes.

Los especímenes de RF seleccionados de las muestras fueron molturados y homogenizados en un mortero de ágata y llevados a un tamaño de partícula menor a $38\ \mu\text{m}$ (malla 400). Posteriormente, los especímenes seleccionados fueron montados en un portamuestra de polimetilmetacrilato (PMMA) mediante la técnica de llenado frontal. La medición se realizó en un difractor de polvo marca *BRUKER* modelo D8 ADVANCE con Geometría DaVinci bajo las siguientes condiciones: voltaje 40kV , corriente 40mA , rendija de divergencia 0.6mm , rendijas Soller primario y secundario 2.5° , muestreo $0.02035^\circ 2\text{Theta}$, rango de medición $3.5^\circ - 70.0^\circ 2\text{Theta}$, radiación $\text{CuK}\alpha 1$, filtro Ni, uso de anti-dispersor, detecto Lineal LynnxEye, barrido a pasos, y tiempo de muestreo 0.6s .

Los análisis cualitativos de las fases presentes en los especímenes seleccionados de las muestras se realizaron mediante la comparación de los perfiles observados con los perfiles de difracción reportados en la base de datos PDF-2 (2014) del International Centre for Diffraction Data (ICDD). Los análisis cuantitativos de las fases encontradas se realizaron mediante el refinamiento por el Método de Rietveld entre los perfiles observados y los perfiles de difracción reportados en la base de datos. Los porcentajes reportados corresponden a la relación entre las fases policristalinas refinadas sin considerar el porcentaje de material amorfo. El porcentaje de las fases adicionales que no pudieron ser identificadas o refinadas se encuentran dentro del material amorfo no determinado.

2.2.2.3 Caracterización morfológica, por microscopía electrónica de barrido y análisis elemental por espectroscopia de dispersión de energía de rayos X. SEM-EDS.

Los análisis SEM-EDS fueron realizados en el laboratorio de rayos X de la UIS (Universidad Industrial de Santander) con la colaboración del profesional analista John D. Bonilla Jaimes.

Se analizaron muestras de RF en un microscopio de escaneo electrónico, SEM (Scanning Electron Microscope), marca Thermo Scientific modelo Quanta FEG 650 acoplado con un detector de espectrometría de dispersión de energía de rayos-X EDS (Energy Dispersión X-rays), marca AMETEK modelo TEAM-Pegasus, los datos obtenidos con el detector EDS fueron analizados con el software Genesis EDS versión 5.2. Los parámetros de medición fueron: Potencia del haz de electrones incidente (HV 30000kV), detector de electrodispersión (BSED - Backscattered Electron Detector), distancia de observación (WD 9.7mm); se tomaron las imágenes SEM-1, SEM-2, SEM-3 y SEM-4 con magnificación 100x, 400x, 400x, y 200x respectivamente.

2.2.3 Evaluación de los tratamientos con EDTA disódico.

Se prepararon disoluciones por triplicado de *EDTA disódico dihidrato* las cuales se describen en el cuadro 2-1, usando agua destilada como solvente. Luego, sobre 10g de roca fosfórica, se agregó 250cm³ de cada disolución. Previo al tratamiento se tamizó la RF y se seleccionaron las fracciones correspondientes a diámetros de partícula entre 125–500µm. Cada tratamiento se hizo por triplicado y se determinó el fósforo disuelto por colorimetría.

Cuadro 2-1 Descripción de los tratamientos con EDTA disódico.

Tratamiento	Descripción	Replicas	EDTA-Na (M)
B	Solución B + RF	3	0,0000
S1	Solución S1 + RF	3	0,0026
S2	Solución S2 + RF	3	0,0100
S3	Solución S3 + RF	3	0,0147
S4	Solución S4 + RF	3	0,0353
S5	Solución S5 + RF	3	0,0500
S6	Solución S6 + RF	3	0,1000
H40	Solución de H ₂ SO ₄ al 40% vol	3	---

Como variable de análisis se formuló un índice de solubilidad (IS) de los fosfatos de la RF basado en el ISA (Índice de solubilidad absoluta) propuesto por Lehr y McClellan (1972), y recomendado por la FAO (Zapata y Roy, 2007). A continuación, se presenta la ecuación del parámetro:

Ecuación 2.1 Índice de solubilidad IS.

$$IS = \frac{P_S}{P_{S40}} \times 100$$

donde:

P_{S40} es el porcentaje de fosfatos solubilizados con ácido sulfúrico al 40% a 30°C

P_S es el porcentaje de fosfatos solubilizados con el tratamiento aplicado a 30°C.

Se dejaron reaccionar las muestras de RF con las disoluciones de EDTA-Na durante una semana a una temperatura media de 30°C, con agitación manual diaria; posteriormente se determinó la concentración de fosfato de la fase acuosa por el método de colorimetría de vanadato-molibdato, el cual se expone en la sección 2.2.3.2.

2.2.3.1 Tratamiento de acidulación/disolución con ácido sulfúrico al 40%.

El parámetro P_{S40} se definió como referencia para la comparación de los tratamientos, aplicados sobre en las muestras de RF, esta cantidad difiere del fósforo total, y depende de factores como el tamaño de partícula, la porosidad, el pH y la temperatura; por tanto, los resultados obtenidos son característicos de las condiciones específicas experimentales dadas. Para determinar P_{S40} se trató por triplicado 10g de roca fosfórica con 250mL de disoluciones de H_2SO_4 al 40% (porcentaje volumen-volumen); luego, se agito la mezcla manualmente, se dejó en reposo a una temperatura promedio de 30°C durante 24h. Para determinar los fosfatos disueltos, se tomaron muestras de la fase acuosa y siguió el procedimiento de colorimetría de la sección 2.2.3.2.

2.2.3.2 Pruebas colorimétricas para la determinación de fosfato.

Para medir la concentración de fosfato soluble obtenido con los tratamientos aplicados, se aplicó el método colorimétrico estándar ASTM – 4500P. Para ello, se elaboró un patrón colorimétrico, en el cual, la intensidad del color amarillo del ácido vanadomolibdofosfórico formado de la reacción del reactivo de vanadato-molibdato (RVM) con el fosfato disuelto, tiene una relación directamente proporcional con la concentración de fosfato presente en la disolución. La disolución patrón de fosfato se preparó con *fosfato monopotásico* KH_2PO_4 ; en el cuadro 2-2 se muestran las cantidades para la elaboración del patrón colorimétrico. La colorimetría se puede hacer por comparación directa, sin embargo, para obtener resultados más confiables y precisos, se midió la absorbancia de las disoluciones del patrón colorimétrico en el espectrofotómetro, donde la intensidad del color amarillo tiene una relación proporcional a la absorbancia tomada a 400nm de longitud de onda de luz. Con esto, se elaboró una curva lineal de calibración que correlaciona la absorbancia y la concentración de fosfato en disolución, a partir de la cual se puede obtener la concentración de fosfato disuelto en una solución desconocida, mediante la medición de la absorbancia.

Durante el trabajo experimental, se elaboraron varias curvas de calibración adicionales para verificar la confiabilidad de las lecturas, las cuales fueron consistentes. A continuación, se presenta la curva patrón utilizada, la cual presenta un comportamiento lineal con un

coeficiente de correlación $R^2 = 0.9998$, la cual es válida para determinar concentraciones desde 0 a 40ppm de fosfato (ilustración 2-1).

Ecuación 2.2 Correlación Absorbancia vs concentración de fosfato.

$$\text{Absorbancia} = 0.1242[P]$$

Donde P es la concentración en partes por millón de fosfato.

Cuadro 2-2 Preparación del patrón para el método colorimétrico.

Descripción del parámetro	Tratamiento							
	BLANCO	ST1	ST2	ST4	ST5	ST10	ST20	ST40
SE-50 ppm [cm^3]*	0	1	2	4	5	10	20	40
RVM [cm^3]	10	10	10	10	10	10	10	10
Volumen de aforo [cm^3]	50	50	50	50	50	50	50	50
KH_2PO_4 [$\frac{mg}{dm^3}$]	0	1	2	4	5	10	20	40
Concentración de P [$\frac{mg}{dm^3}$]**	0	0.228	0.455	0.910	1.138	2.276	4.552	9.104

*SE-50 ppm: solución estándar preparada con 50mg de KH_2PO_4 en $1dm^3$ de solución

** Concentración equivalente de fósforo elemental

Para determinar la concentración de las muestras experimentales se mezcló muestras de cada tratamiento con reactivo de Vanadato-Molibdato en relación de volúmenes de 4:1, respectivamente. Se midió la absorbancia a 400nm de frecuencia, en un espectrofotómetro SPECTROQUANT modelo PHARO 300; luego los resultados se correlacionaron con la curva patrón (Ilustración 2-1).

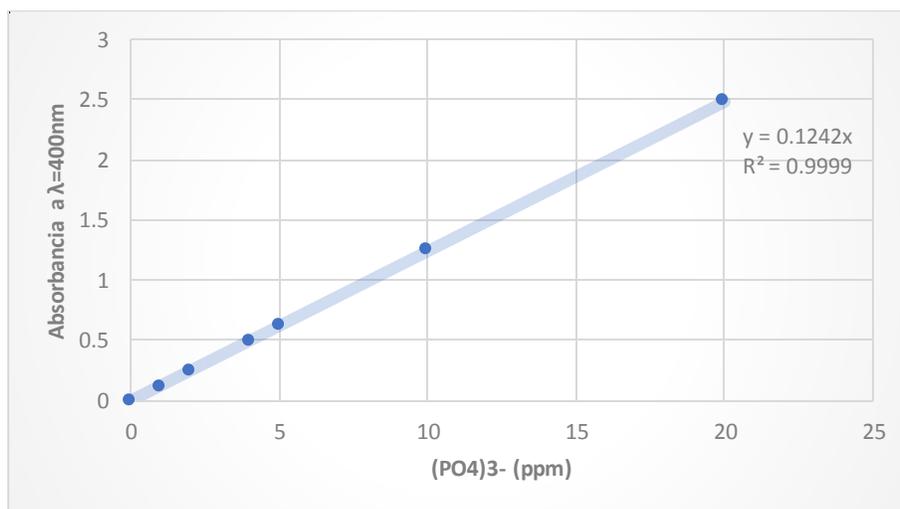


Ilustración 2-1 Curva de calibración. Absorbancia a 400nm vs concentración de fosfato.

2.2.4 *Estudio de la reacción de solubilización por formación de complejos.*

2.2.4.1 *Estudio del avance de la reacción.*

En balones de 1000mL se agregaron 400mL de solución de EDTA y 25g de RF, se agitaron en una plancha con agitador magnético a temperatura ambiente $30 \pm 3^\circ\text{C}$. Se evaluó por triplicado el avance de la reacción para las concentraciones molares de EDTA disódico [0, 0.005, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 y 0.06]M. para esto se tomaron muestras de 10mL en los tiempos [0, 1, 2, 4, 8, 16, 64, 1440]min, se centrifugaron durante 10 minutos para eliminar los sólidos suspendidos, luego se midió la absorbancia a $\lambda = 400\text{nm}$ (longitud de onda en el espectrofotómetro) para determinar la concentración de fosfatos disueltos presentes. Para los resultados obtenidos se correlacionaron las variables: tiempo de reacción y concentración de fosfato disuelto.

2.2.4.2 *Modelos moleculares.*

Se hicieron modelos tridimensionales de los posibles complejos; estos modelos fueron realizados en el software *Chemsketch 10.0*. También se analizaron las estructuras cristalinas de la RF, las cuales fueron modeladas en el software *Vesta 3.4.6*.

2.2.4.3 *Formulación del mecanismo de Reacción.*

A partir de los resultados obtenidos y el análisis conceptual del sistema reaccionante se propuso un mecanismo de reacción para explicar desde lo conceptual, simplícidamente, el proceso de solubilización de la RF.

2.2.5 *Análisis estadístico de los resultados experimentales.*

Para la comparación estadística de los tratamientos se hizo la prueba de Bartlett para probar la homogeneidad de las varianzas (Correa, Iral, & Rojas, 2006). Debido a que los resultados fueron no homogéneos, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis el cual compara las medianas de los grupos de los datos, para determinar si las muestras provienen de una misma población (o, de manera equivalente, de diferentes poblaciones con la misma distribución); con esto, se obtuvo un análisis ANOVA ajustado no paramétrico y se

determinó que no todas las muestras provienen de una misma distribución estadística. Finalmente se optó por hacer pruebas de comparación múltiple entre pares de tratamientos, para determinar si eran significativamente diferentes. Los cálculos se realizaron con el software Matlab R2016a, usando las funciones preestablecidas “*vartestn*” para la prueba de Bartlett, “*kruskalwallis*” para la prueba de Kurskal-Wallis, y “*multcompare*” para las pruebas de comparación múltiple (Mathworks, 2019a, 2019b, 2019c, 2019d).

2.3 Resultados y Discusión.

2.3.1 Obtención de las muestras.

Para los procedimientos experimentales se seleccionó la fracción tamizada $150 - 500 \mu m$. Sin embargo, al microscopio se identificaron pequeños gránulos de tamaño inferior, además se verificó que en su manipulación parte de la muestra se fracciona, de manera que existe incertidumbre respecto a la distribución del tamaño de partícula y el área específica de las muestras; además esta fragmentación (Ilustración 2.2) se propaga durante los experimentos, lo que posiblemente influirá en los resultados.

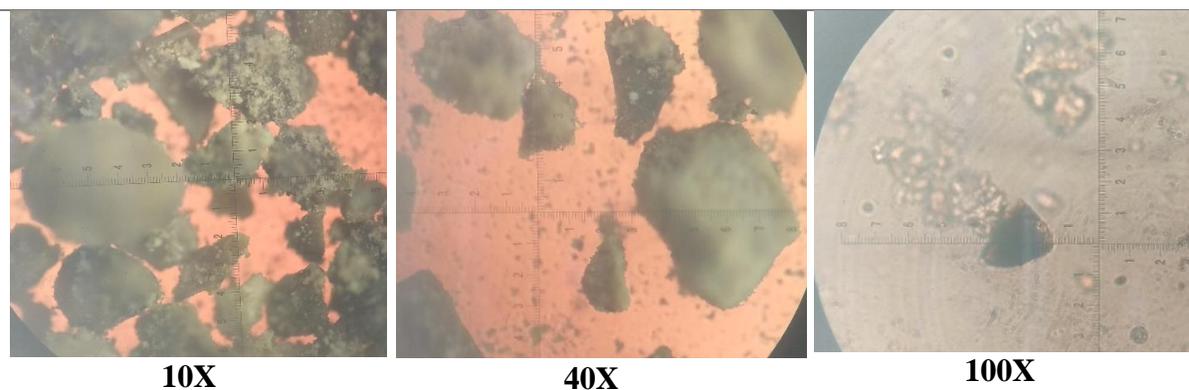


Ilustración 2-2 imágenes al microscopio de las muestras de RF.

2.3.2 Análisis previo de las muestras.

Se identificó satisfactoriamente mediante FT-IR los grupos funcionales principales de la roca fosfórica, también se identificaron algunos de sus minerales constituyentes mediante DRX, y se complementaron con los resultados de microscopía y análisis elemental SEM-EDS; luego, se ponderaron los análisis elementales SEM-EDS, para la caracterización elemental de las muestras de RF, con los cuales se realizaron los análisis subsecuentes de los tratamientos aplicados.

2.3.2.1 Obtención del espectro de absorción infrarrojo FT-IR – identificación del grupo funcional fosfato.

Se analizaron los espectros FT-IR de 3 muestras de RF (llamadas IR1, IR2 e IR3), y se observó que coinciden en la banda de absorción entre $(990 - 1100)cm^{-1}$, que de acuerdo la bibliografía, corresponde con el anión fosfato PO_4^{2-} (ilustraciones 2-3, 2-4 y 2-5); adicionalmente se identificaron picos de absorción alrededor de los $3400nm$ correspondientes al anión hidróxido OH^- , probablemente como componente de fracciones de hidroxiapatita presentes en la RF. Estos resultados son consistentes con espectros de roca fosfórica reportados en otros estudios; por ejemplo, se reportó la identificación del grupo fosfato para minerales de RF en una banda de absorción de $(1060 - 1170)cm^{-1}$ (Ostrooumov y otros, 2004; Ostrooumov, 2006); asimismo, estudios específicos reportaron para muestras de RF de Bayovar (Perú), y de Florida y Carolina del Norte (Estado Unidos) con bandas de absorción de $(1042 y 1090)cm^{-1}$ (Besoain M., Eduardo; Sepúlveda W., Gloria; Molina M., 1991).

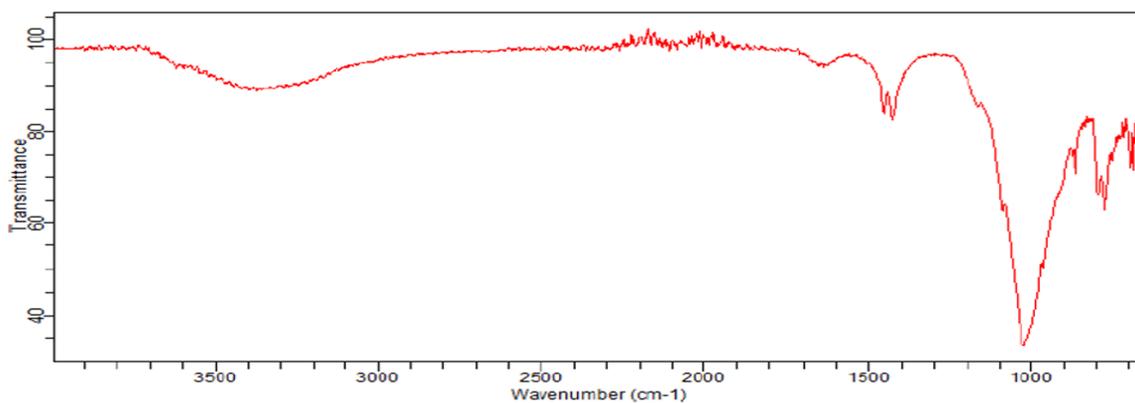


Ilustración 2-3 Espectro FT-IR de la muestra IR1.

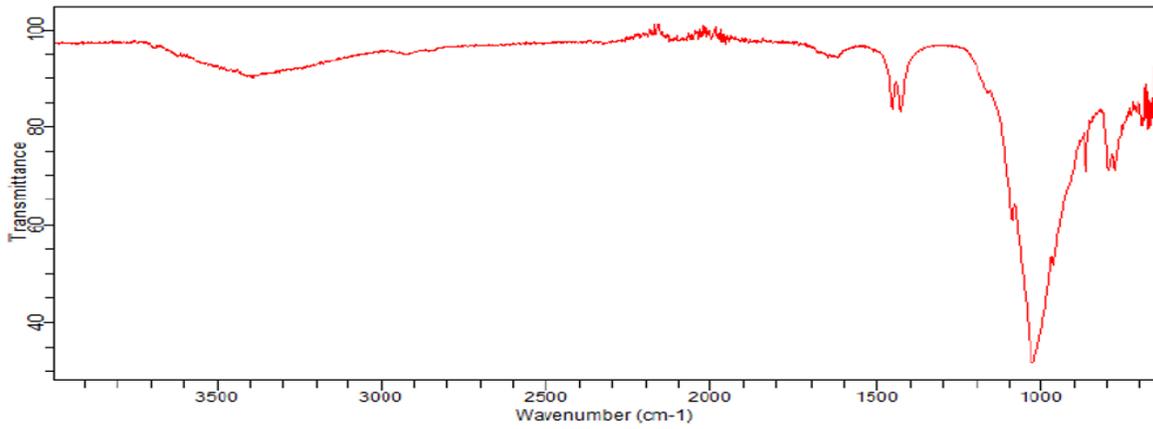


Ilustración 2-4 Espectro FT-IR de la muestra IR2.

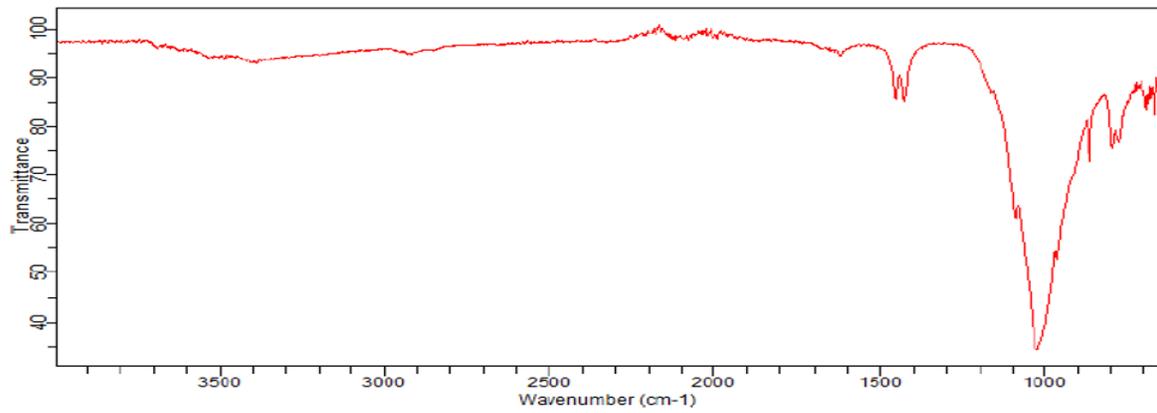


Ilustración 2-5 Espectro FT-IR de la muestra IR3.

Al superponer los espectros encontrados de muestras analizadas (ilustración 2-6), se encontró que coinciden con una semejanza bastante alta, lo cual tiene sentido pues son muestras tomadas a partir de la muestra de RF homogenizada previamente. Aunque se encuentran pequeñas diferencias, ninguna de las muestras presenta otras bandas de transmitancia. De acuerdo con el espectro reportado por Elouear (2008), (ilustración 2-7), el pico encontrado entre 900 y 1100cm^{-1} corresponde al ion fosfato PO_4^{3-} ; la banda 3200 y 3600cm^{-1} corresponde moléculas de agua, humedad de la muestra; los picos encontrado en 870cm^{-1} , y en la banda de 1420 a 1460cm^{-1} corresponden al ion carbonato CO_3^{2-} ; los picos por debajo de 700cm^{-1} posiblemente se relacionen con interacciones de enlaces P-O (Elouear y otros., 2008). También se verificó con la base de datos de la NIST, el espectro FT-IR patrón para el compuesto puro de fosfato-hidróxido de calcio (Ilustración 2-8), y la banda del PO_4^{3-} y del OH^{1-} coinciden consistentemente, lo que indica que en parte, que la banda alrededor de los 3500cm^{-1} se debe posiblemente la presencia de grupos hidroxilo, característicos de la hidroxiapatita.

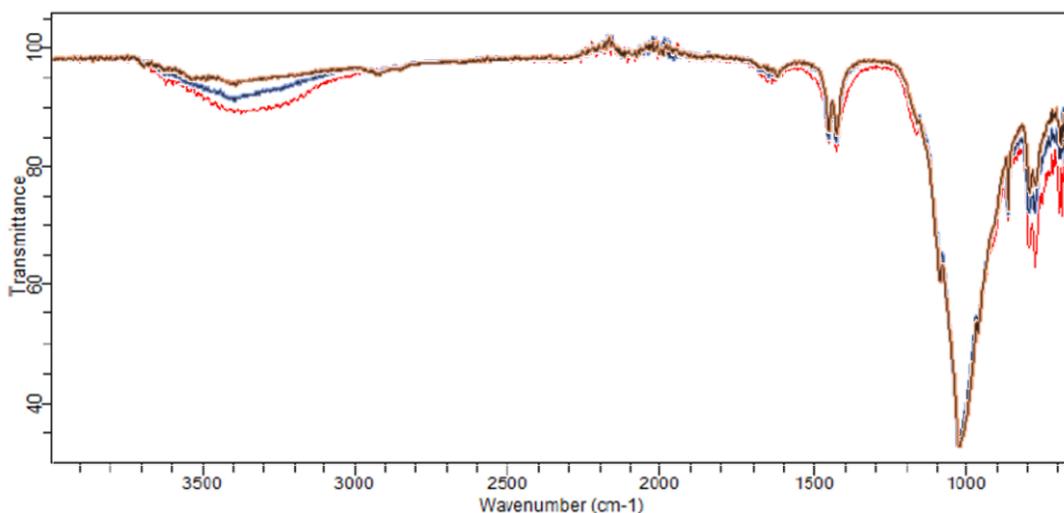


Ilustración 2-6 Superposición de los espectros obtenidos para las muestras de RF analizadas.

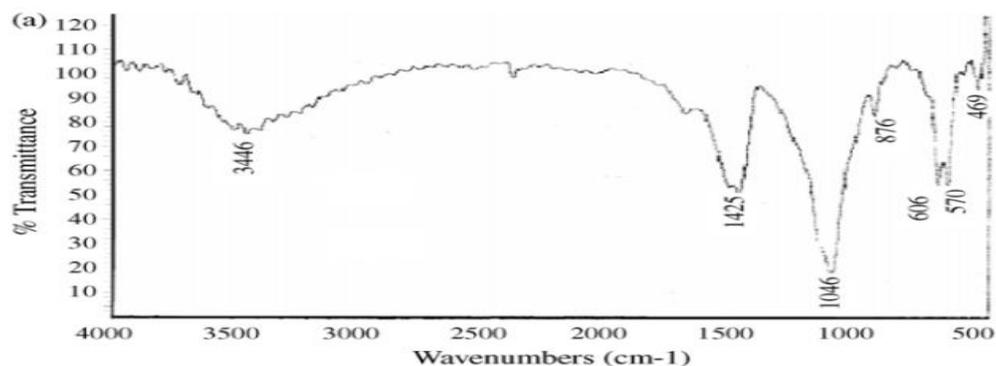


Ilustración 2-7 Espectro FT-IR de muestras de roca fosfórica reportados por Elouear y otros, 2008.

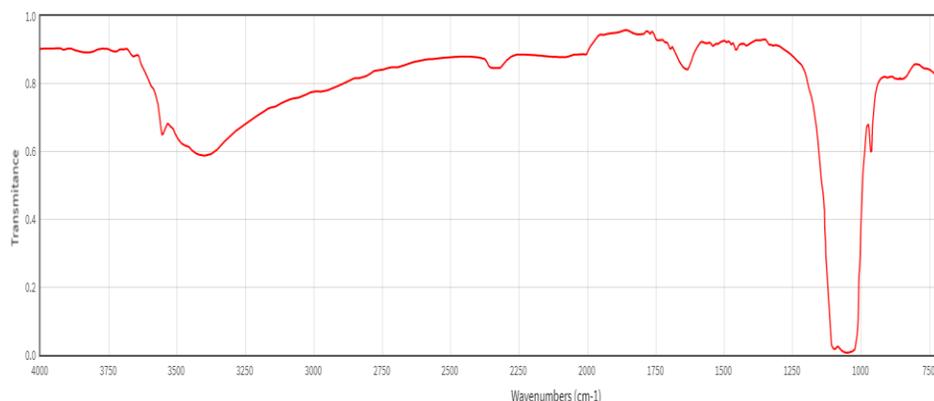


Ilustración 2-8 Espectro patrón IR del fosfato hidróxido de Calcio, reportado en la base de datos de NIST, 2018.

2.3.2.2 Caracterización cristalográfica por difracción de rayos X.

Se analizaron 2 muestras de RF, rotuladas DRX1 y DRX2, con las cuales se obtuvieron los difractogramas en donde se consiguió identificar minerales característicos de las apatitas sedimentarias tipo hidroxiapatita, fluorapatita y carbonato-apatita. También, se identificó un contenido significativo de cuarzo (o sílice), y la presencia de otros minerales de aluminio, y magnesio. En los cuadros 2-3 y 2-4 se describen las fases cristalinas observadas en las muestras. Estas fases fueron identificadas con la base de datos PDF-2 (2014) del International Centre for Diffraction Data (ICDD).

Existe una gran diferencia en la especie de apatito predominante en las muestras analizadas; por ejemplo, en DRX1 es mayor la composición de carbonato-fluorapatita, mientras que en DRX2 es mayor la hidroxiapatita. Por otra parte, el contenido de cuarzo es similar en ambas muestras. Además, llama la atención que en DRX1 se identificaron un mayor número de especies en comparación con DRX2. En el anexo 1 se presenta el análisis comparativo de las fases identificadas de los difractogramas de las muestras.

Cuadro 2-3 Fases cristalinas identificadas en el espécimen seleccionado de la muestra DRX1.

FASE	PDF No.	NOMBRE	CUANTITATIVO	
Cristalino	$Ca_5(PO_4)_3(OH)$	010-86-0740	Hidroxiapatita	23,6%
	SiO_2	010-85-0335	Cuarzo	13,2%
	$Ca_{9,74}(PO_4)_{5,45}F_{2,05}(CO_3)_{0,53}$	010-73-9697	Carbonato (NR) - Fluorapatita	61,5%
	$Al_2(Si_2O_5)(OH)_4$	010-74-1784	Caolinita-1A	1,0%
	$Ca_5(PO_4)_3F$	010-74-	Fluorapatita	0,5%

		4390		
	$Mg(CO_3)$	010-70-8522	Magnesita HP	0,2%
	$CaMg(CO_3)_2$	010-75-3689	Dolomita	N.C

Nota: N.C = No Cuantificable (La(s) fase(s) son identificadas pero debido a su baja proporción no es posible realizar su respectiva cuantificación).

Cuadro 2-4 Fases cristalinas identificadas en el espécimen seleccionado de la muestra DRX2.

FASE		PDF No.	NOMBRE	CUANTITATIVO
Cristalino	$Ca_5(PO_4)_3(OH)$	010-86-0740	Hidroxiapatita	84,0%
	SiO_2	010-85-0335	Cuarzo	13,7%
	$Ca(CO_3)$	010-83-0578	Calcita	2,3%

2.3.2.3 Caracterización morfológica, por microscopía electrónico de barrido y análisis elemental por espectroscopia de dispersión de energía de rayos X. SEM-EDS.

Se obtuvieron 4 imágenes digitales SEM-1, SEM-2, SEM-3, y SEM-4 con las siguientes características (las imágenes en tamaño real se presentan en el anexo): SEM-1 (Magnificación 100x, Tamaño 1024 × 943px, Resolución 102ppp, Profundidad 24bits), SEM-2 y SEM-3 (Magnificación 400x, Tamaño 1024 × 943px, Resolución 102ppp, Profundidad 8bits), SEM-4 (Magnificación 200x, Tamaño 1024 × 943px, Resolución 102ppp, Profundidad 24bits). En las imágenes principales (ilustraciones 2-9, 2-10) se observan las características de la superficie de las partículas de RF. De acuerdo con el análisis elemental SEM-EDS, se identificaron los elementos constituyentes de la RF. La caracterización correspondiente se reporta en los cuadros 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, y 2-9, donde *Wt%* es el porcentaje másico de cada elemento y *At%* es el porcentaje del área que ocupa el elemento.

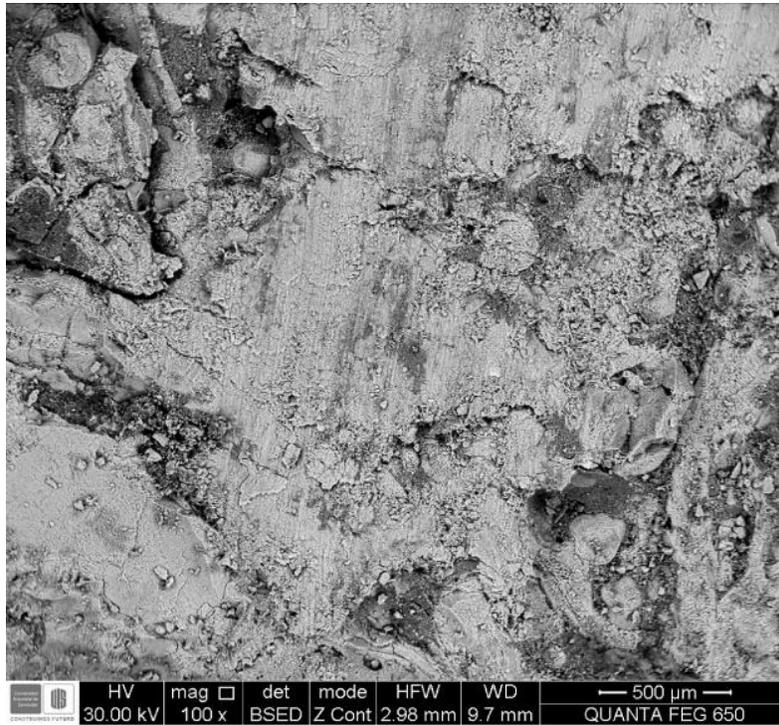


Ilustración 2-9 Muestra de RF 1 - Imagen principal – $3000\mu\text{m} \times 2500\mu\text{m} = 7.5 \times 10^6 \mu\text{m}^2 = 7.5\text{mm}^2$.

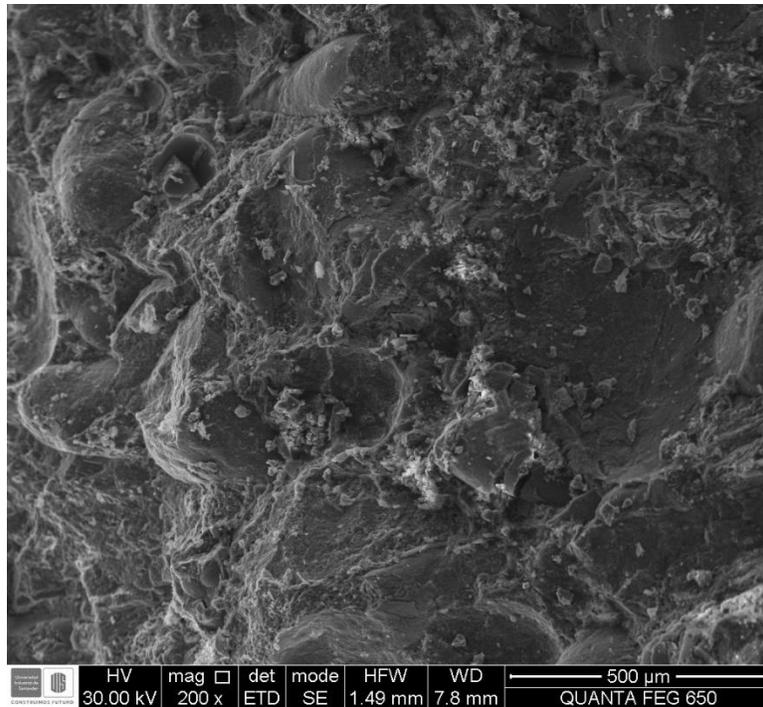


Ilustración 2-10 Muestra de RF 2 - Imagen principal – $3000\mu\text{m} \times 2500\mu\text{m} = 7.5 \times 10^6 \mu\text{m}^2 = 7.5\text{mm}^2$.

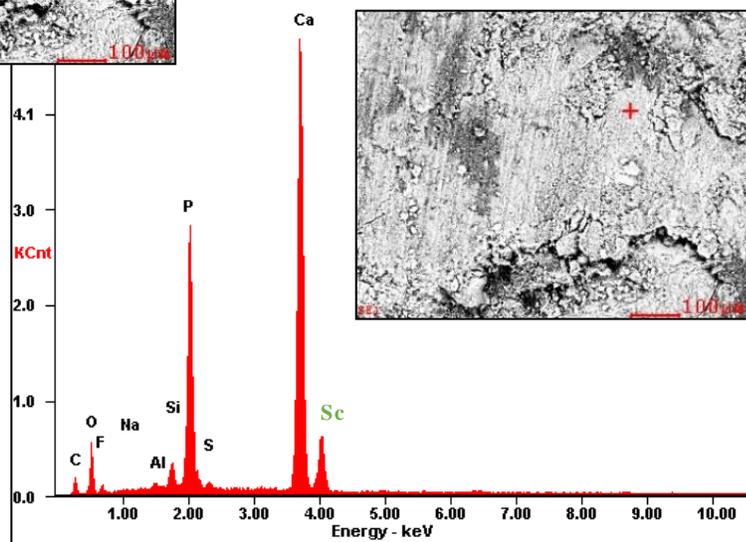
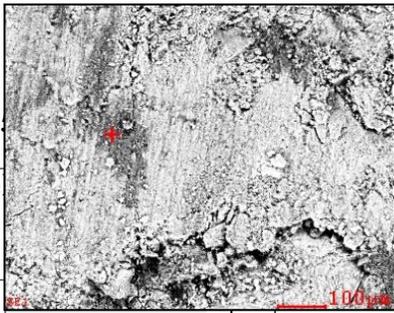
Cuadro 2-

Análisis e

Elemento

Cκ		
Oκ	26.2	38.12
Fκ	2.9	3.55
Naκ	0.55	0.56
Alκ	0.95	0.82
Siκ	2.26	1.87
Pκ	18.78	14.12
Sκ	0.82	0.59
Caκ	38.14	22.15

Corrección por método ZAF



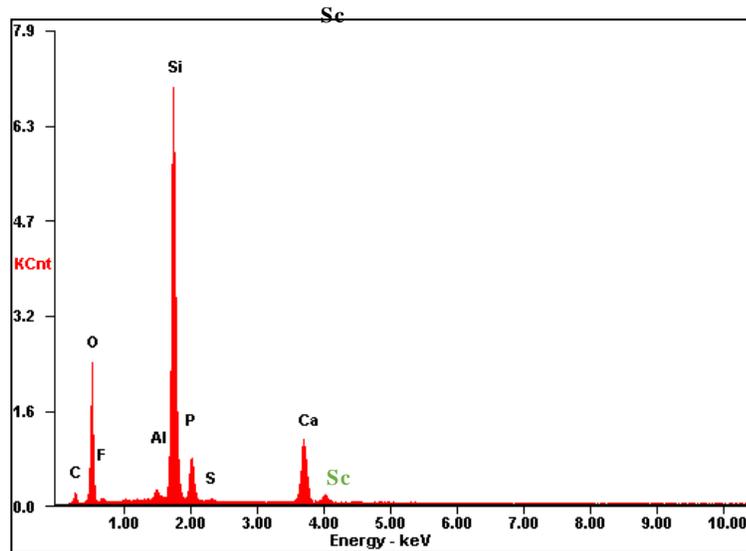
Cuadro 2-6 Escaneo SEM-EDS del punto P2

Análisis elemental

SEM-EDS

Elemento	Wt%	At%
Cκ	10.84	17.41
Oκ	42.88	51.72
Fκ	2.19	2.22
Alκ	0.97	0.69
Siκ	30.9	21.23
Pκ	5.64	3.51
Sκ	0.29	0.17
Caκ	6.3	3.04

Corrección por método ZAF



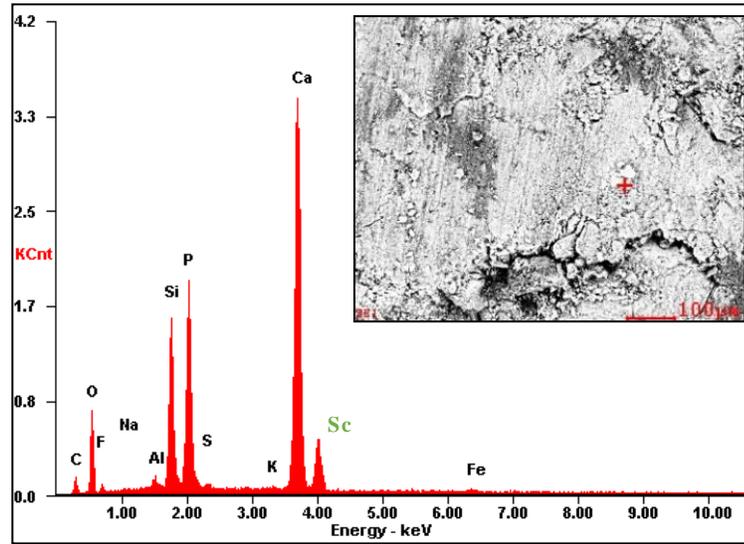
Cuadro 2-7 Escaneo SEM-EDS del punto P3

Analisis elemental

Element	Wt%	At%
<i>Cκ</i>	7.13	12.78
<i>Oκ</i>	41.6	55.97
<i>Fκ</i>	2.87	3.25
<i>Alκ</i>	1.11	0.88
<i>Siκ</i>	5.36	4.11
<i>Pκ</i>	11.54	8.02
<i>Sκ</i>	0.55	0.37
<i>Kκ</i>	0.23	0.13
<i>Caκ</i>	20.43	10.97
<i>Feκ</i>	8.83	3.4
<i>Cuκ</i>	0.35	0.12

Corrección por método ZAF

SEM-EDS



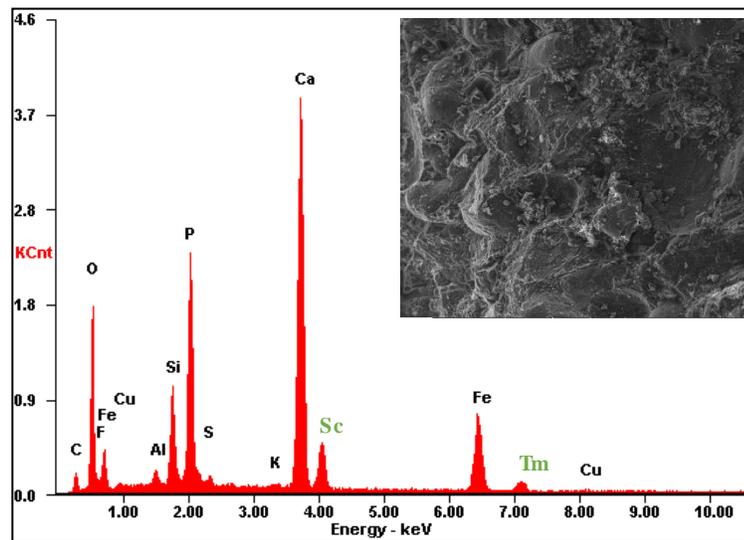
Cuadro 2-8 Escaneo SEM-EDS del punto P4

Analisis elemental

Elemento	Wt%	At%
<i>Cκ</i>	9.51	17.55
<i>Oκ</i>	30.04	41.61
<i>Fκ</i>	3.02	3.52
<i>Naκ</i>	0.68	0.66
<i>Alκ</i>	1.17	0.96
<i>Siκ</i>	10.86	8.57
<i>Pκ</i>	14.67	10.5
<i>Sκ</i>	0.73	0.5
<i>Kκ</i>	0.34	0.2
<i>Caκ</i>	28.49	15.75
<i>Feκ</i>	0.48	0.19

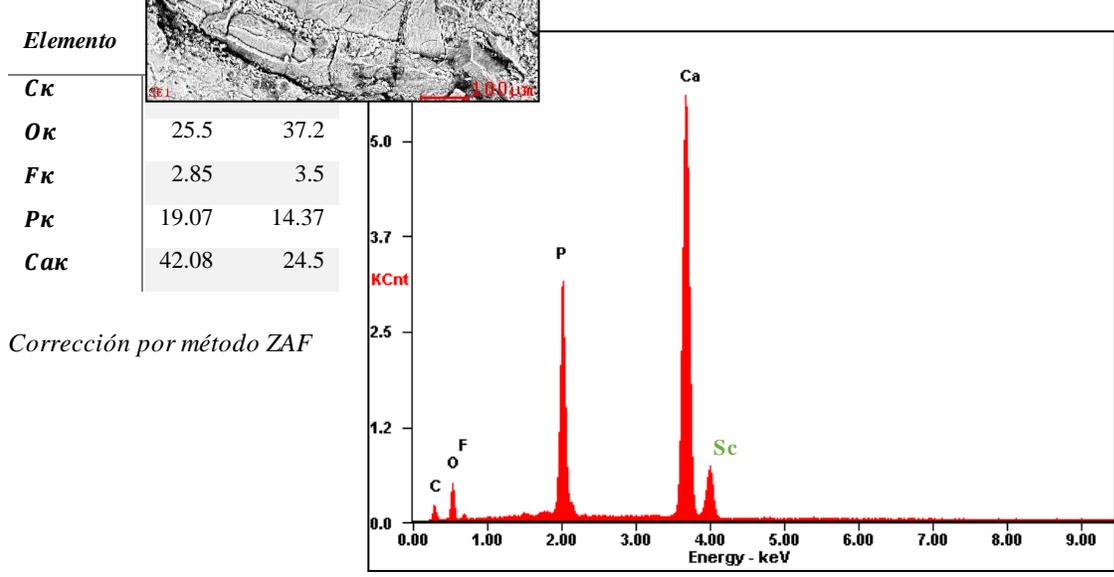
Corrección por método ZAF

SEM-EDS



Cuadro 2-9

Análisis elemental



Nota: El elemento Sc en P1, P2, P3, P4, y P5, se identificó de manera manual, mediante tablas certificadas y no fue incluido en el análisis elemental realizado de manera autónoma por el software. Igualmente, para el elemento Tm identificado en P4.

Se obtuvieron 5 puntos de escaneo P1, P2, P3 P4 y P5, dentro de un área de escaneo de 7.5mm^2 , realizado sobre dos muestras de RF, sin moler, seleccionadas aleatoriamente del mineral de RF colectado para este trabajo. Se identificó los elementos P, Ca y O característicos de las apatitas, los cuales estuvieron presentes en todos los puntos analizados; los porcentajes máscos de estos tres elementos sumaron: 86.65% en P5, 73.57% en P4, 73.2% en P3, 54.82% en P2 y 83.12% en P1; lo cual en promedio representan el 69.79% de la composición de apatita (como fosfato de calcio) en la RF. Los elementos C y F también estuvieron presentes en todos los puntos escaneados. El flúor en promedio 2.76% de porcentaje máscico; haciendo la correspondencia en moles para la fracción de fluorapatita, se encuentra que este elemento, aparentemente está en relación estequiométrica de acuerdo con la caracterización DRX. Otros elementos con participación significativa en los puntos escaneados con más del 5% de porcentaje máscico fueron: en P5 C (10.51%); en P4 Si (5.36), C (7.13), Fe(8.83%); en P3 C(9.51%), Si(10.86%); en P2 C(10.84%), Si(30.9%); en P1 C(9.4%). Adicionalmente se encontraron los elementos Al, Cu, Fe, K, S y Na, presentes en cantidades menores de entre 0.2 al 1%. Es importante mencionar que el ruido de fondo de los espectros SEM-EDS no permite medir elementos con composiciones inferiores a 0.1% de porcentaje máscico. Además, el análisis SEM-EDS no permite identificar elementos con número atómico inferior a 4, por lo tanto, el H no puede ser identificado y medido en la identificación de la hidroxiapatita.

En general se verificó la presencia de los componentes principales de formas de apatito; Además, esta prueba permite evidenciar la variabilidad punto a punto de la composición de

una muestra, en este caso, en los 5 puntos escaneados, seleccionados dentro de un área de 7.5mm^2 , mostraron algunas diferencias en su composición. Este análisis permite seleccionar puntos de escaneo específicos a partir de la imagen microscópica obtenida; por ejemplo, el punto P5 como se observa en la imagen del cuadro 5, fue tomado en un bloque uniforme, y por su composición, de acuerdo con el análisis elemental se trataría de un cristal de carbonato-fluorapatita de alta pureza. Bloques de roca similares se observan dispersos en toda la matriz sólida escaneada.

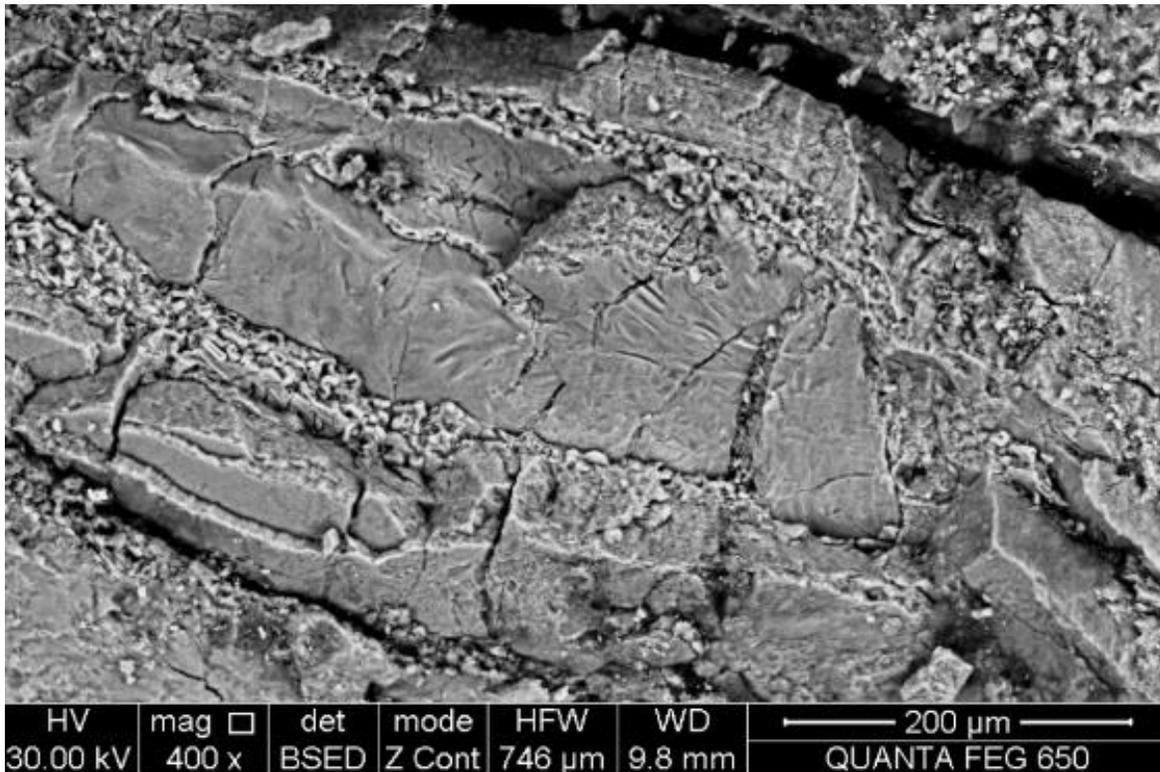


Ilustración 2-11 Características superficiales Muestra 1.

Por otra parte, al observar las características la superficie, se encuentra que presenta una topografía bastante variada y compleja (ilustraciones 2-11 y 2-12) incluso análoga a una fotografía satelital de un terreno rocoso y árido (Ilustración 2-9). De manera que se identifican todo tipo de accidentes en su superficie. La resolución de las imágenes adquiridas permiten de manera precisa, la identificación de formas cristalinas, comúnmente evidenciadas en un orden superior a los $50\mu\text{m}$, por esto se recomienda hacer un estudio SEM-EDS de mayor resolución para determinar las características de las partículas de roca fosfórica molidas, para una mejor comprensión de los fenómenos superficiales; por ejemplo, complementar el estudio de caracterización con SEM-EDS para la medición de variables como la rugosidad, el área específica, la dimensión fractal, la altura de escalones, y la medición de la corrosión (acción de un agente químico); este último, sería útil para el seguimiento de los tratamientos al solubilizar la roca fosfórica.

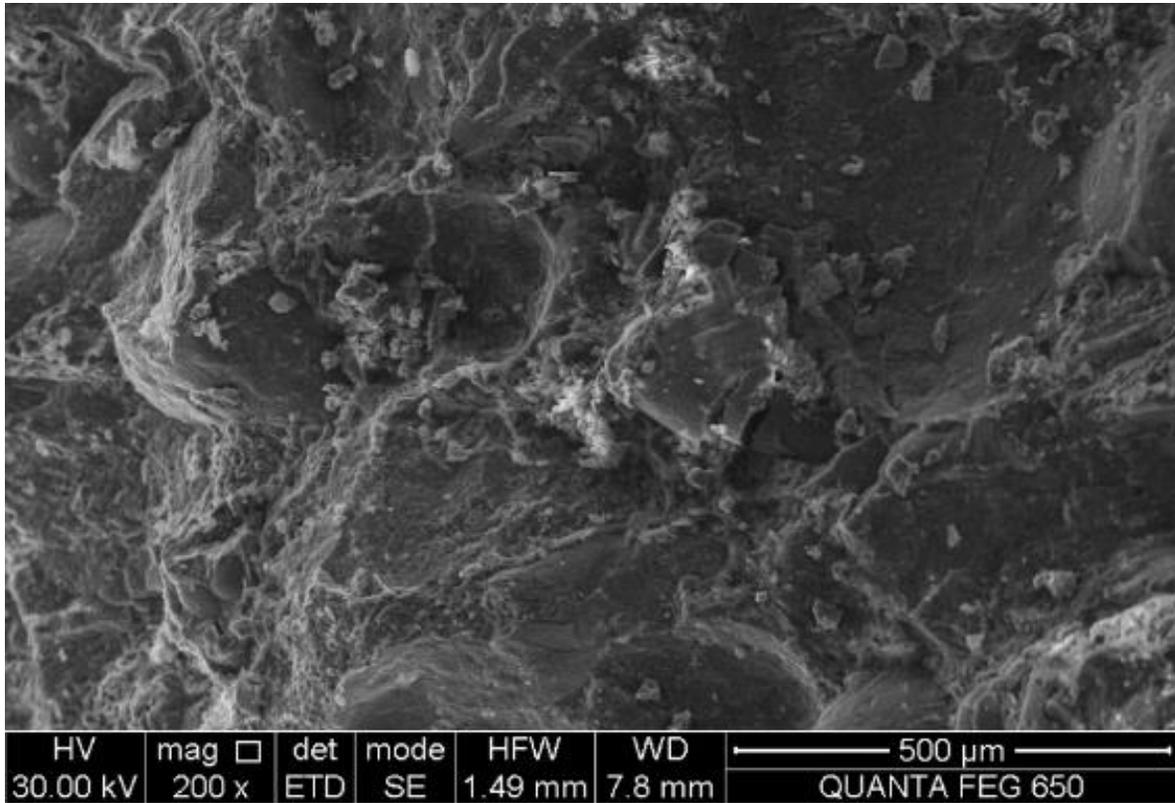


Ilustración 2-12 Características superficiales Muestra 2.

Comparando los resultados obtenidos con el análisis elemental por SEM-EDS con el análisis cristalográfico DRX, se puede apreciar una buena correspondencia entre ambos, en sus componentes mayoritarios; se corrobora la presencia elemental de las especies que conforman las diferentes formas de apatita identificadas (carbonato-apatita, hidroxiapatita, y fluorapatita; también se soporta la presencia de los elementos para la existencia de cuarzo (SiO_2), calcita ($CaCO_3$), dolomita $CaMg(CO_3)_2$; por ejemplo, el sílice (SiO_2) en el análisis DRX se obtuvo en promedio un 13.5%, mientras que, con el análisis SEM-EDS se confirmó la presencia de silicio, que en promedio alcanzó 9.86%. En contraste, en el análisis elemental SEM-EDS no se registró la presencia de Mg , el cual aparece en forma de magnesita $Mg(CO_3)$ y dolomita $CaMg(CO_3)_2$ en el análisis DRX; asimismo en el análisis DRX no se consiguió identificar especies de Fe el cual presenta una composición promedio de 1.86% en análisis SEM-EDS, y tampoco se identificaron especies de Cu , Na , S y K .

Haciendo una correspondencia en moles de los elementos, se calculó la correspondencia de las especies, de acuerdo con las fórmulas químicas obtenidas con el análisis DRX, usando como referencia el fósforo y suponiendo que éste sólo forma minerales de apatita (fosfato de calcio, carbonato apatita, fluorapatita o hidroxiapatita de acuerdo con la fórmula $Ca_{10}(PO_4)_6(CO_3, (OH)_2, F_2)$). Entonces se encontró que habría una deficiencia de Ca (-9.64% de exceso); habría oxígeno suficiente para la conformación de los fosfato PO_4 (exceso de 15.51%), sin embargo, el exceso de oxígeno del 15.51% respecto al fosfato es insuficiente, principalmente, para la conformación de las especies carbonato (CO_3), y sílice

(SO_2), entre otras menores como óxidos de *Al*, *Fe*. Esta insuficiencia de oxígeno respecto a la caracterización dada, implica la existencia de otras especies no identificadas en el análisis de difracción de rayos-X. De manera que es necesario implementar otras pruebas para su identificación. La deficiencia de calcio implica probablemente la presencia de elementos sustituyentes en las formas de apatita, tales como, *Al*, *Fe*, y *Mg*, los cuales fueron identificados en los análisis.

Esto significa que la composición real de los minerales presentes en las muestras no queda completamente establecida. Lo anterior es normal, pues la roca fosfórica es una mezcla bastante compleja, aún más, proviniendo de origen orgánico sedimentario (Kar, Peak, & Schoenau, 2012). De todas formas, los resultados obtenidos son una buena aproximación sobre la composición y naturaleza de las especies presentes. Cabe apuntar que estas variaciones son una consecuencia esperada, ya que la composición entre muestras puede cambiar sustancialmente, aunque se haya hecho una homogenización previa del material, y que este hecho se amplifica cuando se trabaja con cantidades tan pequeñas y áreas de escaneo el orden de los nanómetros. Por lo tanto, para alcanzar mayor exactitud en la composición real de la RF, es necesario analizar una cantidad mucho mayor de puntos por muestra, lo que acarrea un costo muy elevado; al final, esta incertidumbre permanece intrínseca.

Otro aspecto de relevancia es que en los espectros SEM-EDS de todos los puntos analizados, aparecieron picos de emisión aproximadamente de 4.1 KeV con conteos significativos, superiores en algunos casos a los elementos identificados, para los cuales no se identificó ningún elemento en el reporte; sin embargo, al revisar las cartas de energía para análisis EDS de la JEOL (JEOL, 2019), certificadas ISO9001, ISO14001 este pico corresponde probablemente al escandio (Sc) cuyo valor de $k\alpha = 4.088KeV$. A propósito, al revisar en el manual del software utilizado para los análisis (Genesis de la marca EDAX), este elemento por defecto está en una lista de elementos omitidos para su identificación y cuantificación (EDAX, 2003). Por lo anterior, se subraya la importancia de este hallazgo de darse la confirmación de la existencia de este elemento en los yacimientos de RF de la mina, pues de acuerdo con Kalashnikov y otros, este es un metal estratégico por sus aplicaciones en tecnologías avanzadas (Kalashnikov y otros, 2016); por todo esto, se considera necesario realizar un análisis elemental más riguroso, en donde se tenga en cuenta este elemento.

Finalmente, con los resultados obtenidos de DRX y SEM-EDS se estimó el análisis elemental para las muestras de RF (Cuadro 2-10), haciendo promedios ponderados. Se encontró, que el fósforo total (elemental P) de las muestras de roca fosfórica examinadas es de 14.61%, este valor es en adelante la referencia para los cálculos de solubilidad (Cuadro 2-10)

Cuadro 2-10 Análisis Elemental a partir de los datos obtenidos con los métodos DRX y SEM-EDS.

Elemento	Fracción másica			%másico
	DRX	SEM	promedio	
O	0.421798	0.331737	0.3768	37.68
Ca	0.342877	0.270307	0.3066	30.66
P	0.153024	0.139105	0.1461	14.61
Si	0.063958	0.098551	0.0813	8.13
C	0.003523	0.094579	0.0491	4.91
Fe	0	0.018581	0.0093	0.93
F	0.012331	0.027601	0.0200	2.00
Al	0.001045	0.010478	0.0058	0.58
Mg	0.000288	0	0.0001	0.01
H	0.001158	0	0.0006	0.06
Na	0	0.002455	0.0012	0.12
S	0	0.00477	0.0024	0.24
Cu	0	0.000699	0.0003	0.03
K	0	0.001138	0.0006	0.06

2.3.3 Evaluación de los tratamientos con EDTA disódico.

En las ilustraciones 2-13 y 2-14 se observa la relación entre la concentración de disolución de EDTA disódico aplicado y la concentración de fosfato solubilizado, calculado a partir de la curva patrón absorbancia-concentración obtenida previamente. La influencia de la concentración del ligando es notable, y se identifica claramente que existe una región óptima en la cual se obtiene la mayor cantidad de fosfato solubilizado. En los blancos (B) y en el tratamiento S6, se obtuvieron los valores más bajos; valores intermedios para los tratamientos S1, S2, y S5; los valores más altos fueron para los tratamientos S3 y S4. Los grupos de datos de los tratamientos fueron homogéneos.



Ilustración 2-13 Resultados colorimetría. Tratamientos con EDTA disódico di hidrato – La intensidad del amarillo es proporcional al fosfato disuelto.

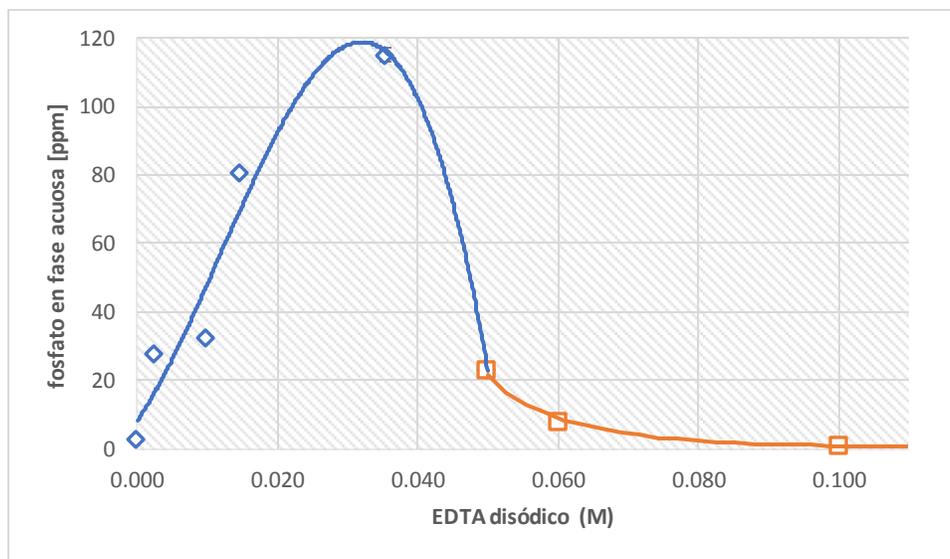


Ilustración 2-14 Disolución de fosfato en función de la concentración de EDTA para un tiempo de reacción de 24 horas.

En los tratamientos con H_2SO_4 al 40%_(V/V) se obtuvo valores promedio de 682 ppm de fosfato disuelto. Este valor es tomado como 100% para el cálculo del índice de solubilidad (IS) propuesto como referencia; y corresponde a los fosfatos solubilizables por acidulación convencional sin tratamiento térmico. Los resultados se muestran en el cuadro 2-11.

Cuadro 2-11 Resultados obtenidos con los tratamientos de EDTA disódico en la RF.

Tratamiento	%P total disuelto	IS (%)
B	0.01 ± 0.0028	0.38
S1	0.11 ± 0.0040	4.07
S2	0.13 ± 0.0001	4.76
S3	0.31 ± 0.0024	11.78
S4	0.45 ± 0.0125	16.87
S5	0.09 ± 0.0073	3.30
S6	0.01 ± 0.0034	0.19
H_2SO_4 (40%)	2.66 ± 0.0340	100 (valor de referencia)
n = 3	$\bar{X} \pm \sigma$	

La disolución de fosfatos con el tratamiento S4 ($0.035 \frac{mol}{dm^3}$) alcanzó el 0.45% del fósforo total calculado para las muestras de RF. La disolución obtenida con ácido sulfúrico al 40% ($7.5 \frac{mol}{dm^3}$) fue de 3.53%. Significa que con S4 se alcanzó un 16.87% (parámetro IS) del alcanzado con ácido sulfúrico. Como se mostró anteriormente, el incremento de la concentración de EDTA no es una alternativa, y de hecho S4 se encuentra cerca del valor óptimo de concentración para las condiciones de reacción dadas; pero es interesante, pues se necesita bajas concentraciones de reactivo para alcanzar una disolución significativa comparada con la obtenida con el ácido concentrado. Además, en la práctica, se requiere que la RF solubilice parcialmente y de manera progresiva el fosfato (Jianbo y otros, 2011;

Ajiboye y otros, 2008), por tanto es posible formular técnicas que promuevan estos procesos con el uso de agentes complejantes, contrariamente a la negativa planteada por Degryse en su trabajo (Degryse y otros, 2013), la solubilización de fosfatos por medio agentes quelantes como el de EDTA, u otros ácidos orgánicos de origen biológico pueden ser una alternativa de fertilización sostenible (Frossard y otros, 2000).

2.3.4 Estudio de la reacción de solubilización por formación de complejos.

2.3.4.1 Avance de la reacción de disolución de fosfatos.

En la ilustración 2-15 se observa el efecto del cambio en la concentración de EDTA sobre el fosfato disuelto en la fase acuosa, lo que evidencia una marcada influencia del mismo y de la importancia de las condiciones de reacción. En la ilustración 2-16 se observa el avance de la reacción obtenido para diferentes concentraciones de EDTA disódico. La figura se presenta en diferentes escalas de tiempo para mostrar el comportamiento de la reacción a corto plazo, de 0-20 min (ilustración 2-16 (a)), a mediano plazo, de 0-200 min (ilustración 2-16 (b)), y a largo plazo de 0-1440 min (ilustración 2-16 (c)). Se observan tres regiones para las cuales se podría determinar correlaciones lineales de velocidad, la primera en los primeros dos minutos, en donde la concentración salta de 0 a otro valor entre 4 y 10 ppm, luego entre 2 y 20 minutos en donde la velocidad parece no aumentar mucho y erróneamente anticipa un crecimiento asintótico, finalmente después de 20 min hasta 1440 min (24 horas) para cuando se hizo una última medición, se observa una tendencia de crecimiento continuo. Esta tendencia tiene una pendiente baja para las concentraciones de EDTA de 0.005, 0.05 y 0.06M, mientras que para las concentraciones de 0.04, 0.03 y 0.02M es notablemente mayor.

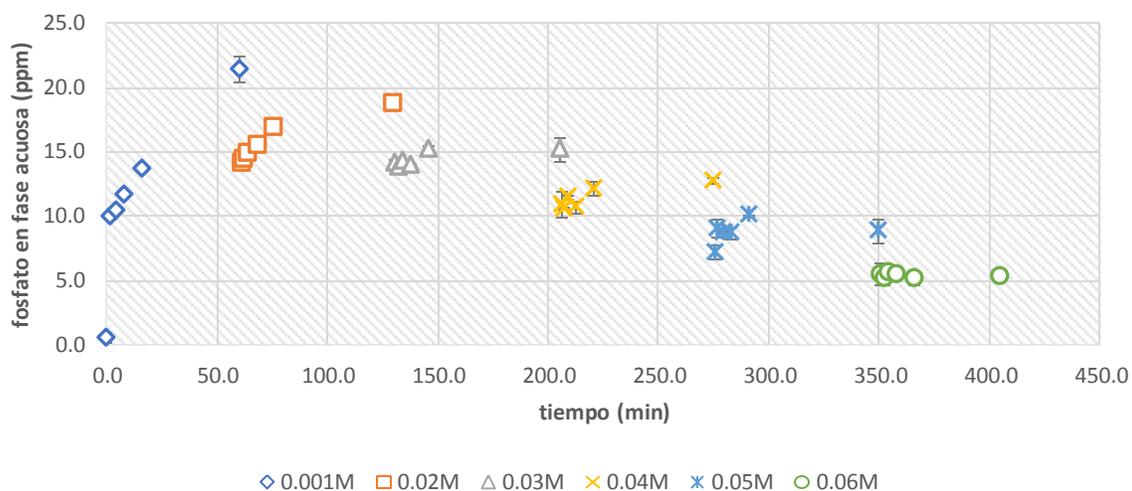


Ilustración 2-15 Efecto del incremento de la concentración de EDTA disódico a intervalos de tiempo.

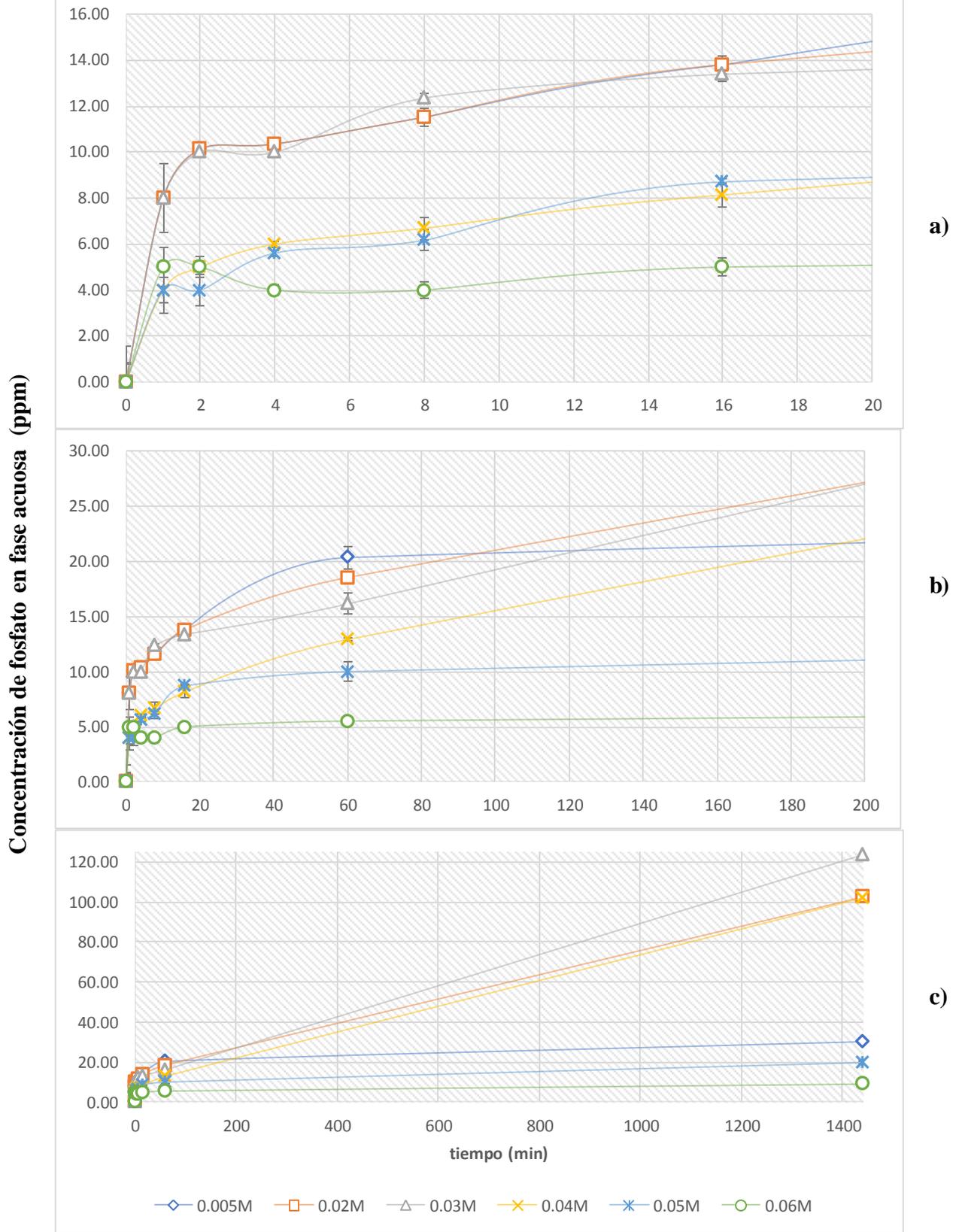
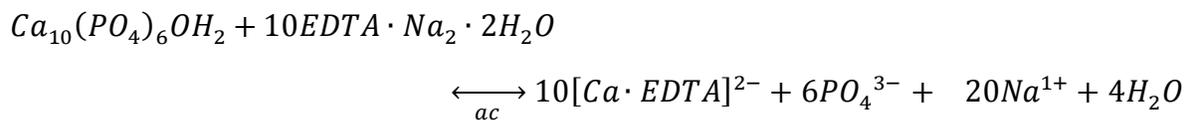


Ilustración 2-16 Evolución de la reacción de solubilización de RF con el tiempo a diferentes concentraciones de EDTA disódico: a) 0-20min, b) 0-200min, c) 0 – 1400min.

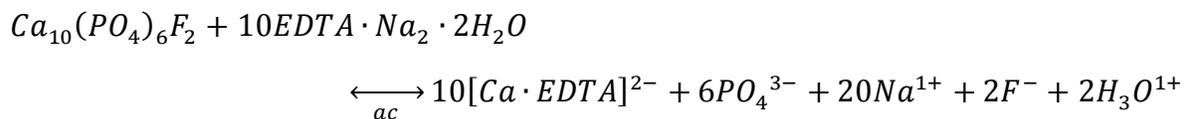
La velocidad de formación del complejo es un mecanismo reversible rápido, de acuerdo con la observación de la reacción inversa. De acuerdo con la ilustración 2-15, el cambio súbito en la concentración de EDTA disódico en la mezcla reaccionante modifica la concentración del fosfato disuelto, lo cual implica posiblemente la descomposición de complejos Ca-EDTA y la precipitación de los grupos fosfato en forma de fosfato de calcio $Ca_3(PO_4)_2$. Esta reacción es rápida y ocurre en menos de un minuto. Luego la reacción continúa avanzando lentamente hacia un estado de equilibrio que varía en la medida en la que se diluye la roca fosfórica. En este experimento se observó que la disolución inicial de fosfatos en el primer minuto es rápida y con el paso del tiempo se hace más lenta, además el aumento de la concentración de EDTA en busca de valores más favorables para la disolución, no condujo a una mayor disolución de fosfatos, por el contrario, la tendencia fue la disminución de los fosfatos ya disueltos; cabe aclarar para este análisis solo se consideran los primeros 75min de periodo de reacción. Está alteración súbita al modificar la concentración de EDTA disódico en la mezcla reaccionante implica el salto de un sistema en pseudo-equilibrio a otro; se señala como pseudo-equilibrio al balance electrolítico de la solución en fase acuosa con la composición en el tiempo inmediato, el cual se modifica toda vez que con el tiempo nuevas especies iónicas pasan de la fase sólida a la fase acuosa. Este comportamiento permite inferir que las condiciones de disolución de la roca cambian con el tiempo, en la medida en que nuevos iones pasan de la RF a la fase acuosa.

De acuerdo con la caracterización morfológica realizada por DRX, a continuación se plantean las reacciones globales para el sistema reaccionante (Harris, 2007), para las principales especies identificadas en DRX1 y DRX2: hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), carbonato-fluorapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6F_{1.5}(CO_3)_{0.5}$), fluorapatita ($Ca_{10}(PO_4)_3F_2$), Sílice amorfa (SiO_2); también carbonatos de calcio y de magnesio ($Ca(CO_3), Mg(CO_3)$) y tetrahidroxisilicato de aluminio ($Al_2(Si_2O_5)(OH)_4$), comúnmente llamada caolinita.

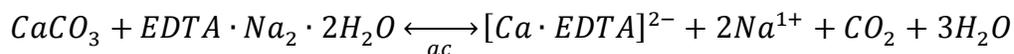
Reacciones globales.



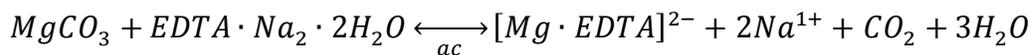
Ecuación 2.3



Ecuación 2.4



Ecuación 2.5



Ecuación 2.6

donde:

$Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$: Hidroxiapatita

$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$: Fluorapatita

$EDTA \cdot Na_2 \cdot 2H_2O$: Edeato disódico dihidrato (Ligando de la forma H_2EDTA^{2-})

$[M \cdot EDTA]^{2-}$: Complejo de metal M (Ca^{2+} , Mg^{2+}) y $EDTA^{4-}$ (*tetradentado* o *hexadentado*)

PO_4^{3-} : Fosfato (Soluble)

H_3O^+ : hidronios formados en la ionización de los dos hidrogenos de los dos grupos carboxilo en el EDTA

Análisis de las condiciones fisicoquímicas de la formación de complejos de EDTA-Ca.

El uso de la sal disódica de EDTA ($EDTA \cdot 2Na$) facilita la formación de los complejos tetradentados y hexadentados (Ilustración 2-17) a pH inferiores ($pH < 8$) debido a que en solución acuosa su solubilidad alcanza los $100g/L$ y se promueve la ionización de los 2 hidrógenos ácidos en los grupos carboxilos sin ionizar; de allí su amplia aplicación como agente para titulación de metales (Harris, 2007). En condiciones ácidas ($pH < 5$) la ionización ocurre parcialmente y se favorecen los complejos Ca^2EDTA^{2-} , Ca^2EDTA^{3-} ; En condiciones básicas con $pH > 8$, se favorecen los complejos Ca^2EDTA^{4-} y Ca^2EDTA^{6-} ; sin embargo, para titulación de metales, Harris (2007) recomienda trabajar en un rango de pH definido ($10 \leq pH \leq 12$) para el cual el complejo tetradentado presenta la mayor composición de los complejos posibles y su estabilidad es la adecuada para pruebas analíticas (Harvey, 2000), esto permite realizar los cálculos estequiométricos con una alta confiabilidad.

Dependiendo de las condiciones del pH, se hacen viables diferentes formas de los complejos Ca-EDTA (Harris, 2007). En la ilustración 2-18 propuesta por Harvey (2000) se muestra un diagrama de laso en donde se relaciona el pH con el estado de ionización del EDTA (simbolizado con Y); el cual parte desde su forma hexaprótica H_6Y^{2+} , hasta la ionización completa (la pérdida total de sus hidrógenos ácidos) Y^{4-} . El ligando $EDTA^{4-}$ es la especie ideal pues tiene la mayor capacidad para secuestrar los cationes Ca^{2+} de la fluorapatita conformando complejos tetradentados y hexadentados en relación 1:1 (ver reacciones globales, arriba), liberando de esta forma los aniones fosfato, los cuales forman

una sal soluble (Na_3PO_4) con los cationes Na^{1+} presentes en la disolución procedentes de la disociación del edetato disódico.

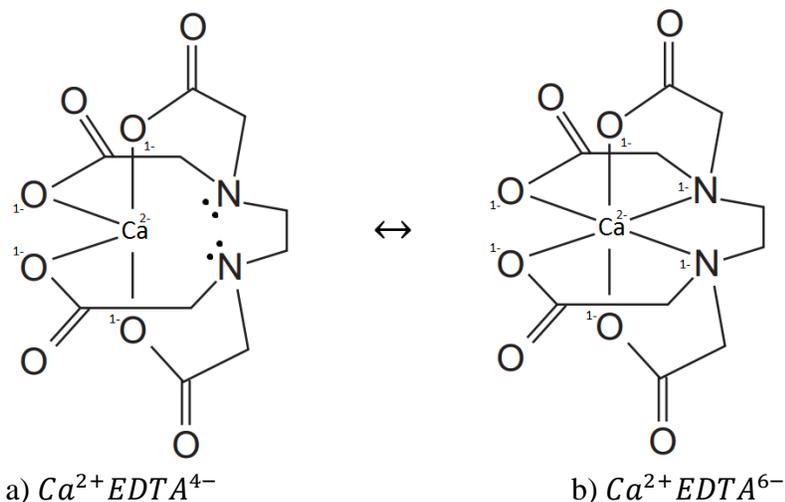


Ilustración 2-17 Complejos de EDTA-Ca: a) complejo tetradentado con 4 enlaces coordinados Ca-O, b) complejo hexadentado con 4 enlaces coordinados Ca-O y 2 enlaces coordinados Ca-N.

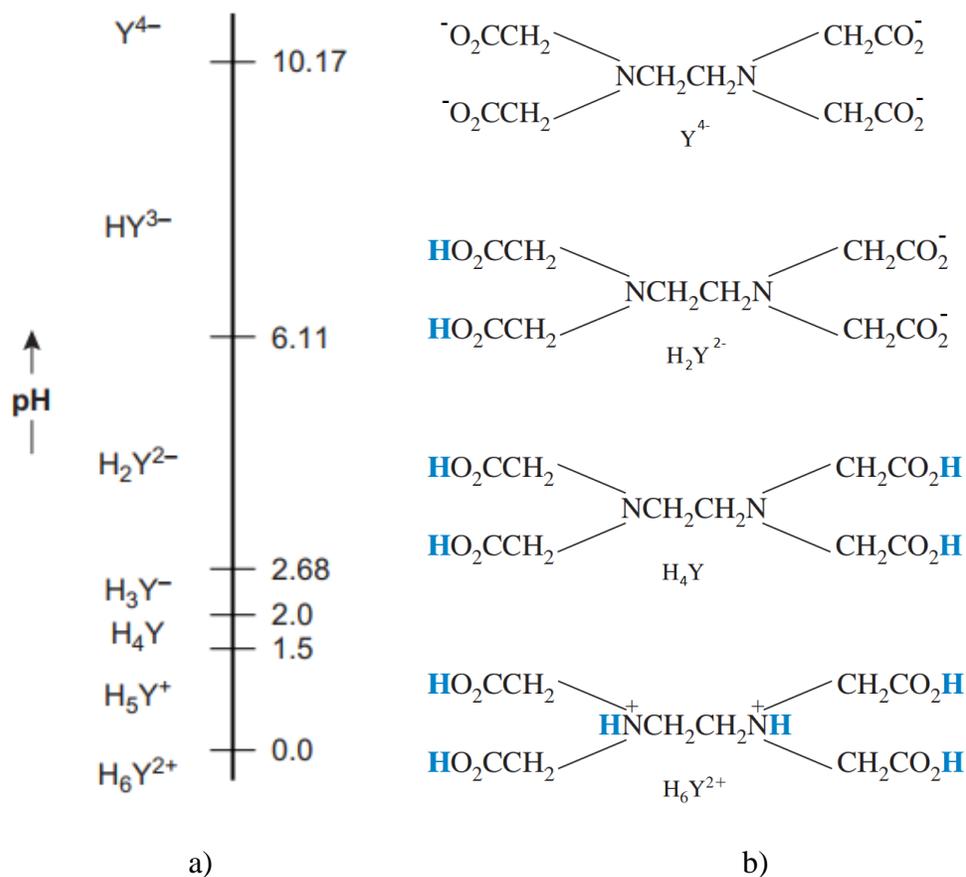


Ilustración 2-18 a) Diagrama de laso, Dependencia del pH y la ionización del EDTA (Y). Adaptado de Harris (2007). **b)** especies ionizadas de EDTA: H_6Y^{2+} , H_4Y , H_2Y^{2-} , y Y^{4-} (No se incluyeron las formas H_5Y^+ , H_3Y^- , y HY^{3-}).

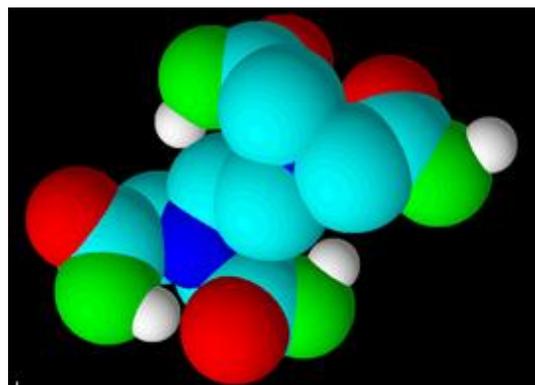
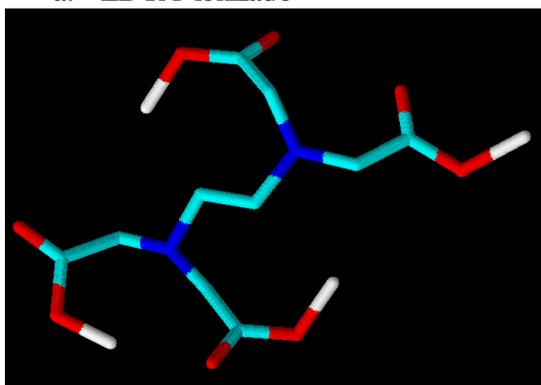
2.3.4.2 Modelos Moleculares.

En el cuadro 2-12 se presentan los modelos tridimensionales de los posibles complejos EDTA-Ca. Estos modelos fueron elaborados con el software *ChemSketch V10.0 de ADC labs*, este programa permite la optimización espacial de las moléculas de acuerdo con su carga eléctrica y radio iónico con el método de parametrización CHARMM (Brooks, B. R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., 1983), de manera que estos modelos son una representación a escala y geometría de las moléculas de los complejos. Las imágenes de las vistas en 3D se obtuvieron usando el software *3D Viewer V10.0* también de *ADC labs*.

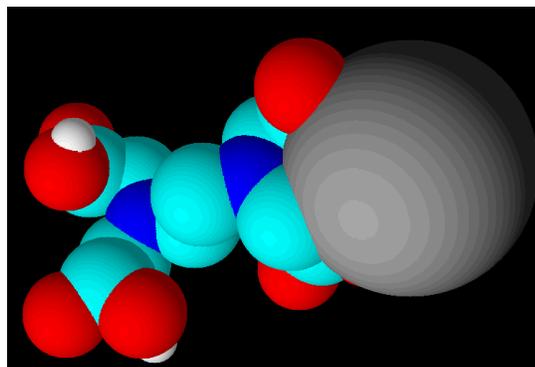
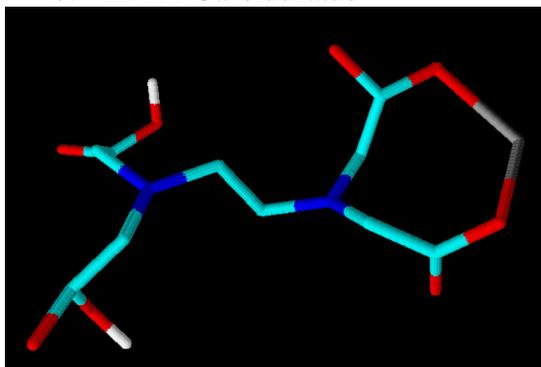
Complejos de EDTA-Ca.

Cuadro 2-12 Estructuras tridimensionales tubulares o de enlace (izquierda) y espaciales (derecha) de los complejos de EDTA-Ca.

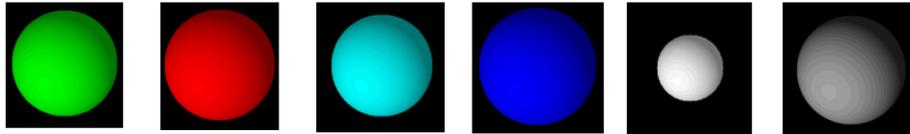
a. EDTA ionizado



b. EDTA-Ca bidentado



Descripción:



Oxígeno
ácido

Oxígeno

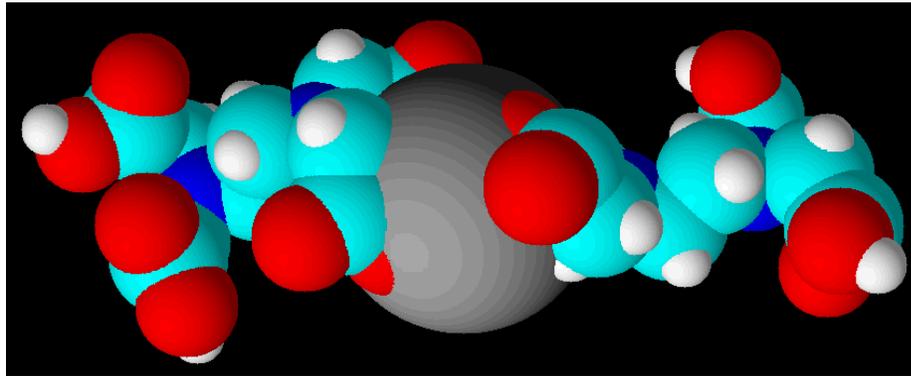
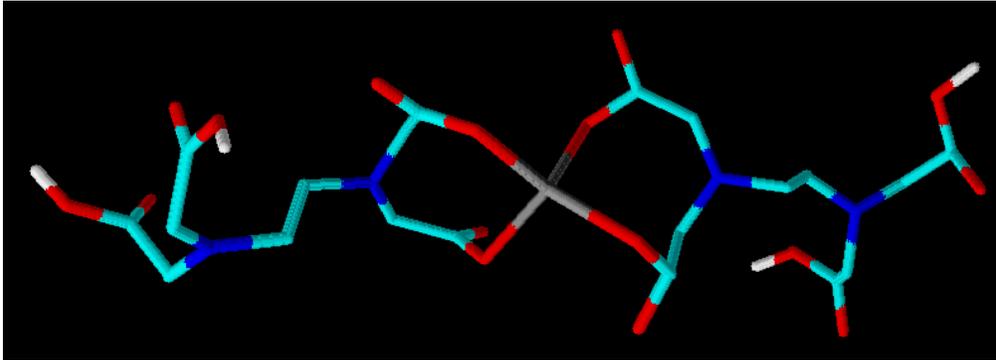
Carbono

Nitrógeno

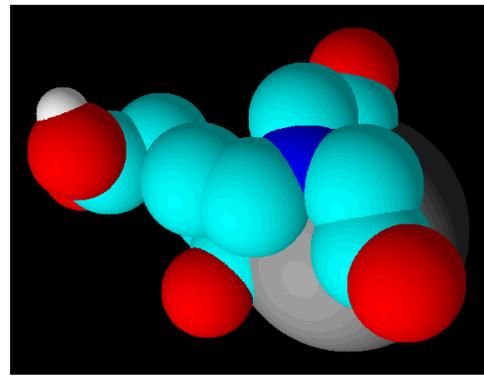
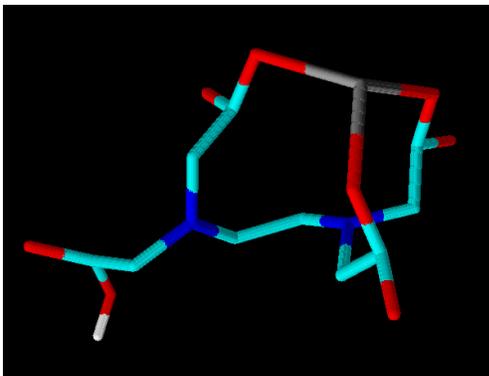
Hidrogeno

Calcio

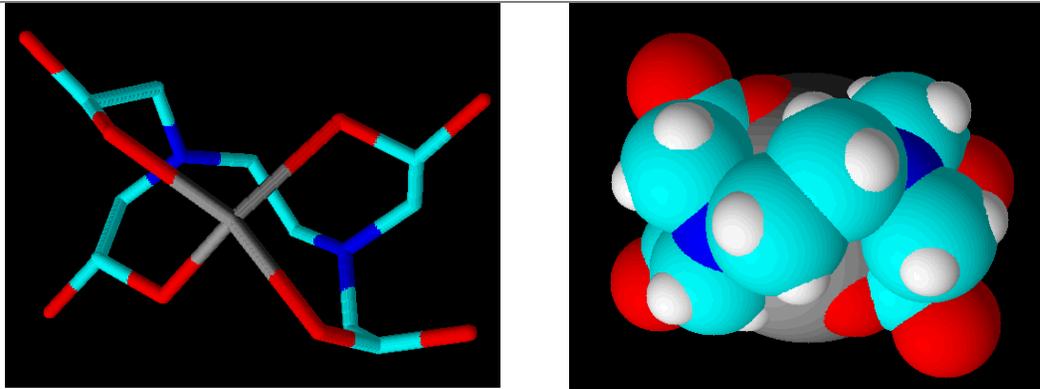
c. 2EDTA-Ca bidentado



d. EDTA-Ca tridentado



e. EDTA-Ca tetradentado



La molécula de EDTA tiene diversas formas de interactuar con cationes metálicos como el calcio, puede envolverlo completamente como en sus formas tetradentadas (tetracoordinado, 4 enlaces coordinados O-Ca, o hexacoordinado, 4 enlaces coordinados O-Ca y 2 enlaces coordinados N-Ca). Pasando por estructuras contorsionadas como la forma EDTA-Ca tridentada, y las formas bidentadas EDTA-Ca y 2EDTA-Ca, con las cuales podrían formarse cadenas EDTA-Ca si se suman parejas bidentadas (ilustración 2-19). Al ascender a este nivel de complejidad del sistema reaccionante, resulta evidente la poca aplicabilidad de los modelos cinéticos simplificados y la necesidad de desarrollar modelos cinéticos dinámicos para la simulación de estos sistemas reaccionantes, como el trabajo que adelantan el *Institute of Medical Research Walter+Eliza Hall* en temas biológicos (WEHI, 2019).

En el cuadro 2-12 se señalan en color verde los oxígenos responsables de la actividad ácida química en el EDTA, correspondientes a los 4 grupos carboxilo COOH, el oxígeno reactivo pertenece al subgrupo funcional hidroxilo OH.

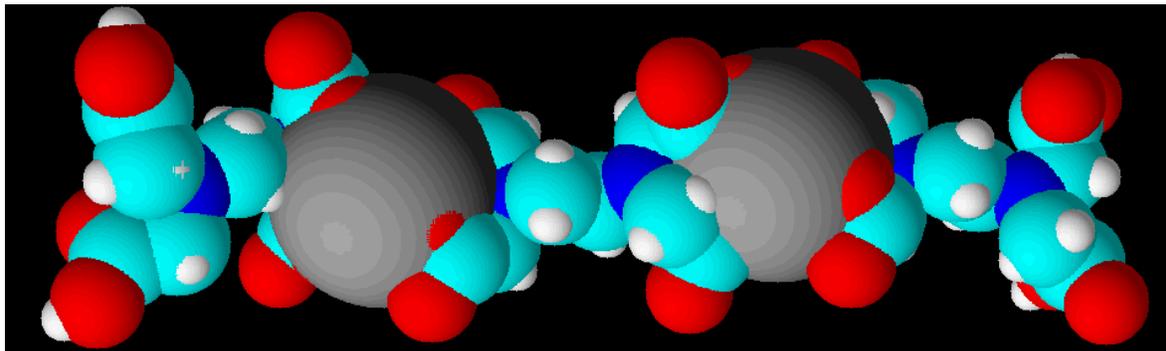


Ilustración 2-19 Cadena EDTA-Ca bidentado.

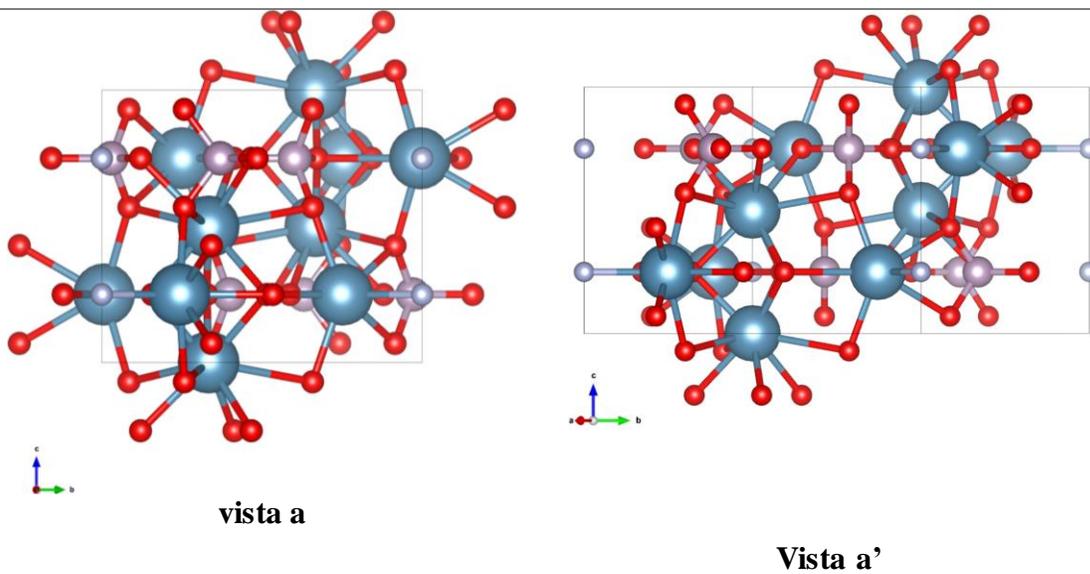
Cristales de Fluorapatita.

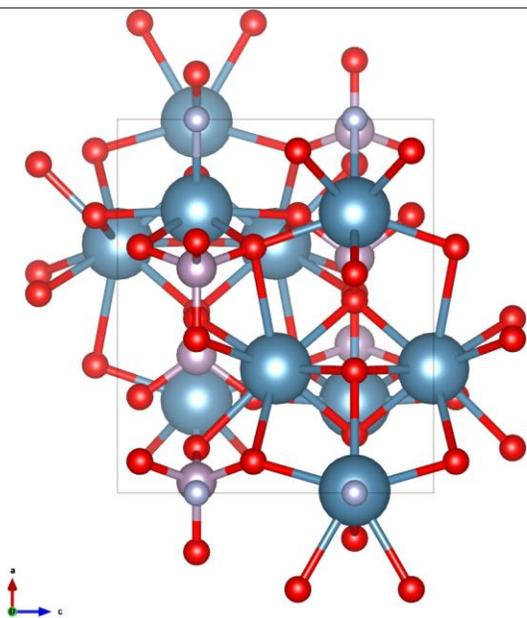
La apatita es un mineral cristalino, la composición de una celda unitaria de hidroxiapatita es $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$, “no es una fórmula molecular”, pues no es una molécula. El tamaño de los cristales de apatita es variable y puede ir desde unas pocas celdas hasta miles y millones

y su composición es variable, debido a que en general los cristales acumulan defectos en su crecimiento.

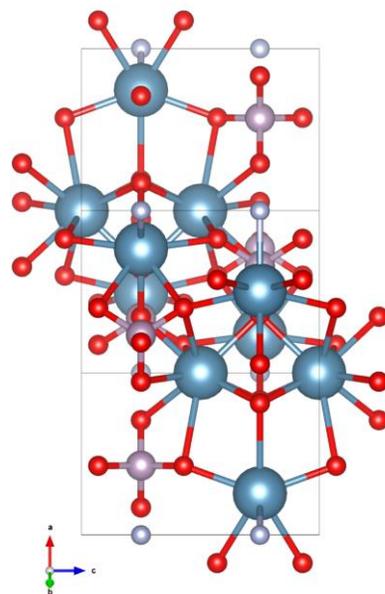
La reacción de disolución es de tipo heterogénea sólido-líquido catalizada por ácido, dentro de los factores más importantes en el proceso de disolución de la apatita, el tamaño de partícula es tal vez el más importante, pues dependiendo del área específica disponible para reaccionar químicamente el ligando podrá acceder a los cationes metálicos, asimismo para acceder a las cavidades propias del entramado cristalino. Otros factores incluyen el pH, la temperatura, la difusividad (mezclado). Además, las condiciones de pH en ambas fases deben optimizarse, pues la activación de la roca es favorable a bajo pH, mientras que la estabilidad del complejo tetradentado EDTA-Ca es más estable a alto pH.

A continuación, se presentan diferentes vistas en tres dimensiones del modelo de celda unitaria reportado por Hugues (1989) para la fluorapatita (Ilustración 2-20). Con respecto a las interacciones atómicas presentes se diferencian los átomos presentes en la celda unitaria; estos modelos fueron obtenidos en el software Vesta (Momma & Izumi, 2011).

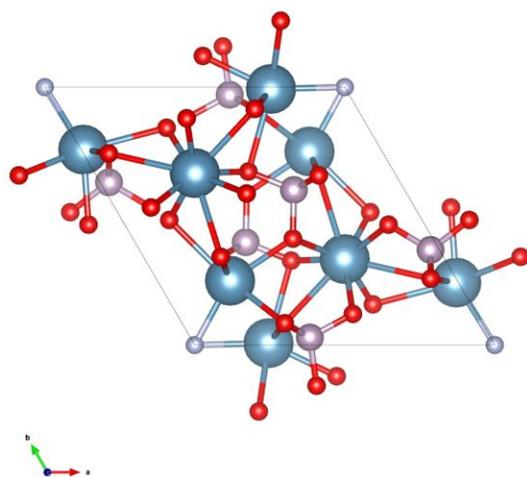




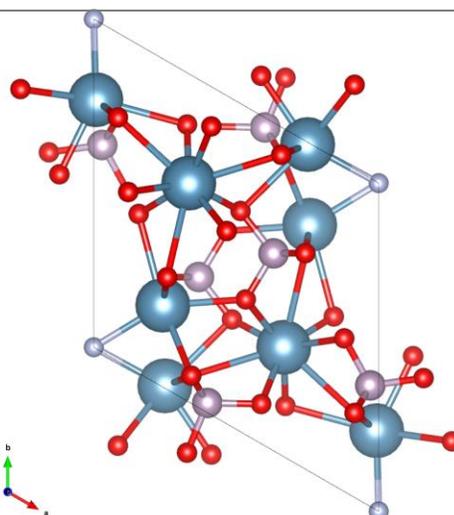
Vista b



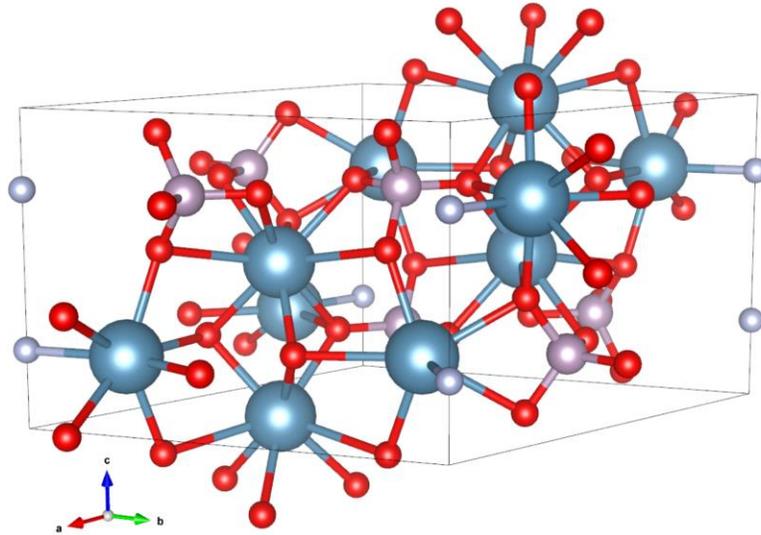
Vista b'



vista c



Vista c'



Vista en perspectiva.

Ilustración 2-20 Vistas de una celda unitaria de fluorapatita. Modelo reportado por Huges (1989), visualizado en el software Vesta (Mamma & Izumi, 2011).

El proceso de solubilización de la roca fosfórica involucra una serie de reacciones químicas, algunos de los procesos posiblemente simultáneos. A continuación, se propone el proceso para la disolución de la RF tomando como base un cristalito de $2 \times 2 \times 3$ celdas unitarias de hidroxiapatita (ilustración 2-21) el cual es expuesto por la cara superior a una disolución de ligando (EDTA) en un medio ácido.

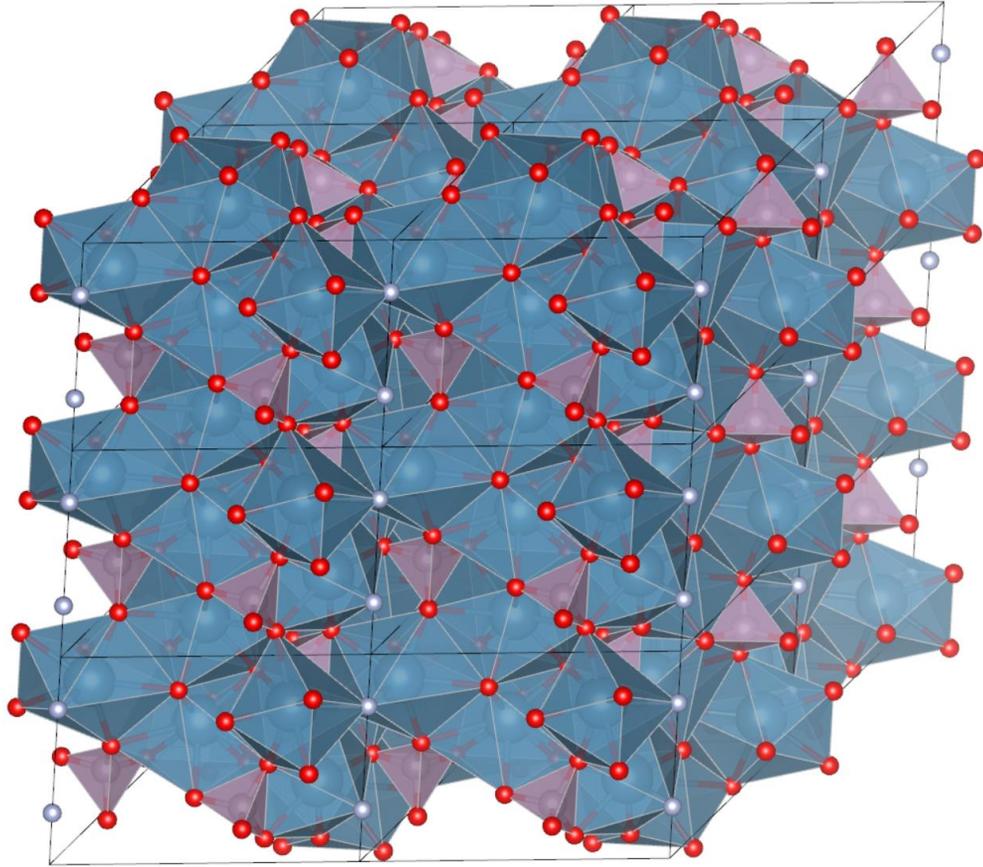


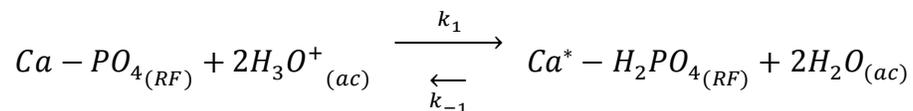
Ilustración 2-21 Cristal de fluorapatita compuesto por 2x2x3 celdas unitarias. Construido en el software Vesta a partir del modelo de celda unitaria reportada por Hugues (1989).

2.3.4.3 Mecanismo de reacción propuesto.

Se propone el siguiente mecanismo de reacción, a partir de los eventos observados y el estudio de las especies químicas realizado, con el propósito de ofrecer un acercamiento conceptual al fenómeno de solubilización, consistente de 3 etapas:

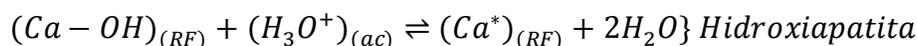
Etapa 1. Protonación del grupo PO_4 en sus oxígenos externos al cristal.

El medio ácido proporcionado por los grupos carboxilos del EDTA provee cationes para la formación de enlaces coordinados O-H con los oxígenos de los grupos PO_4 en la superficie del cristalito. Este proceso modifica la acción eléctrica ejercida por estos oxígenos sobre los calcio adyacentes, activando el carácter catiónico de los átomos de calcio al exterior del cristalito. Esta reacción es reversible y favorable a pH ácidos.



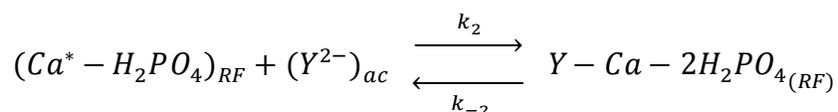
Etapa 1.1

Asimismo, los grupos externos OH en la hidroxiapatita, o el F en la fluorapatita reaccionarían fácilmente en medio ácido.



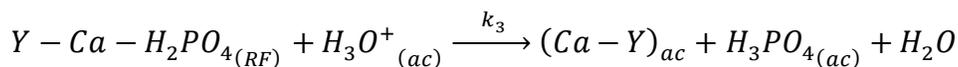
Etapa 2. Ataque electrofílico por parte de los grupos carboxilo del EDTA.

Los aniones de EDTA se adhieren a los cationes calcio activos en la superficie. Esta etapa también se considera reversible y probablemente limitante pues depende del grado de activación del medio ácido y de la disponibilidad espacial para que el ligando consiga adherirse al catión activado.



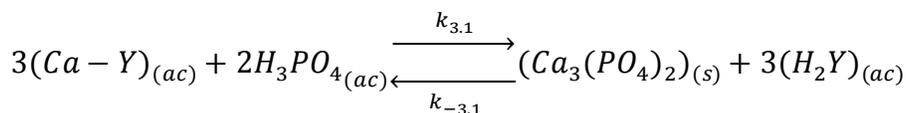
Etapa 3. Liberación del fosfato y formación del complejo Ca-EDTA.

En esta etapa ocurre una reorganización electrónica en la cual el ligando de EDTA adherido al calcio en la superficie del cristal de RF consigue secuestrar un catión calcio hacia la fase acuosa, y simultáneamente se libera (disuelve) el fósforo en forma de anión fosfato en la disolución acuosa. Esta etapa se considera irreversible, pues en la reacción inversa el calcio y el fosfato no regresan a la RF, sino que precipitan en forma de fosfato de calcio, a continuación, se propone la reacción. Para mantener la estequiometría de la reacción se presenta la especie H_3PO_4 como forma equivalente de fosfato soluble.



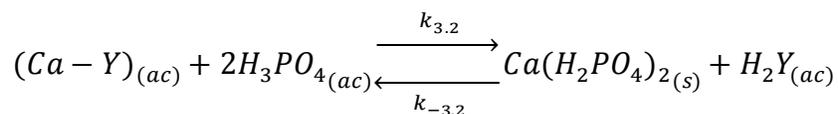
Reacción 3.1 Reacción inversa. Precipitación del fosfato.

El complejo Ca-Y es inestable en condiciones ácidas y se disocia dejando libres cationes calcio Ca^{2+} los cuales compiten por los grupos fosfato presentes en disolución. Si las condiciones favorecen la reacción inversa el fósforo precipitará en forma de fosfato de calcio. Esta reacción se considera reversible y altamente dependiente del pH, pues la estabilidad del complejo está ligada a este parámetro.



Reacción 3.2 Formación de superfosfato soluble.

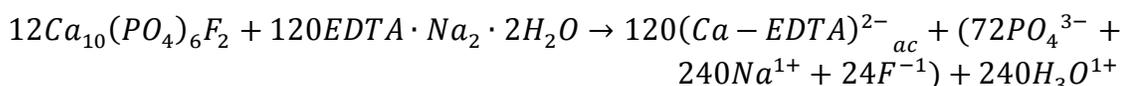
Si la concentración de hidronios es suficiente (medio ácido fuerte) se forma dihidrogenofosfato de calcio, mejor conocido como superfosfato. Esta reacción competiría con la reacción 3.1 y pone en manifiesto la necesidad de evaluar la mejor ruta para mantener el fosfato en disolución.



La estequiometría señala que por cada 5 complejos $Ca - Y$ formados se disuelven 3 grupos PO_4 . Esto se justifica en el hecho de que los cationes calcio están ligados de manera múltiple a grupos fosfato, en una proporción 10 a 5 para una celda unitaria.

Balance másico.

Para la disolución total del cristalito de fluorapatita $2 \times 2 \times 3$ celdas unitarias, se tiene



Teniendo en cuenta que la especie $12Ca_{10}(PO_4)_6F_2$ representa en esencia una sola unidad (ver Ilustración 2.21) esta reacción avanza superficialmente (por capas) y depende de la superficie expuesta (desde 1 cara hasta las 6 caras expuestas) y requiere los ingredientes y las condiciones mencionadas al proponer este mecanismo, de manera que su avance puede o no darse dependiendo de las condiciones de reacción dadas. Sin embargo, también es claro que en principio debe poder disolverse completamente el cristalito de fluorapatita.

Mas allá de la complejidad que supone esta reacción, los resultados obtenidos pueden asemejarse a líneas rectas con pendiente creciente. Se diferencian dos etapas, una rápida, en los primeros dos minutos de reacción, en la cual aparentemente se avizora un progresiva y eficiente disolución, luego en los minutos siguientes esta velocidad disminuye notablemente, esta etapa es lenta, pero mantiene su avance durante el periodo de tiempo observado, el cual es favorable para cierto rango de concentraciones de EDTA (ilustración 2.22). Sin embargo, en afán de buscar encasillar la cinética de reacción bajo modelos enormemente simplificados y con un propósito poco práctico, pues difícilmente pueden generalizarse a otros casos, es interesante analizar estos resultados y buscar medios para optimizar la velocidad de reacción. Para esto es necesario más pruebas experimentales controlando más variables que permitan identificar esos factores que dan mejores

resultados para la RF en cuestión, pues su comportamiento puede variar enormemente dependiendo de su origen y procedencia. De todas formas, aplicar un modelo cinético que solo cumpla con adaptarse a unos puntos en un diagrama, nada puede aportar al entendimiento de la reacción.

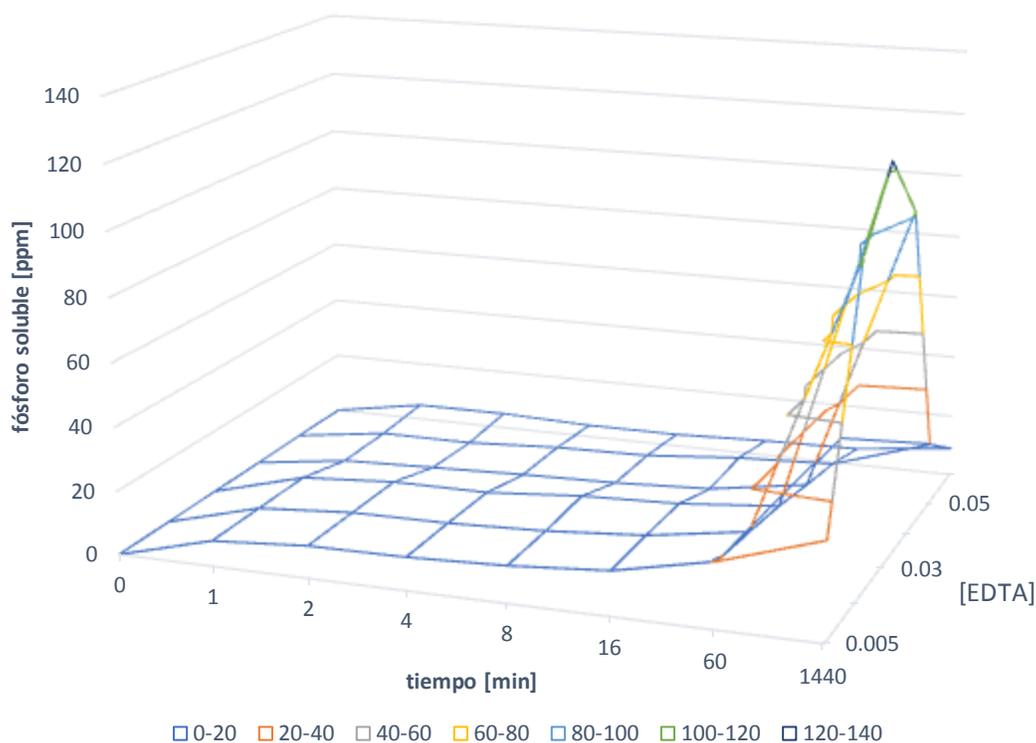


Ilustración 2-22 gráfico de superficie que correlaciona el tiempo, la concentración de ligando [EDTA] y el fósforo obtenido en fase acuosa en ppm.

2.4 Conclusiones.

Para el periodo de reacción evaluado se encontró que para concentraciones de 0.015 y 0.03M la disolución de fosfatos fue significativamente superior a las demás concentraciones, y que para concentraciones por debajo de 0.01M y superiores a 0.05M la disolución de fosfatos tiende a cero. Esto significa que para las condiciones de reacción dadas existe un rango óptimo para la disolución de fosfatos.

A partir del análisis conceptual del sistema reaccionante y sus componentes, se propuso un modelo cinético, el cual debe observarse desde una perspectiva didáctica; sin embargo, en el ejercicio de este análisis se consiguió comprender un poco mejor el proceso de solubilización de la RF y de algunos de los parámetros que en este influyen.

2.5 Recomendaciones.

La solubilización parcial de la RF con EDTA disódico representa una alternativa al proceso convencional de acidulación parcial con ácido sulfúrico, aunque solo se alcance valores del 17% de la disolución alcanzada con este. Sin embargo, su aplicación a bajas concentraciones y la seguridad del proceso frente al uso de ácido sulfúrico concentrado lo hacen atractivo, y podría evaluarse su aplicación directamente en suelos. Por lo anterior, se recomienda realizar pruebas de campo y determinar la eficiencia agronómica alcanzada con RF tratada con EDTA disódico. En suelos ácidos, por ejemplo, es posible que el carácter ácido del suelo promueva una mayor solubilización. Se debe profundizar en este tema con precaución, pues se ha advertido afectación ambiental por la persistencia del EDTA en el ambiente, que por procesos de infiltración y escorrentía pueden alcanzar cuerpos de agua, también, puede acumularse en el suelo y en las plantas, y posee la capacidad de movilizar metales pesados.

De acuerdo con el mecanismo de reacción abordado, para un trabajo posterior se propone tratar la RF con acción intercalada de solución ácida y de solución de ligando (por ejemplo, EDTA, ácido cítrico, o ácido oxálico). Los lavados con ácido promueven la movilización de los cationes calcio fuertemente ligados mediante enlaces coordinados con los oxígenos de los grupos PO_4 , luego al lavar con una solución de ligando secuestraría los cationes Ca y se liberaría a su vez el anión PO_4 a la fase acuosa. El pH debe mantenerse bajo para mantener activados los átomos de calcio superficiales, pero esto hace inestable el complejo formado, por esto se debe mantener baja la concentración de EDTA. En principio se debería solubilizar la totalidad de mineral de apatito presente con el tiempo suficiente y una concentración de ligando (EDTA) disponible para secuestrar los cationes enlazados a los grupos fosfato. Si se brindan las condiciones adecuadas de reacción.

2.6 Referencias

- Ajiboye, B., Akinremi, O. O., Hu, Y., & Jürgensen, A. (2008). XANES Speciation of Phosphorus in Organically Amended and Fertilized Vertisol and Mollisol. *Soil Science Society of America Journal*, 72(5), 1256. <https://doi.org/10.2136/sssaj2007.0078>
- Besoain, M; Sepulveda, W; Molina, M. (1999). Caracterización Mineralógica y Química de Rocas Fosfóricas Chilenas. *Serie Carillanca* (No 29), 55-77
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. A., & Karplus, M. (1983). CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of computational chemistry*, 4(2), 187-217.
- Correa, J. C., Iral, R., & Rojas, L. (Junio de 2006). Estudio de potencia de pruebas de homogeneidad de varianza. *Revista Colombiana de Estadística*, 29(1), 57-76.
- Degryse, F., Ajiboye, B., Armstrong, R. D., & McLaughlin, M. J. (2013). Sequestration of phosphorus-binding cations by complexing compounds is not a viable mechanism to increase phosphorus efficiency. *Soil Science Society of America Journal*, 77(6), 2050–2059. <https://doi.org/10.2136/sssaj2013.05.0165>
- EDAX. (2003). *Genesis Spectrum User's Manual*.
- Elouear, Z., Bouzid, J., Boujelben, N., Feki, M., Jamoussi, F., & Montiel, A. (2008). Heavy metal removal from aqueous solutions by activated phosphate rock. *Journal of Hazardous Materials*, 156(1–3), 412–420. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.036>
- FAO. (2007). Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. *Boletín FAO Fertilizantes y Nutrición Vegetal* (Vol. 13). Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-y5053s.pdf>
- Frossard, E., Condron, L. M., Oberson, A., Sinaj, S., & Fardeau, J. C. (2000). Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of Environment Quality*, 29(1), 15–23. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900010003x>
- Harris, D. C., Navarro, V. B., & Murcia, Á. B. (2007). *Análisis químico cuantitativo*.
- Harvey, D. (2000). *Modern analytical chemistry*. Boston: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Hughes, J. M., Cameron, M., & Crowley, K. D. (1989). Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites. *American Mineralogist*, 74(7-8), 870-876.
- Jianbo, S., Lixing, Y., Junling, Zhang, Haigang, L., Zhaohai, B., Xiping, Chen, Weifeng, Z., & Fusuo, Z. (2011). Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology*, 156(3), 997–1005. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>

- JEOL. (2019). Energy table for EDS analysis. Recuperado 29 de abril de 2019, de <https://studylib.net/doc/8126264/energy-table-for-eds-analysis>
- K. Momma and F. Izumi, "VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data," *J. Appl. Crystallogr.*, 44, 1272-1276 (2011).
- Kalashnikov, A. O., Yakovenchuk, V. N., Pakhomovsky, Y. A., Bazai, A. V., Sokharev, V. A., Konopleva, N. G., ... & Ivanyuk, G. Y. (2016). Scandium of the Kovdor baddeleyite–apatite–magnetite deposit (Murmansk Region, Russia): Mineralogy, spatial distribution, and potential resource. *Ore Geology Reviews*, 72, 532-537.
- Kar, G., Peak, D., & Schoenau, J. J. (2012). Spatial distribution and chemical speciation of soil phosphorus in a band application. *Soil Science Society of America Journal*, 76, 2297–2306. <https://doi.org/10.2136/sssaj2012.0146>
- Kizewski, F., Liu, Y.-T., Morris, A., & Hesterberg, D. (2011). Spectroscopic Approaches for Phosphorus Speciation in Soils and Other Environmental Systems. *Journal of Environmental Quality*, 40(3), 751. <https://doi.org/10.2134/jeq2010.0169>
- Lesage, E., Meers, E., Vervaeke, P., Lamsal, S., Hopgood, M., Tack, F., & Verloo, M. (2005). Enhanced phytoextraction: ii. effect of edta and citric acid on heavy metals. *International Journal of Phytoremediation*, 7, 143–152.
- Li, H., Liu, J., Li, G., Shen, J., Bergström, L., & Zhang, F. (2015). Past, present, and future use of phosphorus in Chinese agriculture and its influence on phosphorus losses. *Ambio*, 44(2), 274–285. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0633-0>
- Mathworks. (2019a). Kruskal-Wallis test - MATLAB kruskalwallis. Recuperado 2 de abril de 2019, de <https://www.mathworks.com/help/stats/kruskalwallis.html#btv4oqy-6>
- Mathworks. (2019b). Multiple comparison test - MATLAB multcompare. Recuperado 2 de abril de 2019, de https://www.mathworks.com/help/stats/multcompare.html?searchHighlight=multcompare&s_tid=doc_srchtile
- Mathworks. (2019c). Multiple-sample tests for equal variances - MATLAB vartestn. Recuperado 2 de abril de 2019, de <https://www.mathworks.com/help/stats/vartestn.html#btuo1pv>
- Mathworks. (2019d). One-way analysis of variance - MATLAB anova1. Recuperado 2 de abril de 2019, de <https://www.mathworks.com/help/stats/anova1.html>
- Morillo, A., Sequera, O., & Ramírez, R. (2007). Roca fosfórica acidulada como fuente de fósforo en un suelo ácido con o sin encalado. *Bioagro*, 19(3).
- Ngwack, B., & Sigg, L. (1997). Dissolution of Fe (III)(hydr) oxides by metal-EDTA complexes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(5), 951-963.

- Norvell, W. A., & Lindsay, W. L. (1969). Reactions of EDTA Complexes of Fe, Zn, Mn, and Cu with Soils 1. *Soil Science Society of America Journal*, 33(1), 86-91.
- Ostrooumov, M., Fritsch, E., Lasnier, B., & Lefrant, S. (2004, September). Infrared reflection spectrometry of minerals and gemstones. In *8th International Congress on Applied Mineralogy*. Aguas de Lindoia, Sao Paulo (Brazil).
- Ostrooumov, M. (2006). Avances recientes de espectrometría Infrarroja en la Mineralogía Avanzada. *Boletín de Mineralogía*, 17(1), 97-107.
- Schaider, L. A., Parker, D. R., & Sedlak, D. L. (2006). Uptake of EDTA-complexed Pb, Cd and Fe by solution-and sand-cultured Brassica juncea. *Plant and Soil*, 286(1-2), 377-391.
- Stutter, M. I., Shand, C. A., George, T. S., Blackwell, M. S. A., Bol, R., MacKay, R. L., ... Haygarth, P. M. (2012). Recovering phosphorus from soil: A root solution? *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es2044745>
- Sun, B., Zhao, F. J., Lombi, E., & McGrath, S. P. (2001). Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA. *Environmental pollution*, 113(2), 111-120.
- Tsang, D. C., Zhang, W., & Lo, I. M. (2007). Copper extraction effectiveness and soil dissolution issues of EDTA-flushing of artificially contaminated soils. *Chemosphere*, 68(2), 234-243.
- Turner, B. L., Mahieu, N., & Condrón, L. M. (2003). Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments of Phosphorus Compounds in Soil NaOH-EDTA Extracts. *Soil Science Society of America Journal*, 67(2), 497-510.
- Trujillo, A. T., Gómez, V. H. P., Cárdenas, E. M., Dussan, A. M., & Herrera, C. H. B. (2017). Oportunidades para el departamento del Huila en el mercado de fertilizantes. *Revista RETO: Revista Especializada en Tecnologías Transversales de la Organización*, 3(3), 93-104.
- Wang, Z. Y., Kelly, J. M., & Kovar, J. L. (2004). In Situ Dynamics of Phosphorus in the Rhizosphere Solution of Five Species. *Journal of Environment Quality*, 33(4), 1387.
- WEHI. (2019). Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research | Discoveries for humanity. Recuperado 23 de abril de 2019, de <https://www.wehi.edu.au/>
- Zapata, F., & Roy, R. N. (Eds.). (2007). Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. Roma, Italia: FAO.

Capítulo 3. Evaluación de la solubilidad del fósforo de la roca fosfórica del Huila, tratadas con vinazas de pulpa de café inoculadas con los hongos de las especies *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*

Resumen

Muestras de roca fosfórica obtenidas del municipio de Aipe (Huila) se trataron durante 6 semanas con vinazas de pulpa de café (*Coffea arábica*) e inóculos de *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* Los hongos fueron obtenidos en Agar Papa Dextrosa (PDA), y aislados e identificados en Agar Extracto de Malta (MEA) de acuerdo con métodos estándar de identificación morfológica. Se encontró que el *Aspergillus niger* se adaptó mejor y mostró mayor crecimiento micelial en las vinazas, (con pH inicial 4.0); además se logró mayor obtención de fosfatos disueltos en fase acuosa en comparación con *Penicillium sp.*; también se encontró que en conjunto las especies de hongos alcanzaron la mayor obtención de fosfatos (hasta un 32.22% del fosfato soluble en H_2SO_4 40%v/v). Los resultados encontrados se proponen, desde una perspectiva ambiental de agricultura orgánica, como una alternativa a los tratamientos de acidulación convencional de la roca fosfórica con ácido sulfúrico, usando fuentes naturales y residuos agroindustriales como la pulpa del café.

Palabras clave: Biofertilizantes, remediación de suelos, bio-acidulación.

Evaluation of phosphate solubilization from Huila Phosphoric Rock with treatments made with coffee pulp lixiviates inoculated with *Aspergillus niger* and *Penicillium sp* fungus species.

Abstract

Different treatments prepared with coffee (*Coffea arabica*) pulp lixiviates inoculated with *Aspergillus niger* and *penicillium sp* were applied for 6 weeks to several samples of phosphoric rock obtained from Aipe (Huila). The fungus species were obtained from environmental media on PDA culture, then isolated and identified on MEA culture, in according to standard morphologic identification methods. It was found that *Aspergillus niger* species shows better mycelial growth than *Penicillium sp* on coffee pulp lixiviates (initially at pH 4.0), also fungus species got better soluble phosphate concentrations working together (up to 32.22% of total phosphate soluble on H_2SO_4 40%vol). Results are proposed, from an organic perspective, as an alternative to conventional acidulation of phosphoric rock with sulfuric acid, and reuse of coffee pulp agroindustry residue.

Keywords: Biofertilizer, soil remediation, bio-acidulation.

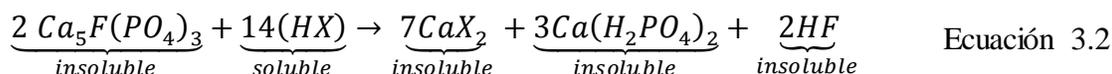
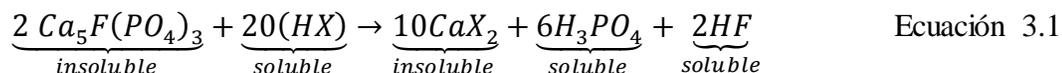
3.1 Introducción.

Se ha encontrado que, dentro de su ciclo metabólico, los microorganismos segregan una gran variedad de metabolitos, muchos de los cuales se han identificado como ácidos solubilizadores de fósforo MSP (Posso & De Prager, 2017; Rashid y otros., 2004), los cuales actúan como ligandos capaces de secuestrar los cationes enlazados a los grupos fosfato; por ejemplo los ácidos D-málico, D-láctico, L-málico, L-láctico, acético, cítrico, oxálico, glucónico, entre otros (Cunningham & Kuyack, 1992; Iyyappan y otros, 2018; Li y otros, 2016). Todas estas sustancias juegan roles en la dinámica de la rizósfera e influyen conjuntamente en la solubilización de fosfatos (Wakelin y otros, 2004). En esta dirección, se han identificado que variedades de los hongos *Aspergillus niger* y *Penicillium sp* son potencialmente utilizables como MSP en procesos industriales (Yin y otros, 2015; Valenzuela, Barrera, & Pinochet, 2002; Peterson y otros, 2005; Mendes y otros; 2015). Estos hongos son especies ubicuas en el ambiente natural, característicos de los suelos colombianos (Peérez, de la Ossa, & Montes, 2000) y están presentes en una gran variedad alrededor del mundo. Estos hongos poseen la cualidad de soportar condiciones ambientales y sustratos difíciles para otras especies, lo cual implica que poseen mecanismos adaptativos para alimentarse de fuentes no convencionales de nutrientes, y que generan sustancias especializadas capaces de realizar estos procesos metabólicos (Kaur & Reddy, 2017).

En este tema, diferentes trabajos en biorremediación se han avanzado en el campo colombiano (M. E. Beltrán Pineda, 2014; Pineda, 2015), biofertilización (FAO, 2007; González Chávez & Ferrera-Cerrato, 2000; Perez, C y otros., 2012); asimismo, en el mundo se orienta el avance científico hacia el desarrollo de nuevas tecnologías que faciliten la agroindustria (Zapata y Roy, 2007). En este caso, con uso intensivo de microorganismos para promover la fertilización con roca fosfórica. Por ello, en el presente trabajo se usó las especies *Aspergillus niger* y *Penicillium sp* en la formulación, aplicación y evaluación de tratamientos que permitan solubilizar los fosfatos de muestras de roca fosfórica del Huila, tomadas de la mina Media Luna en el Municipio de Aipe departamento del Huila (Colombia), uno de los lugares en dónde se extrae la mayor cantidad de roca fosfórica de la región. El tratamiento se realizó en medio acuoso, con aireación, y se usó muestras acondicionadas de pulpa de café (*Coffea arábica*) como sustrato seleccionado por su contenido de carbohidratos y nutrientes esenciales (Pierre y otros, 2009; Puerta y Rios, 2014; Serrat y otros, 2018). Se espera que, la actividad metabólica y el crecimiento de las poblaciones de hongos genere metabolitos capaces de llevar a cabo este proceso.

Aunque se ha estudiado e identificado diferentes mecanismos bioquímicos para la solubilización de fosfato usando microorganismos como *Aspergillus niger* y el *Penicillium sp* (Osorno Bedoya, 2013), se considera que el principal, es por la formación de complejos en formas de citratos y oxalatos de calcio, ya que el ácido oxálico y el ácido cítrico (Lesage y otros., 2005; Visage y otros., 2014b) son metabolitos secundarios producidos por estos (Posso & De Prager, 2017) . A continuación, se presenta las reacciones de solubilización ((Ivanova, Bojinova, Gruncharov, & Damgaliev, 2006)):

Reacciones de solubilización:



Donde HX puede ser

- ácido cítrico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ó
- ácido oxálico $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$

Los compuestos formados CaX_2 , son quelatos de calcio (citrato de calcio y oxalato de calcio) poco solubles en agua, también se forma difosfato de calcio como producto intermedio, poco soluble, la concentración del ácido es baja; y el ácido fosfórico (H_3PO_4) que es la especie soluble en agua a partir de la cual se obtienen los iones fosfato en la fase acuosa. En estos procesos el ion fosfato pasa de una forma insoluble a una soluble al ser liberado de los enlaces con el ion calcio, por la acción quelante de los ácidos cítrico y/o oxálico (Mai y otros, 2016; Cunningham, 1992).

El poder de los ácidos formadores de complejos (quelatos) reside en la acción conjunta de los oxígenos (más electronegativos), sobre el catión calcio, de manera que se logra aislar desde los compuestos insolubles como los encontrados en la apatita, por la acción de varias moléculas o por el efecto doble (de araña) de la molécula, la cual se dobla para alcanzar el catión calcio, formándose estructuras cíclicas (Harvey, 2000), (ver Ilustraciones 3-1 y 3-2).

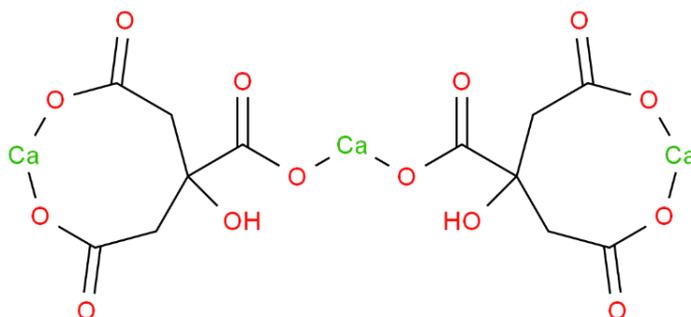


Ilustración 3-1 Quelato de Citrato de calcio.

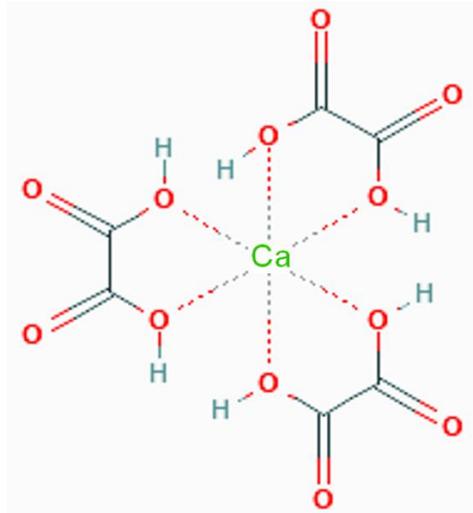
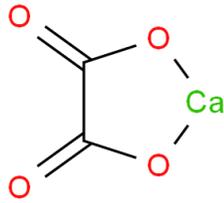


Ilustración 3-2 Quelatos de Oxalato de calcio.

3.2 Materiales y Métodos.

3.2.1 Preparación de las muestras.

Roca Fosfórica: Las muestras de roca fosfórica molida se recolectaron de la mina Media Luna del municipio de Aipe, Huila, con coordenadas N:863.180, E:860.431, a 20 km de la cabecera municipal. Las muestras fueron tamizadas en el laboratorio a fracciones de diámetros de partícula entre 125–500 μ m.

Sustrato de pulpa de café (Vinazas): Se usó la pulpa de café fresca de la zona rural del Municipio de San Agustín del departamento del Huila con coordenadas: 1°54'02.8"N – 76°17'07.8"W, finca cafetera Villa Naty. Las muestras fueron recolectadas inmediatamente después del proceso de despulpado, parte beneficio del café en el cual la pulpa generalmente se descarta como residuo (Rodríguez & Zambrano, 2010); luego se almacenaron bajo refrigeración y se trasladaron al municipio de Neiva. Luego, las pulpas se licuaron con adición de agua destilada en una licuadora convencional y se separó la parte gruesa en un colador, luego se esterilizaron en una autoclave (*All American* modelo NO75X – en el laboratorio de investigación de química de CORHUILA) durante 20 min, (120 – 127)°C y (1.0 – 1.5)bar. No se agregó ningún tipo de nutriente adicional. En adelante se referirá a esta preparación como vinazas (Ilustración 3-3), por su riqueza en azúcares fermentables y su fácil biodegradación por microorganismos. El pH medido en la vinaza fue de 4.0, el cual no fue modificado para la siembra de los inóculos.



Ilustración 3-3 Aspecto de las vinazas preparadas.

3.2.2 *Obtención, Identificación y cultivo de colonias de *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.**

3.2.2.1 *Aislamiento de los hongos al ambiente.*

Se prepararon 20cm^3 de agar papa dextrosa PDA, (por sus siglas en inglés- Potato Dextrose Agar) y se vertieron en cajas Petri de 90mm . Luego, las cajas se expusieron al ambiente durante *30 minutos* para cosechar los microorganismos ambientales presentes. La captura de los hongos se hizo en el municipio de Neiva-Huila, ciudad con clima tropical cálido, y temperaturas día promedio de 28°C . Posteriormente, se sellaron las cajas Petri y se llevaron a incubación, en oscuridad, durante *7 días*, a una temperatura promedio de 27°C . Pasado este tiempo, se seleccionaron las cajas Petri con mayor crecimiento de los hongos, y en las cuales, por observación de sus características macroscópicas se identificaron posibles colonias de *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* Luego, en condiciones asépticas y con ambiente controlado, en una cabina de flujo laminar, se hizo la siembra de colonias de especies individuales a partir de los cultivos previamente obtenidos e identificados en Agar Extracto de Malta (MEA). Posteriormente se hizo la identificación microscópica de las especies mediante la comparación de sus características morfológicas, utilizando imágenes y medidas de referencia de las especies seleccionadas; este procedimiento se hizo en las instalaciones del laboratorio de microbiología de CORHUILA con un microscopio *Olympus CX21*.

La morfología es la arquitectura física mediante la cual un organismo funciona y se adapta a un determinado ambiente, pero algunos aspectos pueden ser inducidos por señales específicas en un ambiente inmediato. Como resultado, las cepas caracterizadas en un laboratorio pueden lucir diferentes cuando crecen en otro a causa de sutiles variaciones en los nutrientes, la temperatura, la iluminación y la humedad. Esto hace que las comparaciones entre estudios similares sean muy difíciles. Sin embargo, estos efectos pueden ser minimizados usando estrictamente técnicas de trabajo estandarizadas para la

preparación del medio de cultivo, la inoculación y las condiciones de incubación (Visagie y otros., 2014b). A continuación, se presentan los métodos aplicados para la identificación de los hongos.

3.2.2.2 Identificación de *Penicillium* sp.

Se preparó Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) marca PanReac, mezclando muy bien 50g de MEA, 1mL de elementos traza en una solución stock (1g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.5g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ en 100mL de agua destilada) fundamentales para la producción de pigmentación y 1000mL de agua de agua destilada. Luego se llevó a autoclave a 115°C por 10min y se ajustó el pH a 5.4 ± 0.2 . Los medios se prepararon en cajas de Petri plásticas de 90mm con un volumen de 20mL. La inoculación se hizo tomando esporas de las muestras aisladas y cultivadas anteriormente en PDA, sembrando con un asa estéril en tres puntos equidistantes en el medio. Para la incubación se sellaron las cajas con cinta microbiológica y se llevaron a la incubadora a 25°C por 7días (Visagie y otros, 2014b).

Para la identificación macroscópica, después de 7días de cultivo, se midió el diámetro de colonia y se tomó registro de características como la textura de la colonia, grado de esporulación, color de los conidios, la abundancia, textura y color de los micelios, la presencia de colores o pigmentos solubles y exudados, colores al reverso de la colonia, y grado de crecimiento. Para la identificación microscópica se prepararon laminillas de las colonias cultivadas en MEA de 7 a 10días de edad y se observaron al microscopio, para ello se diluyeron muestras de conidióforos y se lavó el exceso de conidios con etanol al 70%. Características morfológicas fueron observadas, como la presencia de conidióforos siguiendo los posibles modelos de ramificación del gen *Penicillium* (Ilustración 3-4); los conidióforos pueden presentar patrones simples (con fíalides solitarias) hasta complejas estructuras con múltiples ramificaciones. Otras características observables incluyen la textura de las paredes de los tallos y conidios.

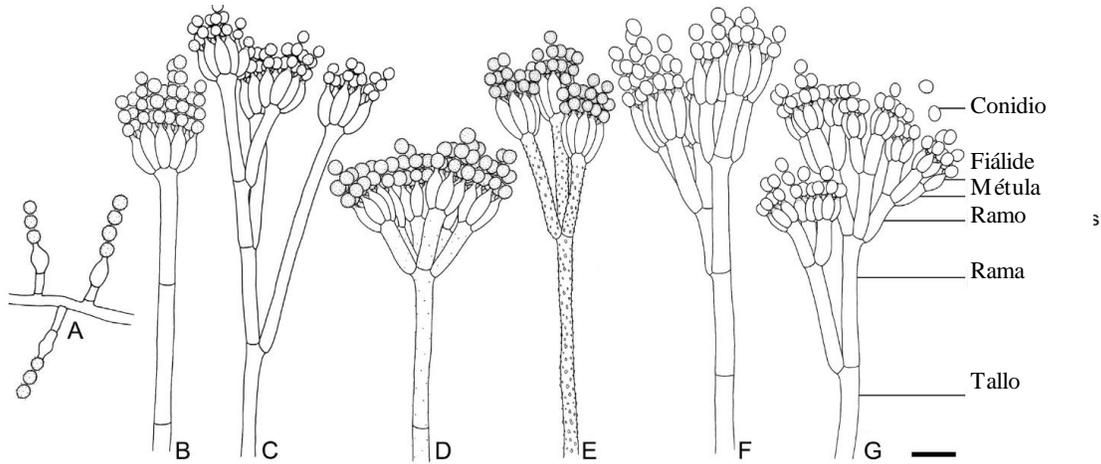


Ilustración 3-4 Conidióforos del *Penicillium* sp. A. Conidióforos con filiares solitarias. B. Monoverticiadas. C. Bifurcadas. D, E. Biverticiadas. F. Terverticiada. G. Cuaterticiado. Barra=10µm (Visagie y otros., 2014).

3.2.2.3 Identificación del *Aspergillus niger*.

La morfología es una parte importante del concepto del género *Aspergillus*. Las características de las colonias usadas para la caracterización macroscópica de la especie incluyen la tasa de crecimiento de la colonia, textura, grado de esporulación, producción de esclerocios o cleistotecios, coloración en los micelios, esporulación, pigmentos solubles, exudados, color de la colonia al reverso. A nivel microscópico, se incluyen características como la identificación del conidióforo aspergiliar (Ilustración 3-5), la forma de los conidios, la presencia o ausencia de métula entre vesícula y filiares; color, tamaño y textura del tallo, vesículas y métula, fialides, conidios y células de Hulle (Visagie y otros., 2014a).

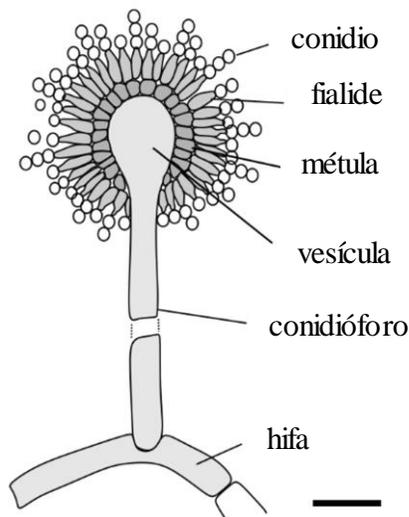


Ilustración 3-5 Conidióforo de *Aspergillus niger*. Barra 20µm (Visagie y otros., 2014).

Se hizo la siembra de los micelios de la misma forma que con *Penicillium sp*, también se usó MEA como medio de cultivo de acuerdo con la recomendación de Visagie (2014a). La incubación se realizó con los platos puestos al reverso a 25°C, bajo oscuridad y aireación suficiente durante 7 días; después de este tiempo se debe hacer la recopilación de las características mostradas. Las características microscópicas se observaron entre los 7 y 10 días de edad del cultivo, las laminillas se prepararon tomando muestras de conidióforos, diluyendo y lavando el exceso de conidios con etanol al 70%.

3.2.3 Evaluación de los tratamientos con vinazas y hongos *Aspergillus niger*, y *Penicillium sp*.

Se agregaron 250mL de vinaza a un pH 3.93 y ($T = 30.6^{\circ}\text{C}$), y 10g roca fosfórica en recipientes de vidrio con tapa. La inoculación se hizo en un ambiente controlado, tomando 2 bocados de 1cm de diámetro de los hongos previamente cultivados en cajas Petri. En el cuadro 3-1 se presenta la descripción de los tratamientos aplicados. Se decidió trabajar en medio acuoso de acuerdo con lo reportado por Moratto y otros (2015), en donde se trabajó de forma similar.

Cuadro 3-1 Descripción de los tratamientos aplicados.

Tratamiento/ Replicas	Descripción	Variables analizadas
VA: VA1 VA2 VA3	<i>RF + Vinaza + Aspergillus niger</i>	Fósforo soluble, pH
VP: VP1 VP2 VP3	<i>RF + Vinaza + Penicillium sp.</i>	Fósforo soluble, pH
VAP: VAP1 VAP2 VAP3	<i>RF + Vinaza + Penicillium sp.</i> <i>+Aspergillus niger</i>	Fósforo soluble, pH
V: V1 V2 V3	<i>RF + Vinaza</i>	Fósforo soluble, pH

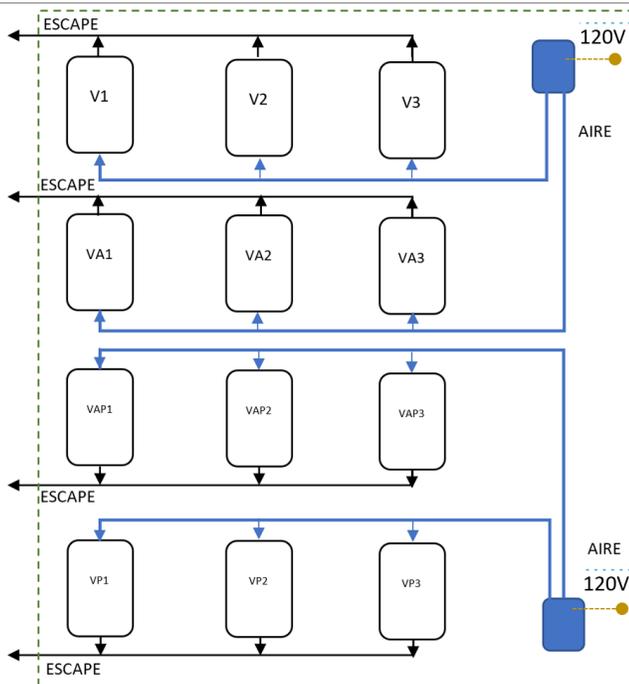
El bioproceso se realizó con aireación en un ambiente aislado para prevenir la contaminación de las muestras, la aireación se aplicó en intervalos de *2 horas* al día, durante *6 semanas*. Semanalmente, se verificó el estado de cada prueba; se recuperó el nivel de agua perdido por evaporación con agua destilada y se mezcló vigorosamente, luego se tomó muestras para medir el fósforo disuelto y el pH de la disolución.

Para la medición del fósforo disuelto se tomaron muestras de *7 mL*, se centrifugaron durante *30 minutos* a *5000 rpm*. Para eliminar la elevada turbidez y sólidos presentes; luego, se tomaron *5 mL* y se diluyó a *50 mL* con agua destilada. Esta disolución se trató con cristales de *sulfato de aluminio* para la remoción del color, causado por el remanente biológico, y se centrifugó durante otros *15 minutos* adicionales; finalmente, se mezclaron *10 mL* de la disolución aclarada con *2.5 mL* de *RVM* y se midió la absorbancia a *400 nm* en un espectrofotómetro SPECTROQUANT modelo PHARO 300; los resultados se correlacionaron con la curva patrón de *fosfato monopotásico*, válida para un rango de *0 a 50 ppm* de fósforo en fase acuosa (Ilustración 3.6 y 3.7)





Ilustración 3-6 Preparación de los tratamientos biológicos.



a.



b.

Ilustración 3-7 Configuración del sistema de aireación de los tratamientos. A) esquema, B) fotografía del experimento.

3.2.4 Análisis estadístico de los resultados experimentales.

Para la comparación estadística de los tratamientos biológicos se hizo la prueba de Bartlett para probar la homogeneidad de las varianzas (Correa, Iral, & Rojas, 2006). Debido a que los resultados resultaron no homogéneos, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis el cual compara las medianas de los grupos de los datos, para determinar si las muestras provienen de una misma población (o, de manera equivalente, de diferentes poblaciones con la misma distribución); con esto, se obtuvo un análisis ANOVA ajustado no paramétrico y se determinó que no todas las muestras provienen de una misma distribución estadística.

Finalmente se optó, por hacer pruebas de comparación múltiple entre pares de tratamientos, para determinar si eran significativamente diferentes.

Para los cálculos se usó el software Matlab R2016a, usando las funciones preestablecidas “*vartestn*” para la prueba de Bartlett, “*kruskalwallis*” para la prueba de Kurskal-Wallis, y “*multcompare*” para la prueba de comparación múltiple (Mathworks, 2019a, 2019b, 2019c, 2019d); los procedimientos se explican con más detalle en el (anexo A4).

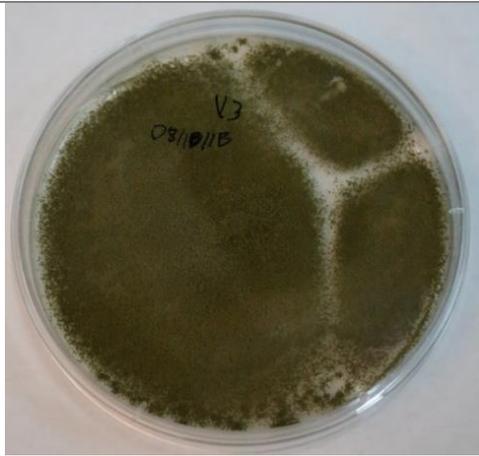
3.3 Resultados

3.3.1 *Obtención, identificación y cultivo de colonias de Aspergillus niger y Penicillium sp.*

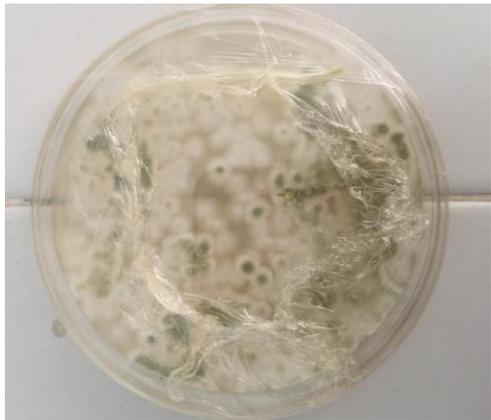
3.3.1.1 *Caracterización morfológica del Penicillium sp.*

Mientras que la identificación morfológica macroscópica del *Penicillium sp* fue verificada en el total de los 15 aislamientos preparados; la identificación microscópica sólo fue posible en 7 de los 15 aislamientos. La posible causa de este hecho fue la dificultad para identificar las estructuras individuales (Ilustración 3-8).

La coloración característica de *Penicillium sp* en tonalidades de verde y blanco se apreciaron claramente en los cultivos obtenidos, su patrón de crecimiento y la formación de hifas de gran tamaño con el paso del tiempo con desprendimiento abundante de esporas de color verde característicos de esta especie (Visagie y otros., 2014b). Los micelios de las colonias en los aislamientos obtenidos en PDA presentaron un rápido crecimiento, dispersión plana, filamentosa y aterciopelada, lanosa, y/o algodonosa. Las colonias inicialmente blancas en los primeros días de crecimiento pasaron luego a azul verdoso, gris verdoso, verde oliva, y grisáceo con visos amarillentos, ya en avanzado crecimiento (Ilustración 3-8). Con el microscopio se observaron estructuras elongadas septadas, hialinas con bifurcaciones de $15 - 40\mu m$, mótulas de $6-10\mu m$, fálides $3 - 5\mu m$, con abundante número de conidios globosos $1 - 2\mu m$ de diámetro (Ilustración 3-8c). Estas características descritas en Visagie y otros., (2014) corresponden acertadamente al *Penicillium sp* (H. M. El-Fadaly, El-Kadi, Hamad, & Habib, 2015).



a. Imagen del cultivo aislado de *Penicillium* sp en una caja de Petri con PDA



b. Imagen de cultivo aislado de *Penicillium* sp en una caja Petri con MEA



c. Imagen al microscopio del *Penicillium* sp. Barra 10 μ m

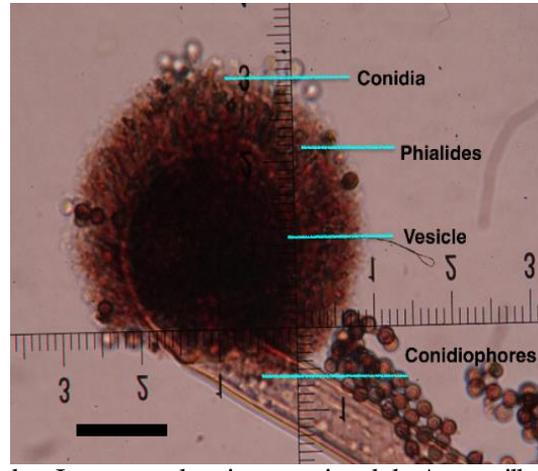
Ilustración 3-8 Identificación macroscópica y microscópica del hongo *Penicillium* sp.

3.3.1.2 *Caracterización morfológica del Aspergillus niger.*

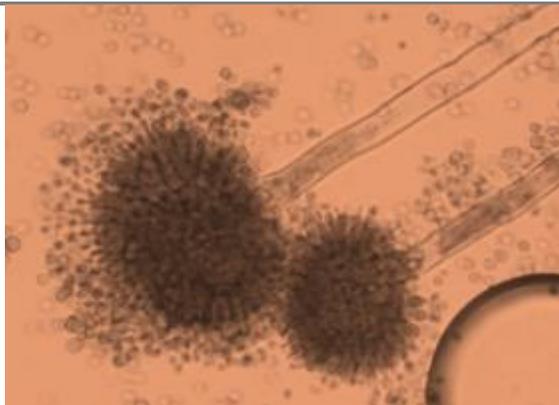
La identificación morfológica macroscópica y microscópica del *Aspergillus niger* fue verificada en el total de los 15 aislamientos preparados. Sus colores característicos en tonalidades de negro y café oscuros con visos amarillentos en las orillas de la colonia se apreciaron claramente en los cultivos obtenidos, también en el patrón de crecimiento y la formación de hifas de gran tamaño con el paso del tiempo, y con el desprendimiento abundante de esporas. Los micelios aislados obtenidos en PDA fueron blancos, con conidióforos aspergiliares café oscuro, verdoso oscuro, grisáceo oscuro a negro, sin coloración al reverso de la caja Petri, vesículas globosas (20 – 30 μ m) con abundante conidios globos (1 – 2 μ m), radiales o divididas en varias cadenas de conidios regulares e irregulares, conidióforo hialino de paredes lisas, vesícula globosa de hialinos a café oscuro, tallos largos (100 μ m) hialinos, a café oscuro de paredes lisas (Ilustración 3-9).



a. Imagen de un cultivo aislado de *Aspergillus niger* en una caja de Petri con PDA



b. Imagen al microscopio del *Aspergillus niger*. Barra $10\mu\text{m}$



c. Imagen de alto contraste de un conidióforo de *Aspergillus niger*



d. Cultivo aislado de *Aspergillus niger* en una caja Petri con MEA

Ilustración 3-9 Identificación macroscópica y microscópica del hongo *Aspergillus niger*.

De acuerdo con estas características, los aislamientos fueron identificados como *Aspergillus niger*, siguiendo el protocolo de Chung y Bennett (H. M. El-Fadaly y otros., 2015).

3.3.2 Evaluación de los tratamientos con vinazas y hongos *Aspergillus niger*, y *Penicillium sp.*

En el cuadro 3-2 se presentan un resumen de los resultados obtenidos, asimismo se muestra el % de fosfato disuelto alcanzado en promedio con los tratamientos, y se incluyen los valores obtenidos en el capítulo 2 para EDTA 0.035M que fue el mejor resultado encontrado con este tratamiento y los valores de referencia obtenidos para H_2SO_4 40%. Los resultados obtenidos con los tratamientos V, VA, VP y VAP fueron positivos en la

disolución de fosfato de la roca fosfórica, siendo el tratamiento VAP el mejor; de hecho, mayor al obtenido con EDTA 0.035M, alcanzando un 32.22% de la disolución de fosfatos obtenida con H_2SO_4 al 40%. A continuación, se presentan los resultados en detalle.

Cuadro 3-2 Resultados obtenidos con los tratamientos biológicos.

Tratamiento	%P disuelto	IS
V*	0.13	4.80
VA	0.28	10.50
VP	0.16	5.84
VAP	0.86	32.22
EDTA 0.035M	0.45	16.87
H_2SO_4 40%	2.66	100

* se usaron los valores promedio fosfato disuelto encontrados. En V* no se tuvo en cuenta V2 por ser estadísticamente diferente.

Semanalmente, se registraron los cambios aparentes en los tratamientos y se midió el fósforo soluble y el pH (ver fotografías en el anexo A5), el crecimiento de los hongos fue efectivo en el sustrato líquido compuesto por las vinazas y la RF, y la aireación permitió la mezcla constante, lo cual contribuyó al crecimiento numeroso de hifas en la fase líquida. En todos los tratamientos, con excepción de V1 y V2, la formación de masas gelatinosas sobrenadantes y/o sumergidas en el sustrato, compuestas principalmente por los hongos inoculados y la materia orgánica procedente de las vinazas fueron identificadas. En algunos tratamientos se observaron cambios en la coloración de la fase líquida, la cual se tornó bastante oscura. Además, se observó periódicamente muestras al azar en el microscopio y se verificó la presencia de los hongos inoculados, esto permitió identificar el *Aspergillus niger* en el tratamiento V3, lo cual explico más adelante, la notable diferencia con los resultados obtenidos en V1 y V2.

Tratamientos V (Vinazas + RF).

En los tratamientos V1 y V2 se obtuvieron tendencias similares, donde el fósforo solubilizado disminuyó solo un poco y progresivamente (Ilustración 3-10), mientras que el pH aumentó a 7 y 6.5, respectivamente (Ilustración 3-11). El tratamiento V2 presentó un comportamiento diferente alcanzando un valor máximo de 223ppm a la segunda semana y luego bajó a 140ppm en la quinta semana; también fue diferente el cambio en el pH, el cual aumentó desde 4 hasta 7 en la segunda semana y luego disminuyó a 6.4 al final del tratamiento.



Ilustración 3-10 Tratamiento V. Fosfatos solubles en ppm vs tiempo.

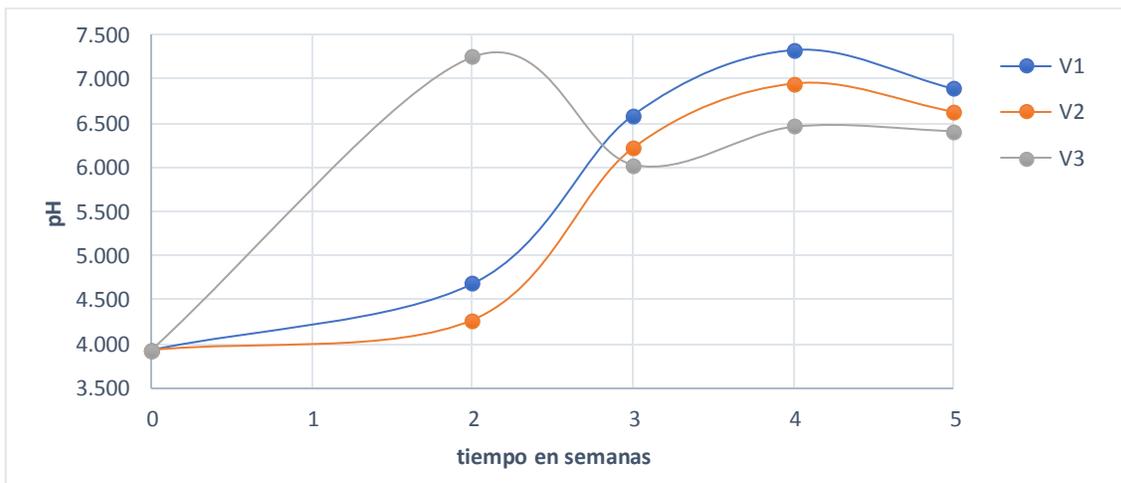


Ilustración 3-11 Tratamiento V. Cambio del pH en el tiempo del tratamiento.

Tratamientos VA (Vinazas + *Aspergillus niger* + RF).

En los tratamientos VA el fósforo disuelto presentó una tendencia similar (Ilustración 3-12) aumentó desde un promedio de 45ppm, alcanzando valores máximos de 102ppm con VA3 en la segunda semana, y luego disminuyeron a un promedio de 70ppm en la quinta semana. El pH (Ilustración 3-13) en VA1 y VA3 mostró una tendencia similar, aumentando hasta 7.5 en la cuarta semana y en la sexta semana cayó a 7.0, mientras que VA2 fue diferente alcanzando un máximo de 7.4 en la tercera semana y que cayó a 6.0 en la semana siguiente.

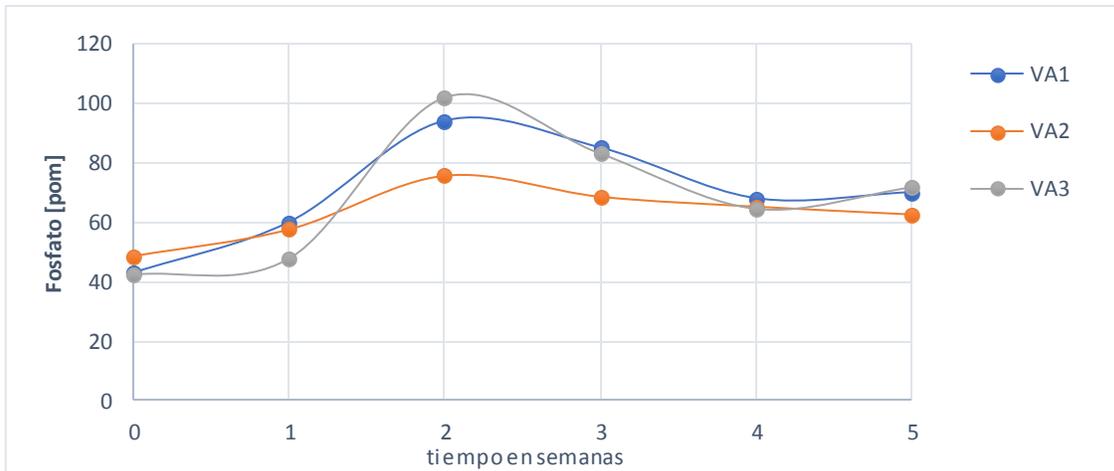


Ilustración 3-12 Tratamiento VA. Fosfatos solubles en ppm vs tiempo.

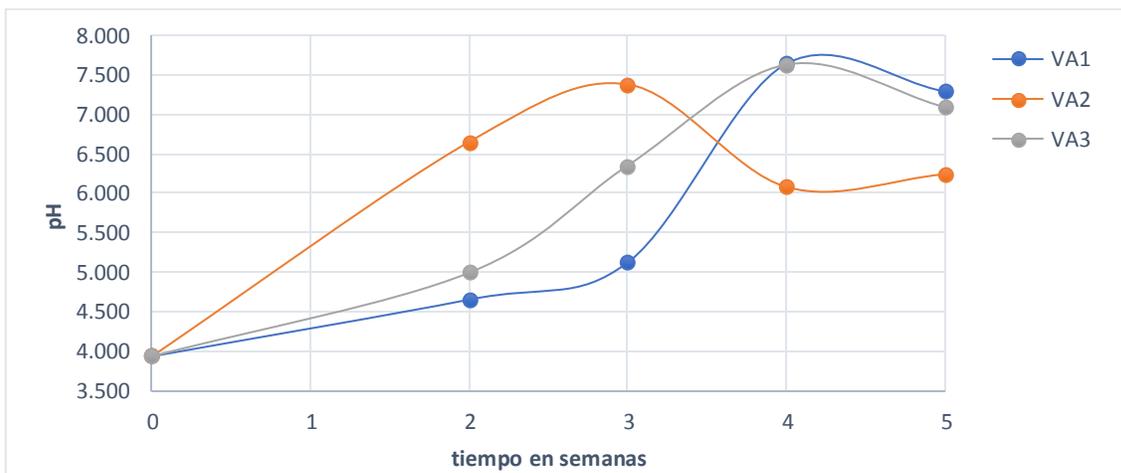


Ilustración 3-13 Tratamiento VA. Cambio del pH en el tiempo del tratamiento.

Tratamientos VP (Vinazas + *Penicillium sp* + RF).

En los tratamientos VP1, VP2 y VP3 el comportamiento se muestra aleatorio, sin embargo, fue similar en cuanto el fósforo disuelto disminuyó desde valores iniciales de 46, 53 y 52 ppm hasta 39, 33 y 33 ppm, respectivamente (Ilustración 3-14); el pH mostró una tendencia al aumentó desde 4 hasta 6, 6.5 y 7 respectivamente (Ilustración 3-15).

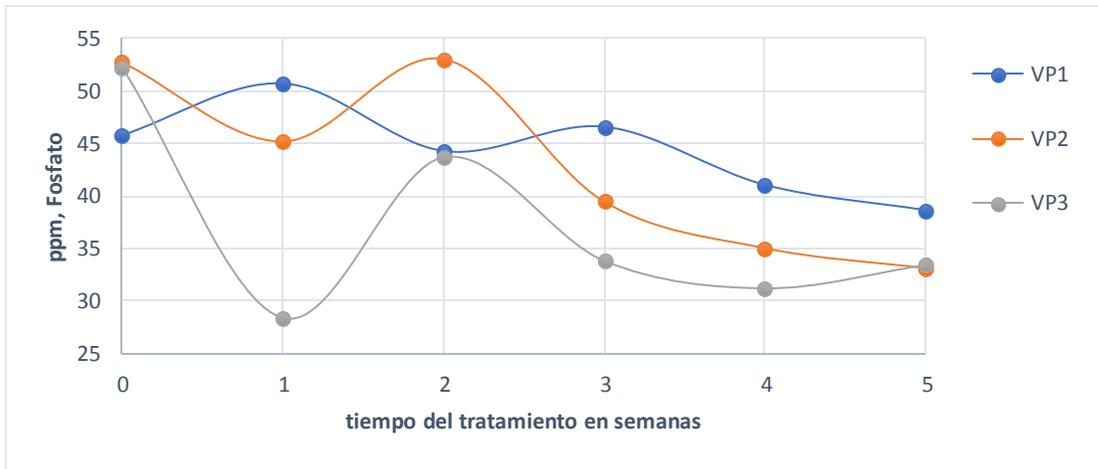


Ilustración 3-14 Tratamiento VP. Fosfatos solubles en ppm vs tiempo.

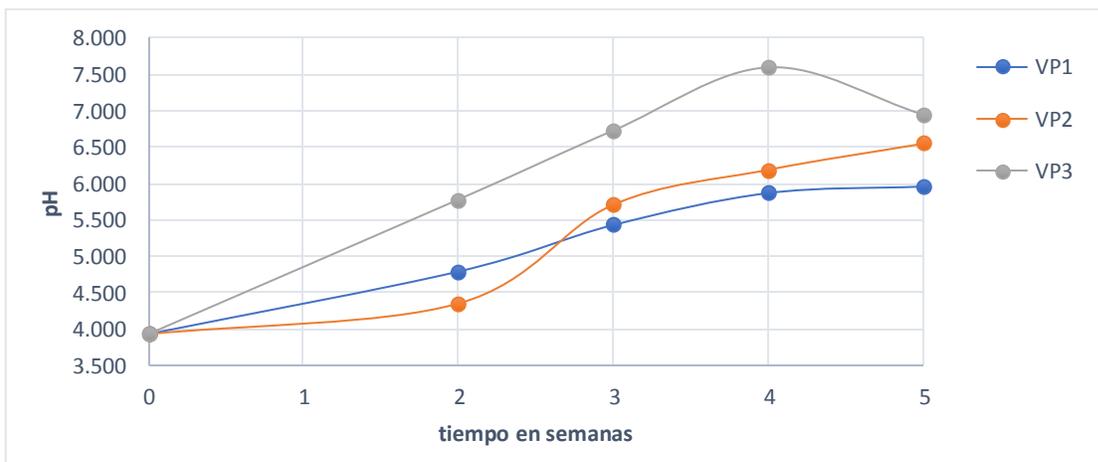


Ilustración 3-15 Tratamiento VP. Cambio del pH en el tiempo del tratamiento.

Tratamientos VAP (*Vinazas+Aspergillus niger + Penicillium sp + RF*).

En las réplicas VAP2 y VAP3 el fósforo disuelto (Ilustración 3-16) aumentó a valores máximos de 300ppm en la cuarta semana, mientras que el pH en este mismo periodo de tiempo aumentó levemente desde 4 hasta 4.6 y 4.2, respectivamente. Por otra parte, en el tratamiento VAP1 el fósforo soluble aumentó desde 61 hasta 188ppm en la segunda

semana, luego disminuyó a 103ppm en la quinta semana, mientras que el pH aumentó progresivamente desde 4 hasta 7.5 en la cuarta semana (Ilustración 3-17).

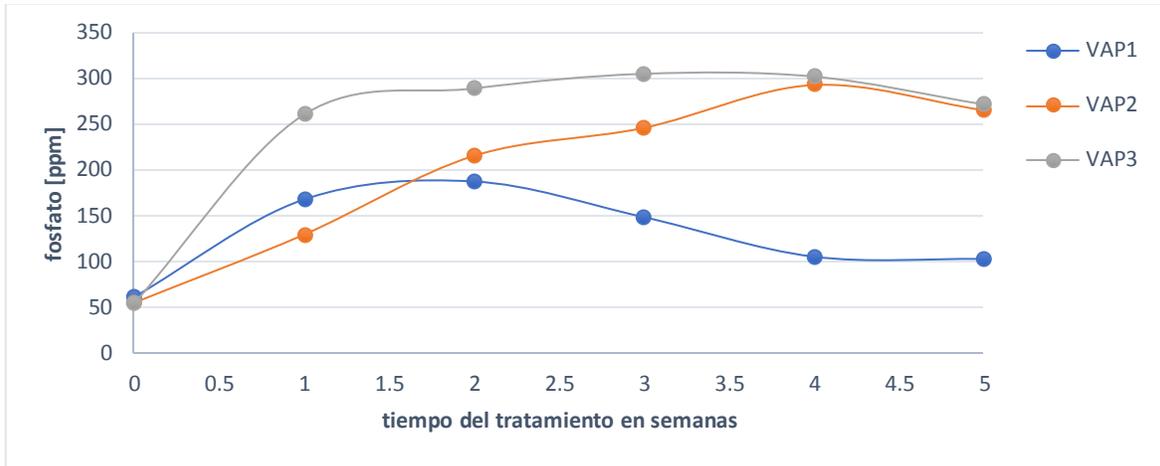


Ilustración 3-16 Tratamiento VAP. Fosfatos solubles en ppm vs tiempo.

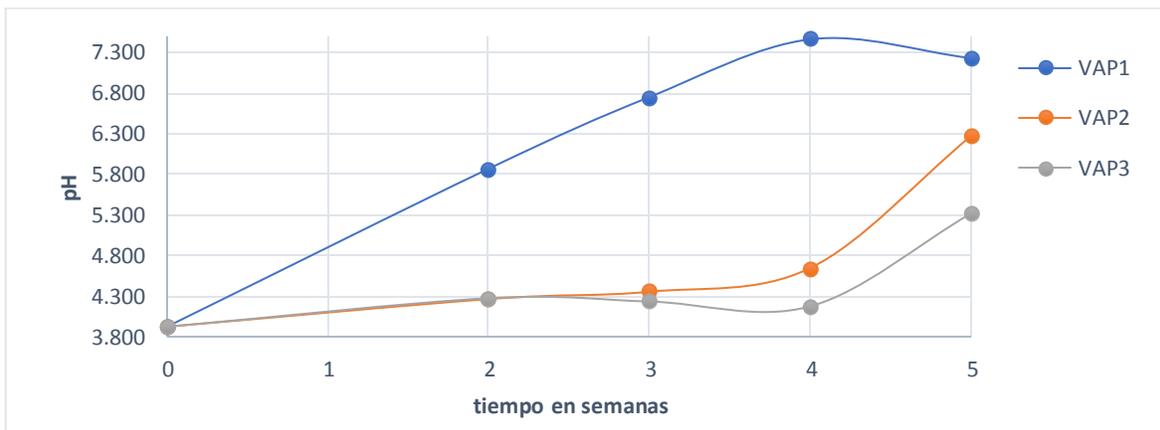


Ilustración 3-17 Tratamiento VP. Cambio del pH en el tiempo del tratamiento.

El set de datos V2 presenta diferencias significativas respecto a V1 y V3, esto puede justificarse, debido a que en V2 se registro actividad biológica, debido posiblemente a contaminación cruzada en esta muestra.

El set de datos VAP3 presenta diferencias significativas respecto a VAP1 y VAP2, esto puede justificarse, debido a que en VAP3 ocurrió inhibición de la actividad biológica, las

causas no son muy claras; sin embargo por tratarse de seres vivos, el procesos de adaptación al sustrato no fue exitoso en este ensayo.

Por otra parte en los tratamientos VA y VP, los grupos de datos no presentaron diferencias significativas, asimismo la actividad biológica de los hongos presentó resultados similares a escala microscópica.

De acuerdo con los resultados se puede inferir que el *Aspergillus niger* presentó una mejor adaptación al sustrato en las condiciones del proceso, frente al *Penicillium sp.* Es importante destacar que con el tratamiento combinado VAP se alcanzó los valores más altos de disolución, lo cual puede significar que existe una actividad simbiótica competitiva entre las dos especies que promueve la disolución de los fosfatos, aunque macroscópicamente se evidenció el avance predominante del *Aspergillus niger* sobre el *Penicillium sp.*

De acuerdo con el ANOVA realizado se demuestra que los grupos de datos de tratamientos VAP fueron significativamente diferentes a los otros tratamientos, a la vez que con estos se obtuvo la mayor la solubilización del fosfato de la RF. Por otra parte, los grupos de datos de los tratamientos VA presentaron mayor homogeneidad, y también fueron efectivos en la solubilización de los fosfatos. Esto muestra claramente que el Hongo *Aspergillus niger* es un factor biológico eficiente al momento de solubilizar el fósforo de la RF; de hecho, esto se ha publicado en varios estudios científicos desde la década de los 80 donde se reportaron algunas cepas de hongos capaces de solubilizar roca fosfórica usando otros tipos de sustratos orgánicos (Tisdale y otros., 1993); entre otros trabajos, se mencionan los siguientes: *Aspergillus aculeatus*, *A. awamori*, *A. candidus*, *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. niger* (Narsian y otros., 1993; Singal y otros., 1994; Bojinova y otros., 1997; Vassilev y otros., 1997; Goenadi y otros., 2000; Narsian y Patel, 2000; Wahid y Mehana, 2000) (Valenzuela F., Barrera P., & Pinochet T., 2002).

En contraste, con solo inóculo de *Penicillium sp* no se evidenció un incremento en la solubilización de los fosfatos de la RF, pero si una tendencia al aumento del pH, lo que sugiere una baja actividad del hongo en las condiciones del sustrato formulado. Aunque en otros estudios se ha demostrado que este hongo es un MSP en suelos ácidos, como se presenta en el estudio realizado por Beltrán y Pineda (2014).

3.4 Discusión

Los resultados obtenidos presentaron gran variabilidad, lo cual permite analizar el efecto de los tratamientos desde muchos ángulos, sin embargo, resulta complicado establecer relaciones claras entre las variables. La principal razón para esto es la complejidad del sistema reaccionante, lo cual dificulta controlar las variables influyentes; es por esto, que mientras que para algunas pruebas los resultados parecen mostrar una clara relación, para otros esta misma relación no es clara. A continuación, se trata de explicar algunos de los resultados de acuerdo con las observaciones durante la experimentación.

La prueba V3 presentó resultados diferentes; sin embargo, aquí se verificó la presencia de *Aspergillus niger*, observable directamente (afloramiento superficial y abundante formación de hifas, y tinción de negro de la fase acuosa), también en el microscopio. Este factor es probablemente la razón de la elevada solubilización de fosfatos en comparación a V1, y V2 los cuales permanecieron sin crecimiento de hongos durante las 5 semanas, lo cual se corrobora al observar los resultados de los tratamientos VA.

En las pruebas VA1 y VA3 se logró aumentar la concentración de fosfatos en la fase acuosa, y se verificó el crecimiento de *Aspergillus niger*, por su afloramiento y formación de una capa gelatinosa superficial característica, formación de hifas de gran tamaño y tinción de negro de la fase acuosa; otra característica llamativa en las pruebas VA2 y VA3 fue la tinción de negro de la fase acuosa, posiblemente por la elevada producción de esporas del hongo *Aspergillus niger*, esta característica coincidió con una mayor concentración de fosfatos solubles; además implicó un riguroso procedimiento de aclaramiento para poder realizar las mediciones colorimétricas. Por otra parte, con la prueba VA2, aunque presentó un aumento significativo de fosfatos en la fase acuosa, el crecimiento de *Aspergillus niger* no fue verificable macroscópica y microscópicamente, tampoco se consiguió identificar conidióforos de este, ni hubo tinción de negro de la fase acuosa.

En las pruebas VP1, VP2 y VP3 el crecimiento de *Penicillium sp* fue de pequeñas películas superficiales, sin formación de hifas de buen tamaño en comparación al crecimiento mostrado por el *Aspergillus niger*, probablemente el *Penicillium sp* se limitó a sobrevivir en un medio poco favorable para él, lo cual es consistente con los resultados reportados por (Li y otros, 2016). Asimismo, consistentemente, no se logró aumentar la concentración de fosfatos en la fase acuosa, lo cual refuerza los resultados esperados para las pruebas sin actividad biológica.

Las pruebas VAP presentaron crecimiento predominante de *Aspergillus niger*, formación de hifas superficiales de gran tamaño y afloramiento de conidióforos de este, con una presencia menor de afloramientos de conidióforos de *Penicillium sp*. La prueba VAP3 fue particularmente exitosa pues alcanzó una elevada y sobresaliente concentración de fosfato en la fase acuosa desde la primera semana, la cual se mantuvo hasta la quinta semana, y disminuyó un poco a la quinta semana, asimismo presentó tinción de negro en la fase acuosa junto con VAP2. Por otra parte, la prueba VAP1 presentó un comportamiento curioso; tuvo un aumento significativo de fosfatos en la fase acuosa hasta la segunda semana y luego cayó progresivamente hasta la cuarta semana, además el crecimiento de *Aspergillus niger* fue menor en comparación a VAP2 y VAP3, asimismo, hubo menor presencia de conidioforos de *Penicillium sp*; al final, en la quinta semana desapareció completamente el afloramiento superficial de hongos. Finalmente, se puede afirmar que el *Aspergillus niger* fue predominante en la inoculación junto con *Penicillium sp*; sin embargo, hace falta esclarecer las razones que permitieron la elevada solubilización de fosfatos en VAP.

En general el pH tendió a aumentar desde su valor inicial de 4.0 hasta valores entre 6.0 y 7.0, pero, excepcionalmente en las pruebas VAP2 y VAP3 su valor inicial se mantuvo hasta 4.5 en la cuarta semana, para finalmente aumentar hasta 5.5 y 6.3 respectivamente en la quinta semana, lo que sugiere una relación entre el pH (4.0 – 4.5), el crecimiento del *Aspergillus niger* y la elevada solubilización de fosfatos, principalmente en VAP3, esta relación ha sido advertida por varios autores (Nahas, 1996; Osorio y Habte, 2001; Osorno, 2015). Por el contrario en V3 el pH aumentó rápidamente alcanzando un máximo de 7 en la segunda semana, el cual coincidió con un máximo de 223ppm de fosfatos solubles, luego disminuyó hasta 6, asimismo los fosfatos a 140ppm, sugiriendo una relación directamente proporcional. El aumento en el pH se puede explicar por la presencia de aniones carbonato, e hidroxilo en la RF, los cuales neutralizan la acidez de las vinazas; el no aumento del pH o la disminución del pH posterior a su aumento implica la producción de nuevos ácidos orgánicos, lo cual es producto de la actividad de los hongos, principalmente, en este estudio, productos metabólicos del *Aspergillus niger* como el ácido cítrico (Li y otros, 2016).

3.5 Conclusiones

Los tratamientos biológicos aplicados fueron efectivos en la disolución de fosfatos de la roca fosfórica, siendo mejor el tratamiento VAP que contiene en su formulación la acción combinada de Vinazas, *Aspergillus niger*, y *Penicillium sp*, con el cual se alcanzó valores superiores a los obtenidos con EDTA 0.035M, logrando un 32.22% de la disolución de fosfato obtenida con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 – 40%). Estos resultados positivos, se presentan como una alternativa a considerar seriamente en lugar de los procesos de acidulación convencionales.

Los tratamientos individuales aplicados tuvieron una marcada influencia en la solubilización de los fosfatos de la roca fosfórica, obteniéndose mejores resultados para las réplicas de *Aspergillus niger* y para el consorcio *Aspergillus niger* – *Penicillium sp*. Por otra parte, la inoculación de solo *Penicillium sp* no mejoró la concentración de fosfatos en fase acuosa con respecto a las vinazas solas, de hecho, su crecimiento aparente fue menor. Comparativamente el *Aspergillus niger* presentó mejor adaptación al sustrato de vinazas y RF que el *Penicillium sp*, asimismo, presentó mejores resultados en la solubilización de fosfatos de la RF. Por esto, resulta promisorio la viabilidad de la pulpa de café como sustrato para el crecimiento de consorcios de los hongos *Aspergillus niger* y *Penicillium sp* en procesos de biosolubilización de RF.

3.6 Recomendaciones

En proceso se dio libertad a los cambios de pH, lo cual permitió observar los cambios espontáneos y naturales en el sistema reaccionante, sin embargo, en futuros trabajos se

sugiere hacer control riguroso de esta y otras variables como la concentración de las especies en equilibrio químico.

Es necesario realizar pruebas con especies específicas de *Penicillium sp* para identificar aquellos que se adapten mejor al sustrato con base en vinazas de pulpa de café, asimismo hace falta identificar los metabolitos producidos por estas especies.

Además, teniendo en cuenta que el *Aspergillus niger* es la principal fuente en la producción global de ácido cítrico, resulta evidente que debe lograrse procesos intensivos en la bio-solubilización de fosfato con *Aspergillus niger* tanto para mejorar la fertilización del suelo y la eficiencia de los fertilizantes.

3.7 Referencias

- Correa, J. C., Iral, R., & Rojas, L. (Junio de 2006). Estudio de potencia de pruebas de homogeneidad de varianza. *Revista Colombiana de Estadística*, 29(1), 57-76.
- Cunningham, J. E., & Kuiack, C. (1992). Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1451-1458.
- El-Fadaly, H. M., El-Kadi, S. M., Hamad, M. N., & Habib, A. A. (2015). Fungal isolation, Fungal identification, Egyptian Ras cheese (Romy), Ripening rooms. *Journal of Microbiology Research*, 5(1), 1-10. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20150501.01>
- FAO. (2007). *Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. Boletín FAO Fertilizantes y Nutrición Vegetal* (Vol. 13). Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-y5053s.pdf>
- González Chávez, M. C., & Ferrera-Cerrato, R. (2000). Roca fosfórica y *Glomus sp.* en el crecimiento de naranjo agrio. *Terra*, 18(4), 361-367.
- Ivanova, R. P., Bojinova, D. Y., Gruncharov, I. N., & Damgaliev, D. L. (2006). The solubilization of rock phosphate by organic acids. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 181(11), 2541-2554. <https://doi.org/10.1080/10426500600758399>
- Iyyappan, J., Bharathiraja, B., Baskar, G., Jayamuthunagai, J., & Barathkumar, S. (2018). Malic acid production by chemically induced *Aspergillus niger* MTCC 281 mutant from crude glycerol. *Bioresource technology*, 251, 264-267.

- Kaur, G., & Reddy, M. S. (2017). Improvement of crop yield by phosphate-solubilizing *Aspergillus* species in organic farming. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(1), 24-34.
- Lesage, E., Meers, E., Vervaeke, P., Lamsal, S., Hopgood, M., Tack, F., & Verloo, M. (2005). Enhanced phytoextraction: ii. effect of edta and citric acid on heav. *International Journal of Phytoremediation*, 7, 143–152.
- Li, H., Liu, J., Li, G., Shen, J., Bergstrom, L., & Zhang, F. (2015). Past, present, and future use of phosphorus in Chinese agriculture and its influence on phosphorus losses. *Ambio*, 44(2), 274–285. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0633-0>
- Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., ... & Hu, S. (2016). A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific reports*, 6, 25313.
- M. E. Beltrán Pineda. (2014). Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa (*Solanum tuberosum*). *Ciencia En Desarrollo*, 5(2), 145–154.
- Mai, H. T. N., Lee, K. M., & Choi, S. S. (2016). Enhanced oxalic acid production from corncob by a methanol-resistant strain of *Aspergillus niger* using semi solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 51(1), 9-15.
- Mathworks. (2019a). Kruskal-Wallis test - MATLAB kruskalwallis. Recuperado 2 de abril de 2019, de <https://www.mathworks.com/help/stats/kruskalwallis.htm#btv4oqy-6>
- Mathworks. (2019b). Multiple comparison test - MATLAB multcompare. Recuperado 2 de abril de 2019, de https://www.mathworks.com/help/stats/multcompare.html?searchHighlight=multcompare&s_tid=doc_srchtile
- Mathworks. (2019c). Multiple-sample tests for equal variances - MATLAB vartestn. Recuperado 2 de abril de 2019, de <https://www.mathworks.com/help/stats/vartestn.htm#btuo1pv>
- Mathworks. (2019d). One-way analysis of variance - MATLAB anova1. Recuperado 2 de abril de 2019, de <https://www.mathworks.com/help/stats/anova1.html>
- Mendes, G. D. O., da Silva, N. M. R. M., Anastácio, T. C., Vassilev, N. B., Ribeiro Jr, J. I., da Silva, I. R., & Costa, M. D. (2015). Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. *Microbial biotechnology*, 8(6), 930-939.
- Narsian, V., & Patel, H. H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(4), 559-565.
- Osorno Bedoya, L. (2013). *BIO-ACIDULACIÓN DE ROCA FOSFÓRICA BAJO CONDICIONES IN VITRO*. Universidad Nacional de Colombia.

- Perez, C. A., De la Ossa, J., & Montes, V. D. (2012). Hongos Solubilizadores de Fosfatos en Fincas Ganaderas del Departamento de Sucre. *Revista Colombiana Ciencia de Ciencia Animal*, 4(1), 35–45.
- Peterson, S. W., Vega, F. E., Posada, F., & Nagai, C. (2005). *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. *Mycologia*, 97(3), 659-666.
- Pierre, F., Rosell, M., Quiroz, A., & Granda, Y. (2009). Evaluación química y biológica de compost de pulpa del café en caspito municipio andrés Eloy blanco , estado Lara, Venezuela. *Bioagro*, 21(2), 105–110.
- Pineda, M. B. (2015). Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa [*Solanum tuberosum*]. *CIENCIA EN DESARROLLO*, 5(2), 145–154.
- Posso, E. J. S., & De Prager, M. S. (2017). Production of organic acids by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. *Acta Agronomica*, 66(2). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/acag.v66n2.56148>
- Puerta, G., & Ríos, S. (2014). Composición Química del mucílago de café según el tiempo de fermentación y refrigeración. El-Fadaly, H., El-Kadi, S., & El-Gayar, E. (2016). Microbiological examination for some chocolate cake samples. *Journal of Environmental Sciences*, 45(1), 11–27.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., & Latif, F. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak J Biol Sci*, 7(2), 187-196.
- Rodríguez Valencia, N., & Zambrano Franco, D. (2010). Los subproductos del café: fuente de energía renovable. *Avances Técnicos Cenicafé*, (3), 8.
- Serrat-Díaz, M., la Fé-Isaac, D., Daniel, Á., la Fé-Isaac, D., Alberto, J., & Montero-Cabral, C. (2018). Extracción y caracterización de pectina de pulpa de café de la variedad Robusta. *Revista Cubana de Química*, 30(3), 522-538.
- Trujillo, A. T., Gómez, V. H. P., Cárdenas, E. M., Dussan, A. M., & Herrera, C. H. B. (2017). Oportunidades para el departamento del Huila en el mercado de fertilizantes. *Revista RETO: Revista Especializada en Tecnologías Transversales de la Organización*, 3(3), 93-104.
- Valenzuela, E., Barrera, S., & Pinochet, D. (2002). Solubilización de roca fosfórica Carolina del Norte con cepas de *Aspergillus niger* aisladas desde un suelo trumao. *Boletín Micológico*, 17.

- Visagie, C. M., Houbraeken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... Samson, R. A. (2014a). Identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78(1), 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R., & Ryder, M. H. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium spp.* closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, 40(1), 36-43.
- Yin, Z., Shi, F., Jiang, H., Roberts, D. P., Chen, S., & Fan, B. (2015). Phosphate solubilization and promotion of maize growth by *Penicillium oxalicum* P4 and *Aspergillus niger* P85 in a calcareous soil. *Canadian journal of microbiology*, 61(12), 913-923.
- Zapata, F., & Roy, R. N. (Eds.). (2007). *Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible*. Roma, Italia: FAO.

Capítulo 4. Resumen comparativo entre los tratamientos aplicados sobre RF con EDTA y con vinazas de PC inoculadas con *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*

Este capítulo corto se elaboró para resumir los resultados de los tratamientos mostrados en los capítulos 2 y 3, de manera que el lector pueda comparar de manera rápida y general los diferentes aspectos de estos. Los cuales se resumen en el cuadro 4-1.

Cuadro 4-1 Resumen de los resultados.

	Tratamiento	Descripción	P elemental total disuelto (%)	IS (%)	Observaciones
EDTA	B	0.0000M de EDTA	0.01 ± 0.0028	0.38	Se observó un intervalo óptimo para concentraciones entre S3 y S4.
	S1	0.0026M de EDTA	0.11 ± 0.0040	4.07	
	S2	0.0100M de EDTA	0.13 ± 0.0001	4.76	
	S3	0.0147M de EDTA	0.31 ± 0.0024	11.78	De acuerdo con el estudio del avance de reacción, el 70% este proceso ocurre en tiempos cortos, inferiores a 1h.
	S4	0.0353M de EDTA	0.45 ± 0.0125	16.87	
	S5	0.0500M de EDTA	0.09 ± 0.0073	3.30	
	S6	0.1000M de EDTA	0.01 ± 0.0034	0.38	
BIOLÓGICO	V	RF + Vinazas de PC	0.13 *	4.80	* corresponde a los valores medios máximos obtenidos con los tratamientos a un tiempo de reacción determinado.
	VA	RF + Vinazas de PC + <i>Aspergillus niger</i>	0.28 *	10.50	
	VP	RF + Vinazas de PC + <i>Penicillium sp</i>	0.16 *	5.84	
	VAP	RF + Vinazas de PC + <i>Aspergillus niger</i> + <i>Penicillium sp</i>	0.86 *	32.22	Se destaca VAP con IS=32.22% El tiempo para el cual se alcanza estos valores es de al menos 3 semanas.
CONVENCIONAL	H_2SO_4 al 40% v/v	Disolución de ácido sulfúrico concentrado al 40% v/v	2.66 ± 0.034	100*	*valor de referencia asignado para comparar los tratamientos El proceso ocurre en tiempos cortos, inferiores a 1h y puede ser acelerado con incremento de la temperatura

4.1 Comentarios Finales

Con los resultados obtenidos, se manifiesta el interés en dar mayor avance teórico y técnico del tratamiento biológico, debido a que este involucra una serie de factores que lo hacen prometedor desde el aspecto técnico como el ambiental, promoviendo el uso eficiente y responsable de las fuentes naturales de acuerdo con los objetivos del milenio (ONU, 2000), y del reuso de subproductos agrícolas como la pulpa del café; que en el largo plazo puede contribuir a preservar los recursos naturales y la sostenibilidad. En este sentido de acuerdo con la Constitución Política de Colombia del 1991, que en el artículo 80 dice: “El Estado planificará el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación, restauración o sustitución”. Este es un llamado a dar manejo y aprovechamiento sostenible de las fuentes naturales. Adicionalmente, destacar que la PC y la RF son materias primas disponibles en el departamento del Huila y en varias regiones de Colombia; por lo que alternativas como estas deben ser consideradas seriamente en los modelos productivos de las regiones y con el apoyo comprometido de los sectores (Trujillo, 2017); Citando el Artículo 79 de la constitución “todas las personas tienen derecho a gozar de un ambiente sano”; por ello se debe evitar el uso de sustancias como el ácido sulfúrico, el cual puede afectar tanto el suelo como las fuentes hídricas más cercanas, nociva tanto en cuerpos de agua superficial como subterránea (IDEAM, 2017).

4.2 Referencias

- Gobierno de Colombia (1991). Constitución Política de Colombia. Recuperado de: <https://bit.ly/1gwaTDP>
- IDEAM (2018). Estudio Nacional del Agua. Recuperado de <https://bit.ly/2PyytFa>
- ONU. (2000). Declaración de los Objetivos del Milenio. Recuperado de: <https://bit.ly/2GIgmIY>
- Trujillo, A. T., Gómez, V. H. P., Cárdenas, E. M., Dussan, A. M., & Herrera, C. H. B. (2017). Oportunidades para el departamento del Huila en el mercado de fertilizantes. *Revista RETO: Revista Especializada en Tecnologías Transversales de la Organización*, 3(3), 93-104.

Anexos

Anexo A1. Difractogramas DRX de la roca fosfórica

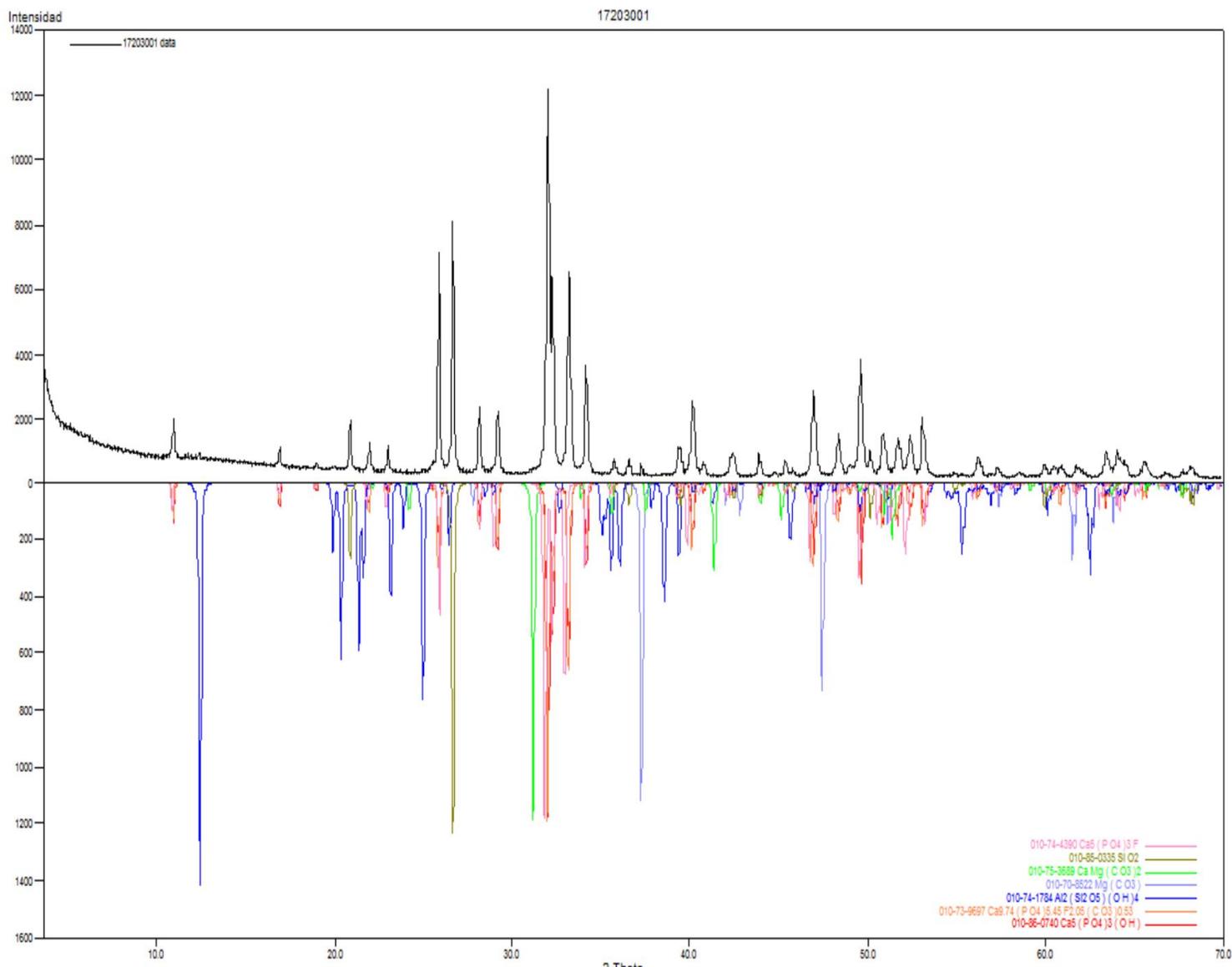


Ilustración A 1. Análisis comparativo por difracción de rayos-X de las fases identificadas en el espécimen seleccionado de la muestra con código interno 17203001.

Nota: En el perfil de difracción experimental se observaron reflexiones con poca intensidad que no pudieron ser asignadas a alguna fase reportada en la base de datos PDF-2.

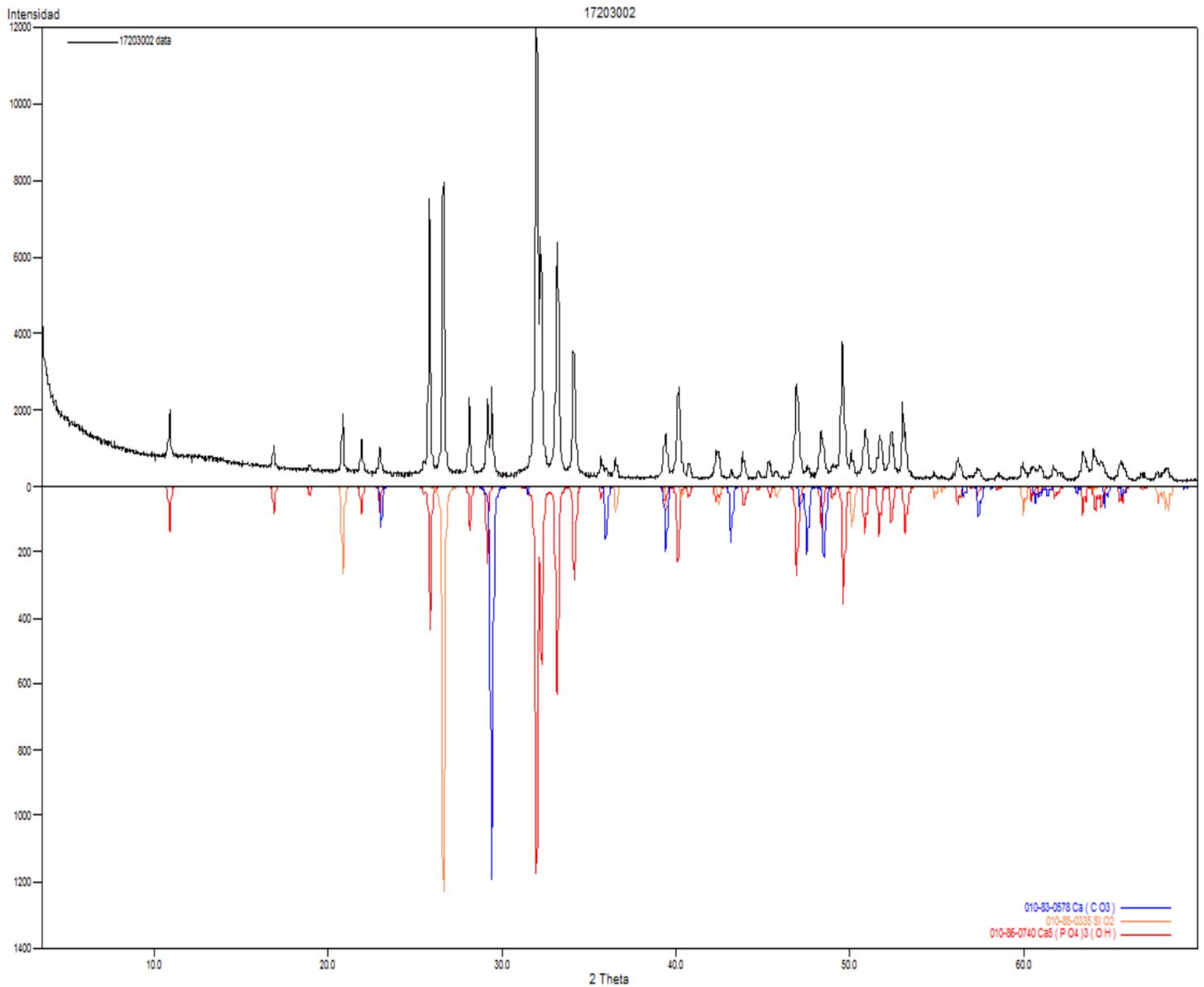


Ilustración A 2. Análisis comparativo por difracción de rayos-X de las fases identificadas en el espécimen seleccionado de la muestra con código interno 17203002.

Nota: En el perfil de difracción experimental se observaron reflexiones con poca intensidad que no pudieron ser asignadas a alguna fase reportada en la base de datos PDF-2.

A2. Micrografías SEM

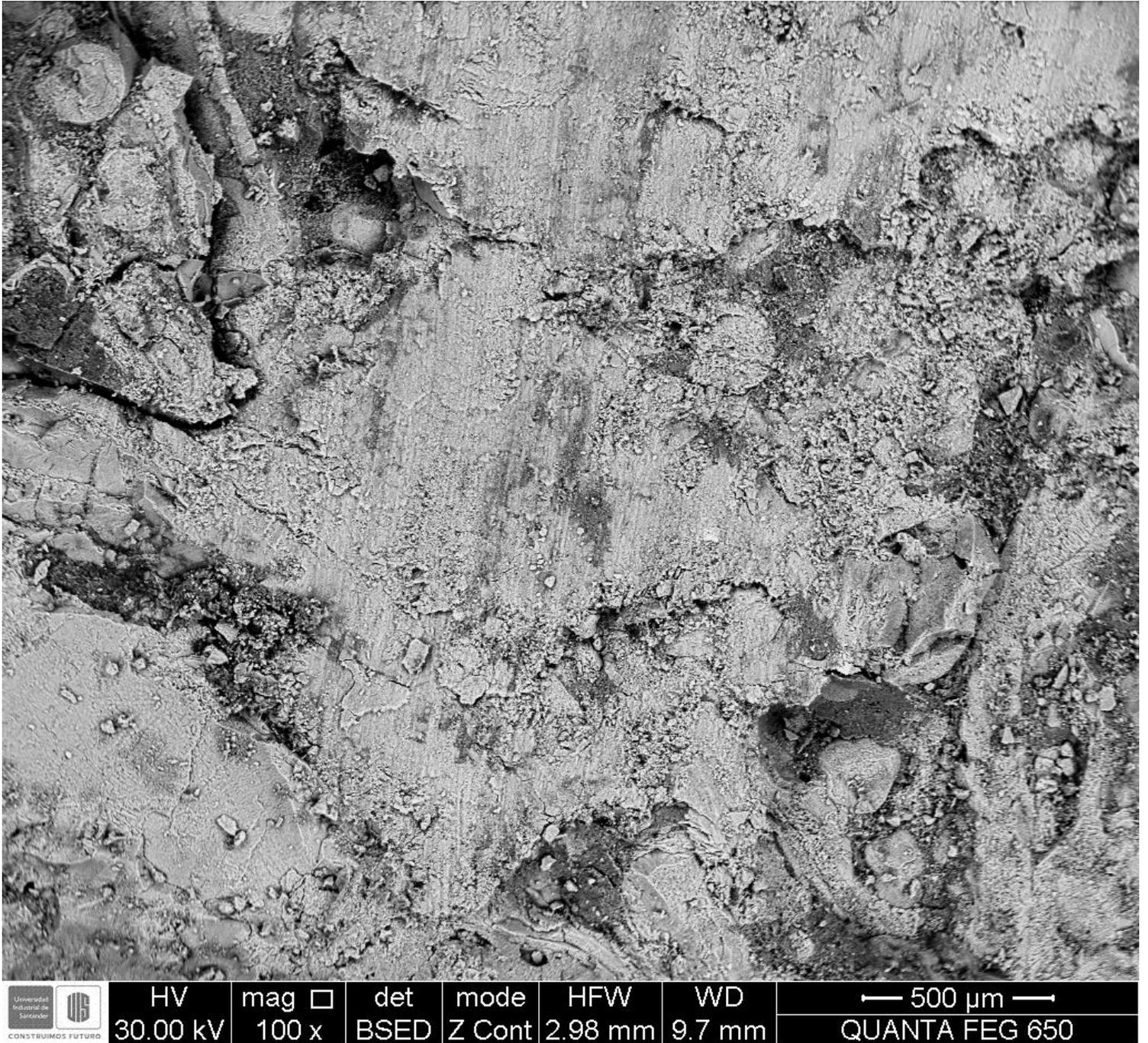
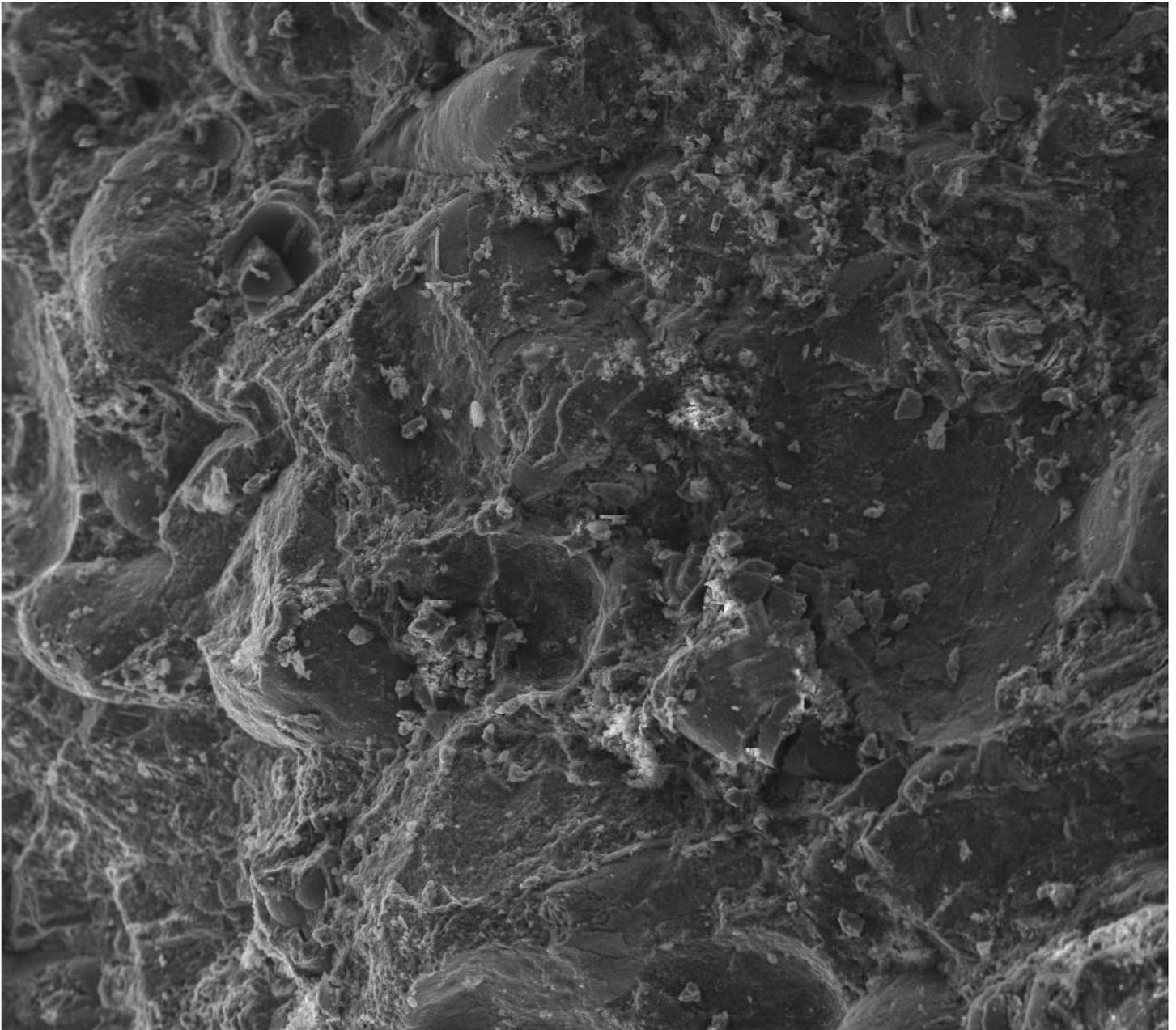


Ilustración A 3. Imagen SEM RF. Magnificación de 100X



 CONSTRUIMOS FUTURO	HV	mag	det	mode	HFV	WD	200 μ m
	30.00 kV	400 x	BSED	Z Cont	746 μ m	9.7 mm	

Ilustración A 4. Imagen SEM RF2. Magnificación de 400X



 CONSTRUIMOS FUTURO	HV	mag	det	mode	HFW	WD	500 μ m
	30.00 kV	200 x	ETD	SE	1.49 mm	7.8 mm	

Ilustración A 5. Imagen SEM RF3. Magnificación de 200X

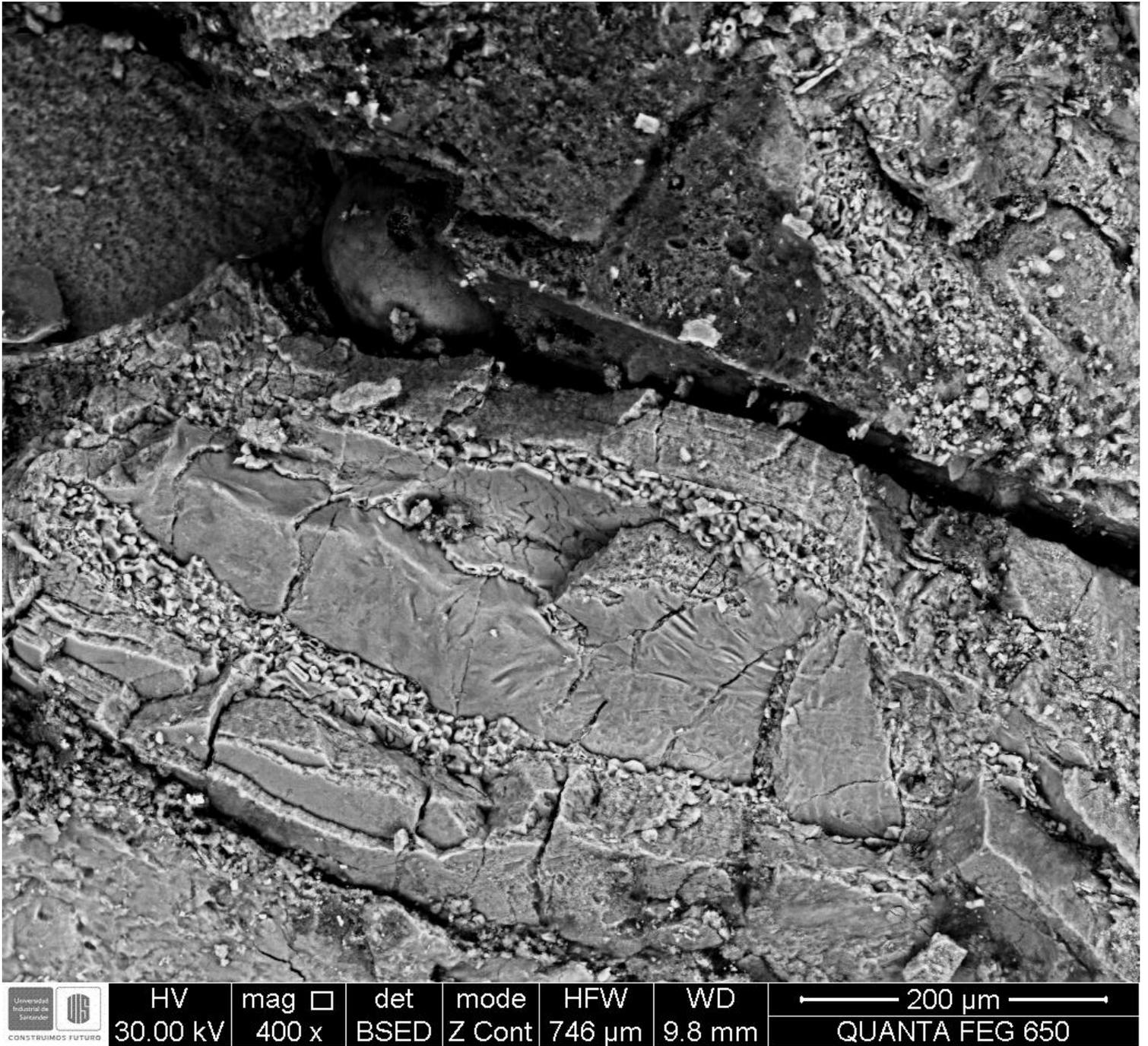


Ilustración A 6. Imagen SEM RF4. Magnificación de 400X

Anexo A3. Análisis estadístico de los resultados experimentales del tratamiento con EDTA.

Cuadro A-2 Prueba de Bartlett de valores múltiples – Tratamientos.

Group Summary Table			
Group	Count	Mean	Std Dev
1	3	2.62	0.73082
2	3	27.75	1.03
3	3	32.467	0.02082
4	3	80.313	0.60501
5	3	115.09	3.22
6	3	22.527	1.88229
7	3	1.313	0.86315
Pooled	21	40.297	1.54078
Bartlett's statistic	20.2603		
Degrees of freedom	6		
p-value	0.0025		

El valor menor de $p < Bartlett$ indica que se rechaza H_0 de manera que al menos un tratamiento tiene una varianza diferente. En la Ilustración A- se presentan un diagrama de cajas de los resultados.

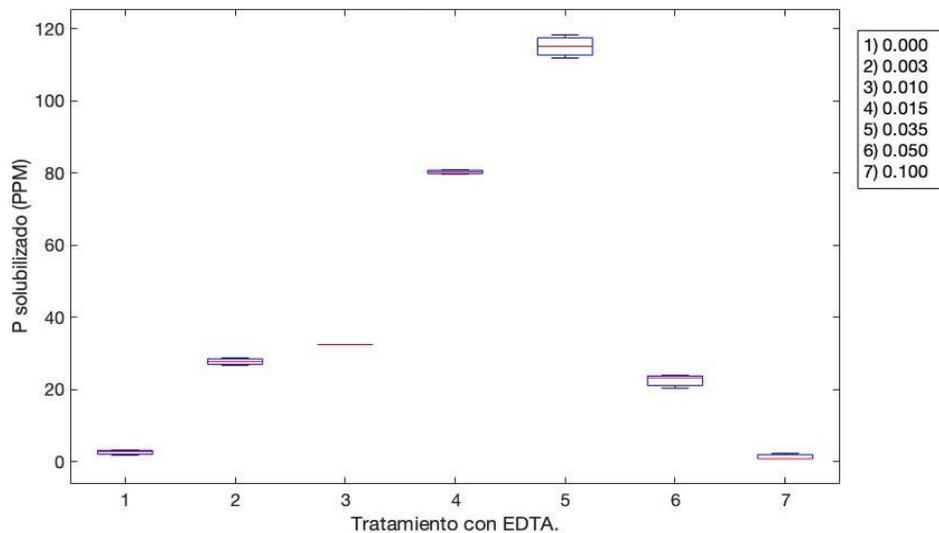


Ilustración A-7 Test de Bartlett – Tratamientos.

Cuadro A-2 Prueba de Kruskal-Wallis – Tratamientos.

Kruskal-Wallis ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	750.667	6	125.111	19.5	0.0034
Error	19.333	14	1.381		
Total	770	20			

El valor de $p < \chi^2$ indica que se rechaza la hipótesis nula con un valor de significancia del 1%. Por tanto, los valores obtenidos para los tratamientos no pertenecen a una misma distribución de probabilidad. En la Ilustración A- se presentan un diagrama de cajas de los resultados.

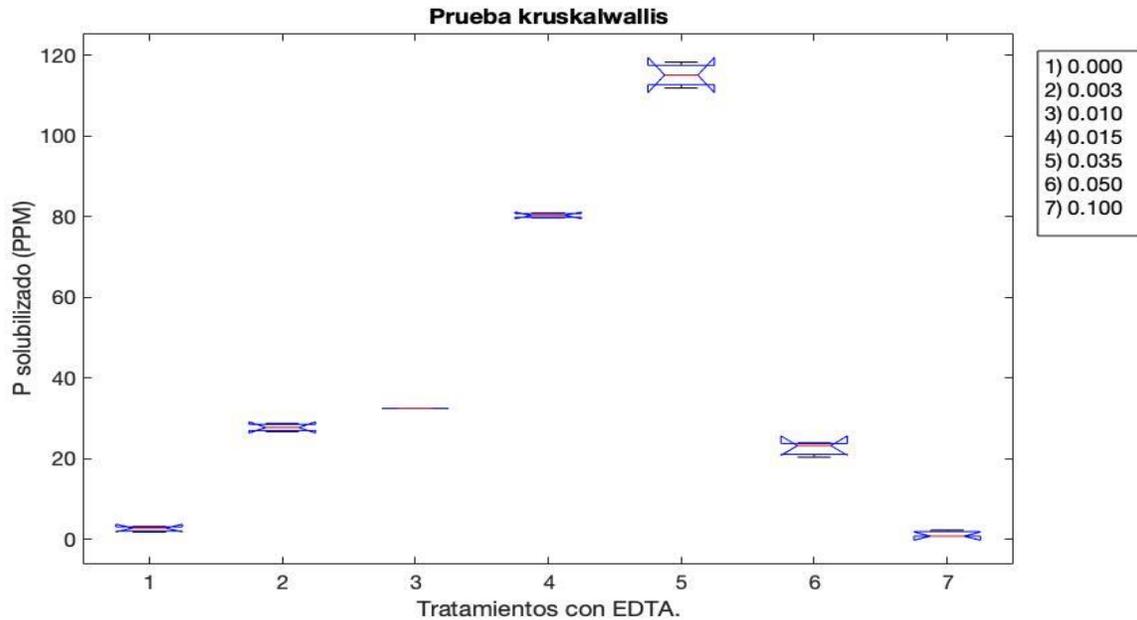


Ilustración A-8 Prueba de Kruskal-Wallis – Tratamientos.

Intervalo 0-20 min

Cuadro A-3 Prueba de Bartlett de valores múltiples – Avance de reacción, 0 – 20min.

Group Summary Table			
Group	Count	Mean	Std Dev
1	10	1.097	1.91106
2	10	2.759	5.4169
3	10	2.608	5.51968
4	10	2.038	4.31947
5	10	1.728	2.86076
6	10	0.903	2.17084
Pooled	60	1.8555	3.97945
Bartlett's statistic	16.4267		
Degrees of freedom	5		
p-value	0.0057		

El menor valor de $p < Bartlett$ (Intervalo 0-20 min

Cuadro A-) indica que se rechaza H_0 , de manera que al menos un tratamiento tiene una varianza diferente (Ilustración A-9).

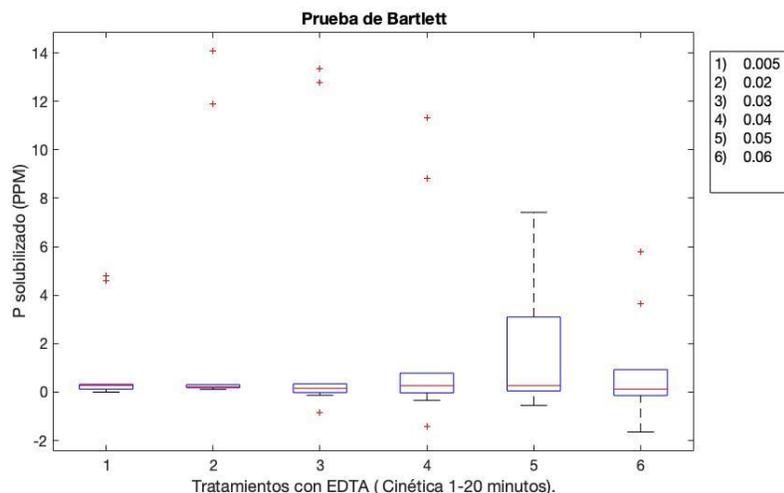


Ilustración A-9 Test de Bartlett – Tratamientos - Avance de reacción, 0 – 20min.

Cuadro A-4 Prueba de Kruskal-Wallis - Avance de reacción, 0 – 20min.

Kruskal-Wallis ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	564.8	5	112.96	1.85	0.8691
Error	17416.2	54	322.522		
Total	17981	59			

El valor de $p < \chi^2$ indica que se rechaza la hipótesis nula con un valor de significancia del 1%. Por tanto, los valores obtenidos para los tratamientos no pertenecen a una misma distribución de probabilidad (Ilustración A-10).

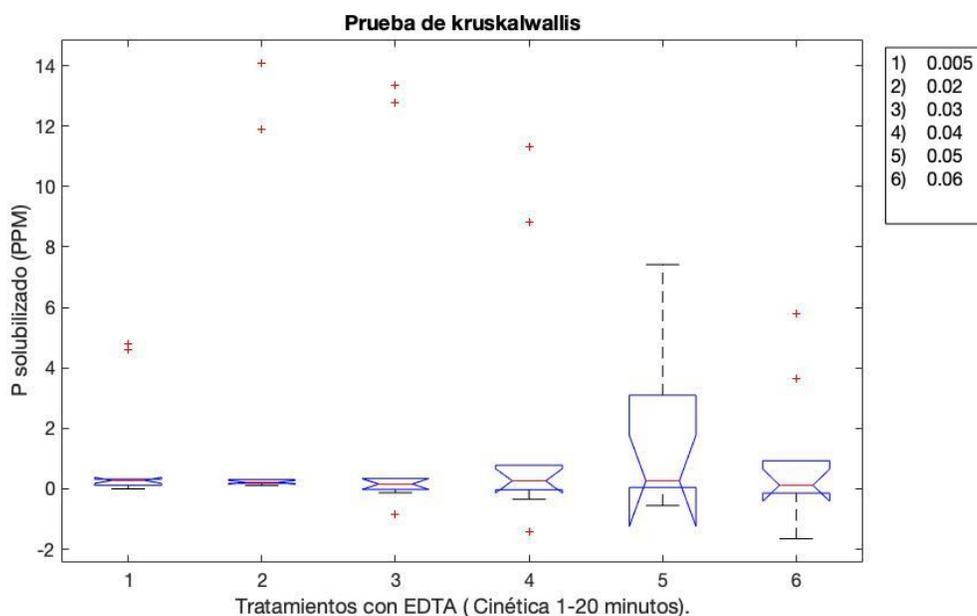


Ilustración A-10 Test de Kruskal-Wallis - Avance de reacción, 0 – 20min

Intervalo 60-1140 min

Cuadro A-5 Prueba de Bartlett de valores múltiples – Avance de reacción, 60-1440min.

Group Summary Table			
Group	Count	Mean	Std Dev
1	4	0.095	0.0995
2	4	0.05	0.01826
3	4	0.04	0.04899
4	4	0.0425	0.03403
5	4	-0.005	0.01915
6	4	0.0025	0.01258
Pooled	24	0.0375	0.04885
Bartlett's statistic		15.5307	
Degrees of freedom		5	
p-value		0.0083	

El menor valor de $p < Bartlett$ (Cuadro A-5) indica que se rechaza H_0 de manera que al menos un tratamiento tiene una varianza diferente (Ilustración A-11).

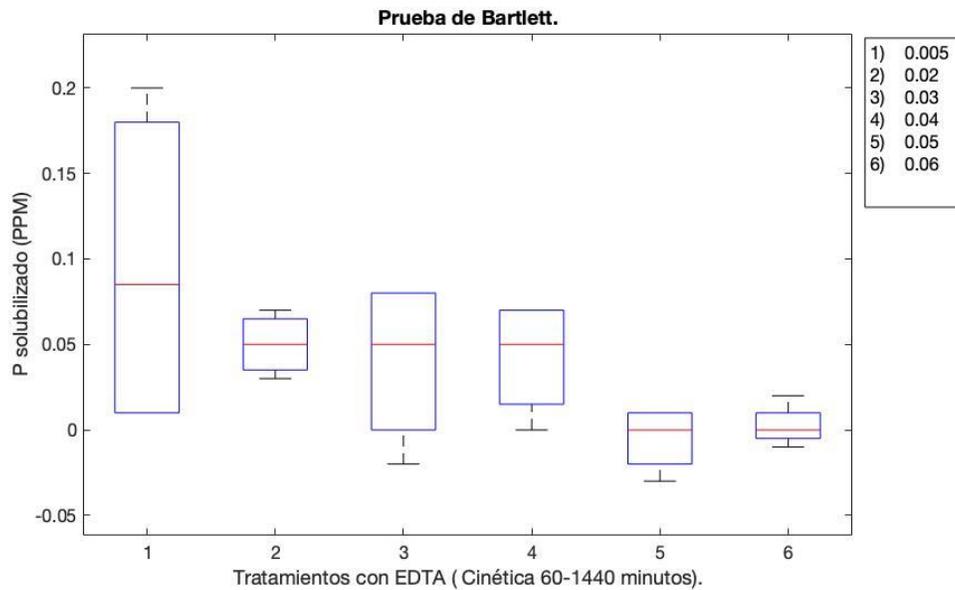


Ilustración A-11 Test de Bartlett – Avance de reacción, **60 – 1440min.**

Cuadro A-6 Prueba de Kruskal-Wallis – Avance de reacción, **60 – 1440min.**

Kruskal-Wallis ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	460.75	5	92.15	9.3	0.0975
Error	678.25	18	37.6806		
Total	1139	23			

El valor de $p < \chi^2$ indica que se rechaza la hipótesis nula con un valor de significancia del 1%. Por tanto, los valores obtenidos para los tratamientos no pertenecen a una misma distribución de probabilidad (Ilustración A-12).

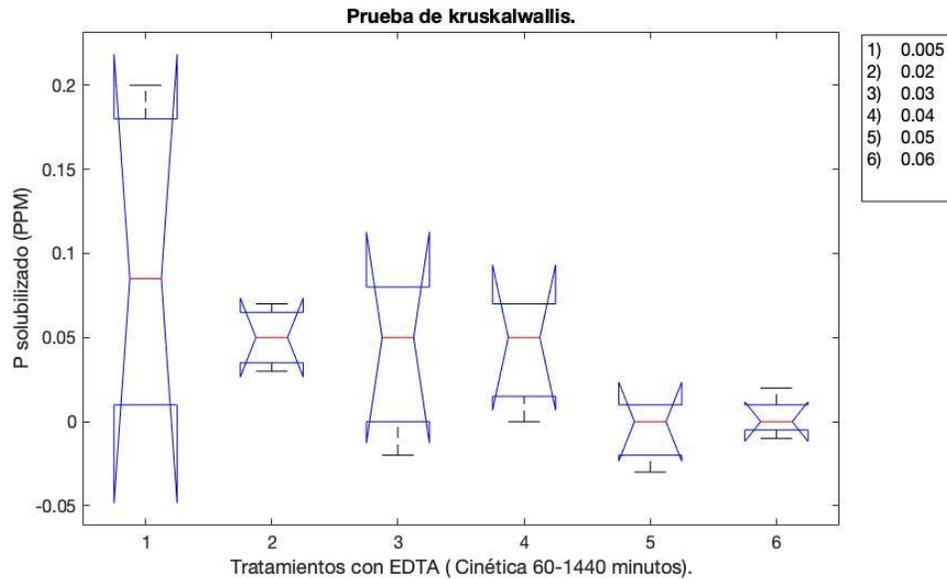


Ilustración A-12 Test de Kruskal-Wallis – Avance de reacción, **60 – 1440min.**

Anexo A4. Análisis estadístico de los resultados experimentales del tratamiento biológico.

Cuadro A-7 Prueba de Bartlett de valores múltiples de los tratamientos biológicos: a. por grupo, b. por replica.

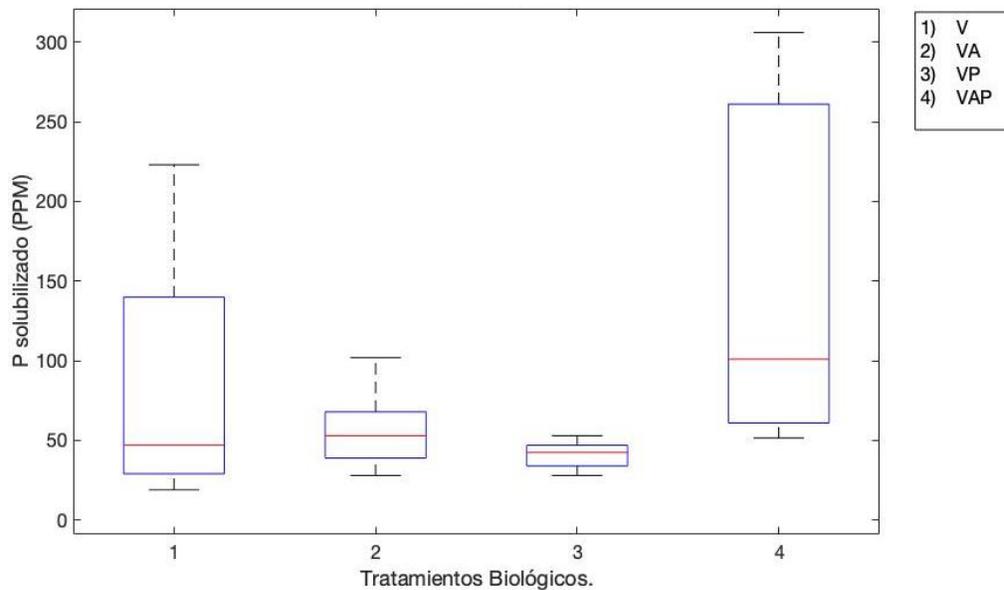
Group Summary Table			
Group	Count	Mean	Std Dev
1	18	75.022	63.4186
2	18	55.628	19.8503
3	18	41.561	7.9789
4	18	140.878	97.4642
Pooled	72	78.272	59.1162
Bartlett's statistic	83.755		
Degrees of freedom	3		
p-value	0		

a.

Group Summary Table			
Group	Count	Mean	Std Dev
1	6	32.017	12.4532
2	6	152.683	49.8975
3	6	40.367	11.472
4	6	35.7	5.2517
5	6	62.75	8.9986
6	6	68.433	22.2927
7	6	44.6	4.4272
8	6	43.017	8.7408
9	6	37.067	9.0877
10	6	69.767	17.3507
11	6	105.167	37.3653
12	6	247.7	96.4812
Pooled	72	78.272	34.8406
Bartlett's statistic	92.0634		
Degrees of freedom	11		
p-value	0		

b.

El valor menor de $p < Bartlett$ en ambos casos indica que se rechaza H_0 de manera que al menos un grupo o replica tiene una varianza diferente. En la (Ilustración A-13) se presentan un diagrama de cajas de los resultados.



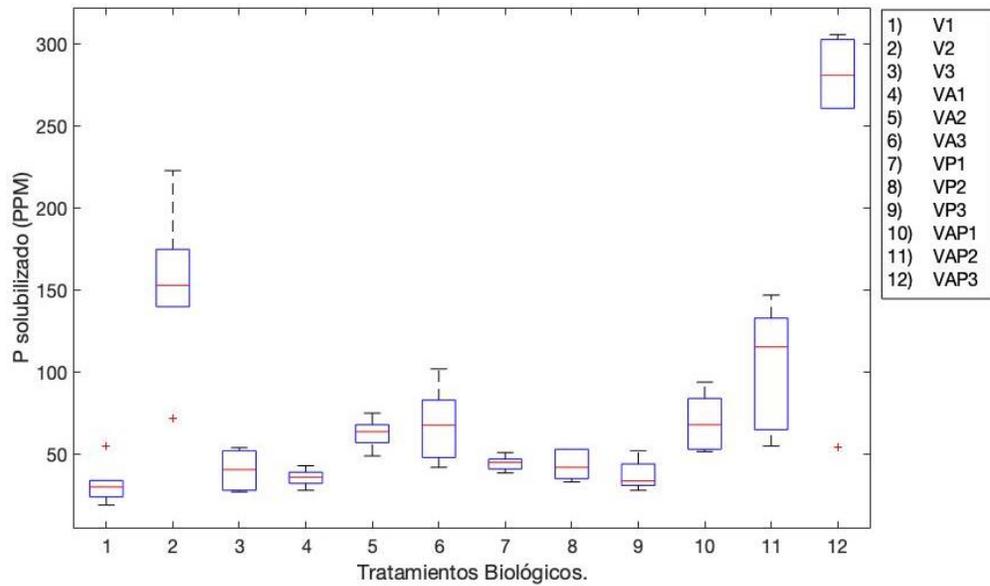


Ilustración A-13 Test de Bartlett – Tratamientos biológicos: a. por grupo b. por réplica.

Cuadro A-8 Prueba de Kruskal-Wallis – Tratamientos biológicos a. por grupos, b. por replicas.

Kruskal-Wallis ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	10660.2	3	3553.4	24.35	2.11456e-05
Error	20427.3	68	300.4		
Total	31087.5	71			

a.

Kruskal-Wallis ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	23990.9	11	2180.99	54.79	8.45862e-08
Error	7096.6	60	118.28		
Total	31087.5	71			

b.

El valor de $p < \chi^2$ en ambos casos, indica que se rechaza la hipótesis nula con un valor de significancia del 1%. Por tanto, los valores obtenidos por grupos o por réplicas, no pertenecen a una misma distribución de probabilidad. En la (Ilustración A-14) se presentan un diagrama de cajas de los resultados.

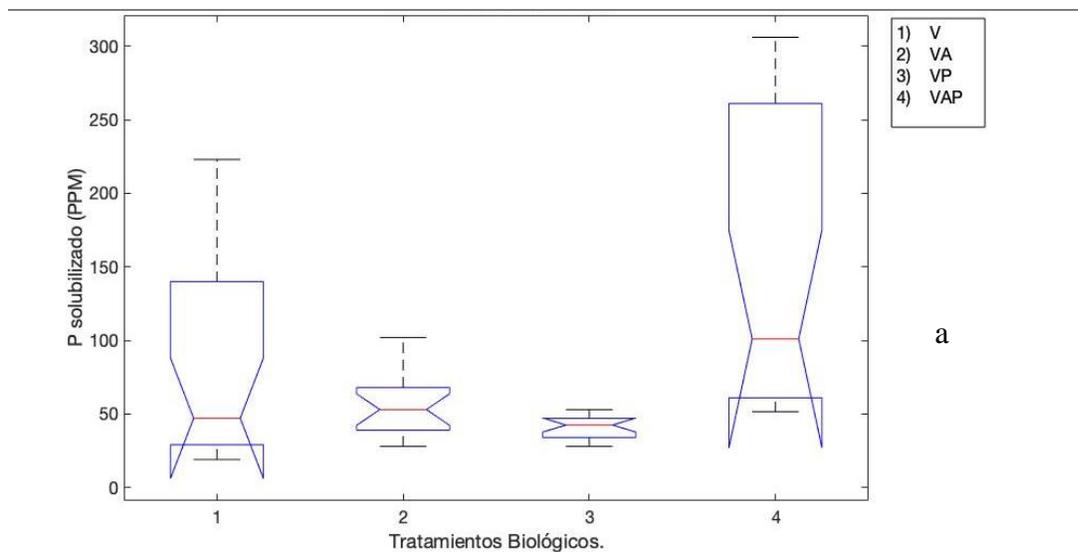


Ilustración A-14 Test de Kruskal-Wallis - Tratamientos biológicos: a. por grupos, b. por réplicas.

Anexo A5. Seguimiento de los tratamientos biológicos - Fotografías.

Semana 1

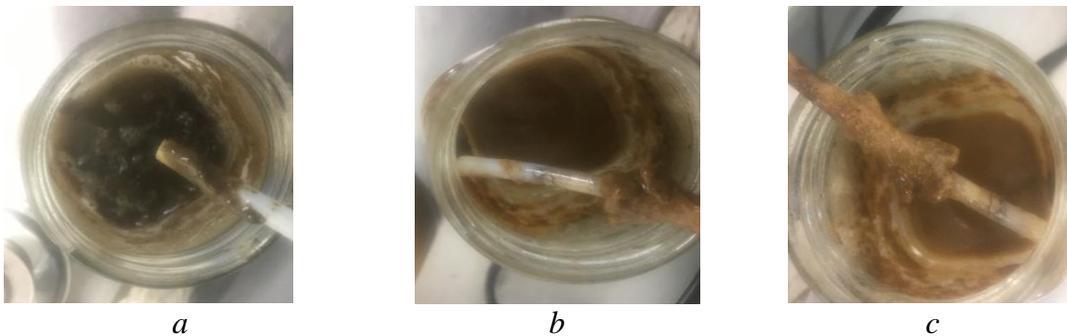


Ilustración A 15. Semana 1: a) V1, b) V2, c) V3

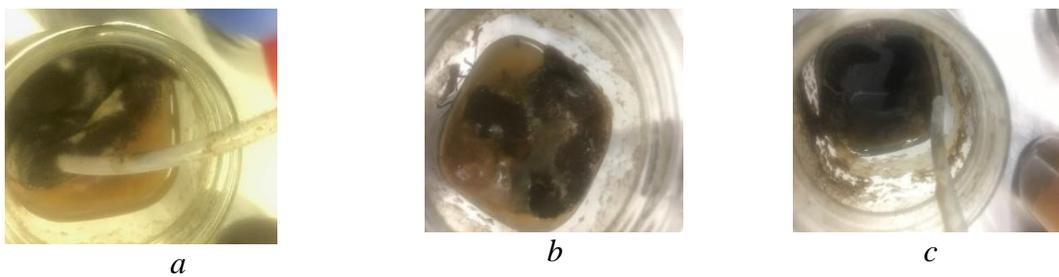


Ilustración A 16. Semana 1: a) VA1, b) VA2, c) VA3



Ilustración A 17. Semana 1: a) VAP1, b) VAP2



Ilustración A 7. Semana 1: VP1

Semana 2.



Ilustración A 8. Tratamientos V semana 2



Ilustración A 20. Tratamientos VA semana 2



Ilustración A 21. Tratamientos VAP semana 2



Ilustración A 22. Tratamientos VP semana 2



a



b



c

Ilustración A 23. Tratamientos con vinazas: a) V1, b) V2, c) V3



a



b



c

Ilustración A 24. Tratamientos VA semana 2: a) VA1, b) VA2, c) VA3



a

b

c

Ilustración A 25. Tratamientos VA semana 2: a) VAP1, b) VAP2, c) VAP3



a

b

c

Ilustración A 26. Tratamientos VP semana 2: a) VP1, b) VP2, c) VP3

Semana 3



Ilustración A 27. Tratamientos V semana 3



Ilustración A 9. Tratamiento VA semana 3



Ilustración A 29. Tratamientos VAP semana 3



Ilustración A 30. Tratamientos VP semana 3



a

b

c

Ilustración A 31. Tratamientos V semana 3: a) V1, b) V2, c) V3



a

b

c

Ilustración A 32. Tratamiento VA semana 3: a) VA1, b) VA2, c) VA3



a

b

c

Ilustración A 33. Tratamientos VAP semana 3: a) VAP1, b) VAP2, c) VAP3



a

b

c

Ilustración A 34. Tratamientos VP semana 3: a) VP1, b) VP2, c) VP3

Anexo A6. Algunas imágenes de archivo



Ilustración A 35. procedimiento de inoculación de hongos en los tratamientos.



Ilustración A 36. Afloramiento del Hongo *Penicillium* sp sobre la vinaza



Ilustración A 37. Lectura de absorbancia en el espectroscopio

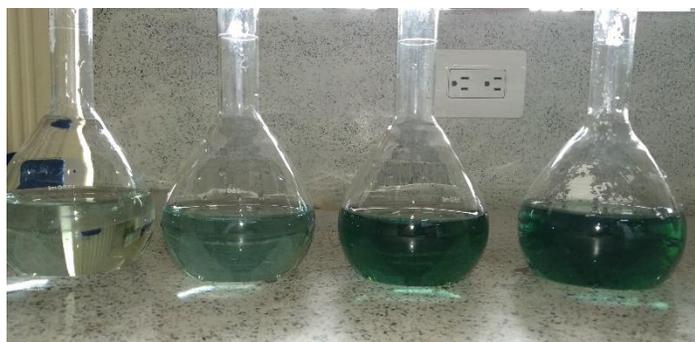


Ilustración A 10. Colorimetría virada al azul de los análisis en las muestras biológicas.



Ilustración A 11. Crecimientos de diferentes hongos en la vinaza de PC.



Ilustración A 40. Preparación de vinaza de PC para los tratamientos



Ilustración A 41. Ensayos de cultivos de *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp sobre vinazas



Ilustración A 42. Tamizado de la RF.



Ilustración A 43. Clasificación de las fracciones de la RF.



Ilustración A 44. Proceso de inoculación de los tratamientos biológicos



Ilustración A 45. Preparación de muestras para análisis



Ilustración A 46. Extracción de muestras biológicas

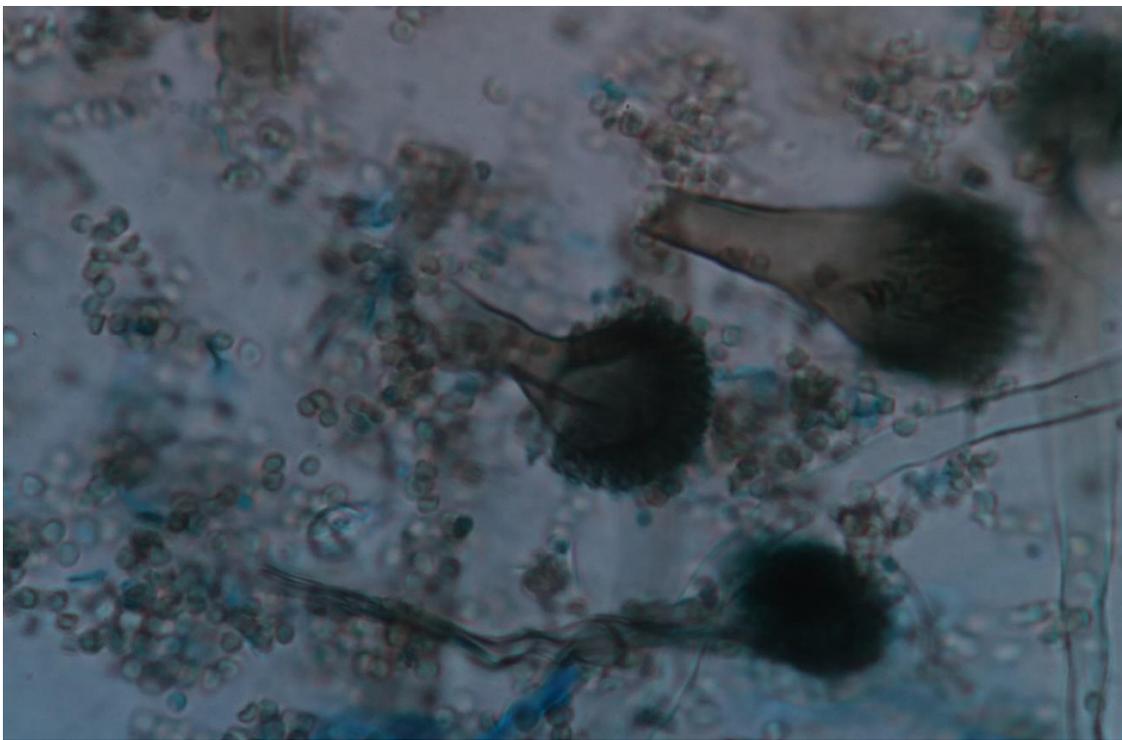


Ilustración A 47. Conidióforos estropeados de *Aspergillus niger*, variedad *A. fumigatus*

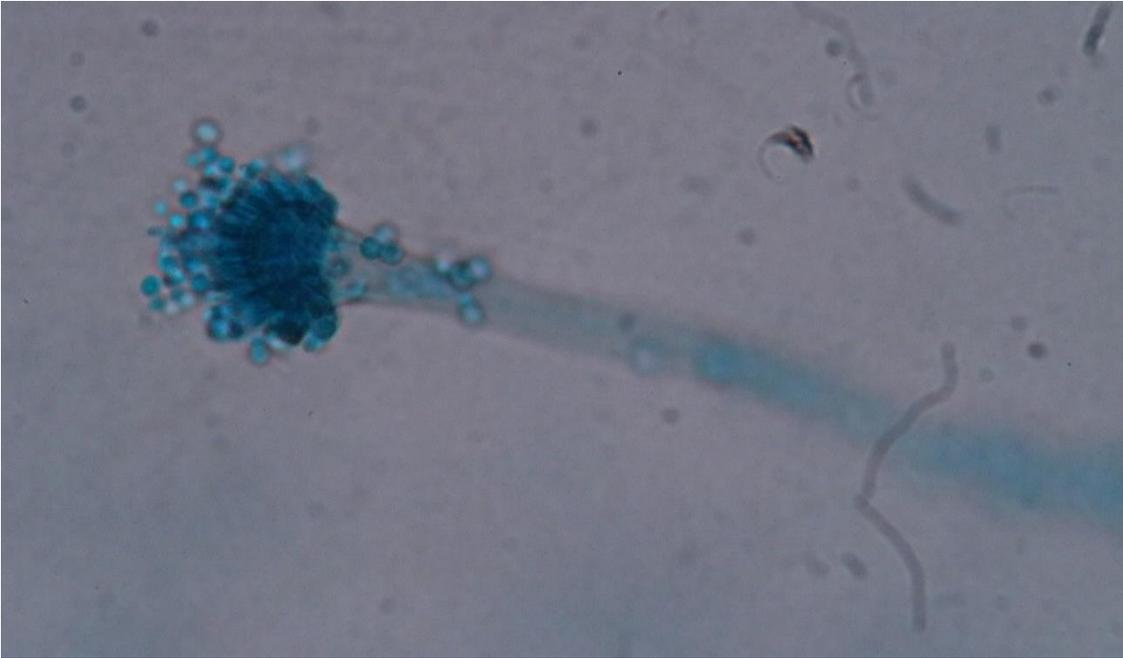


Ilustración A 12. Conidióforo del hongo *Penicillium* sp, tomada en el laboratorio de química ambiental de la Corhuila.

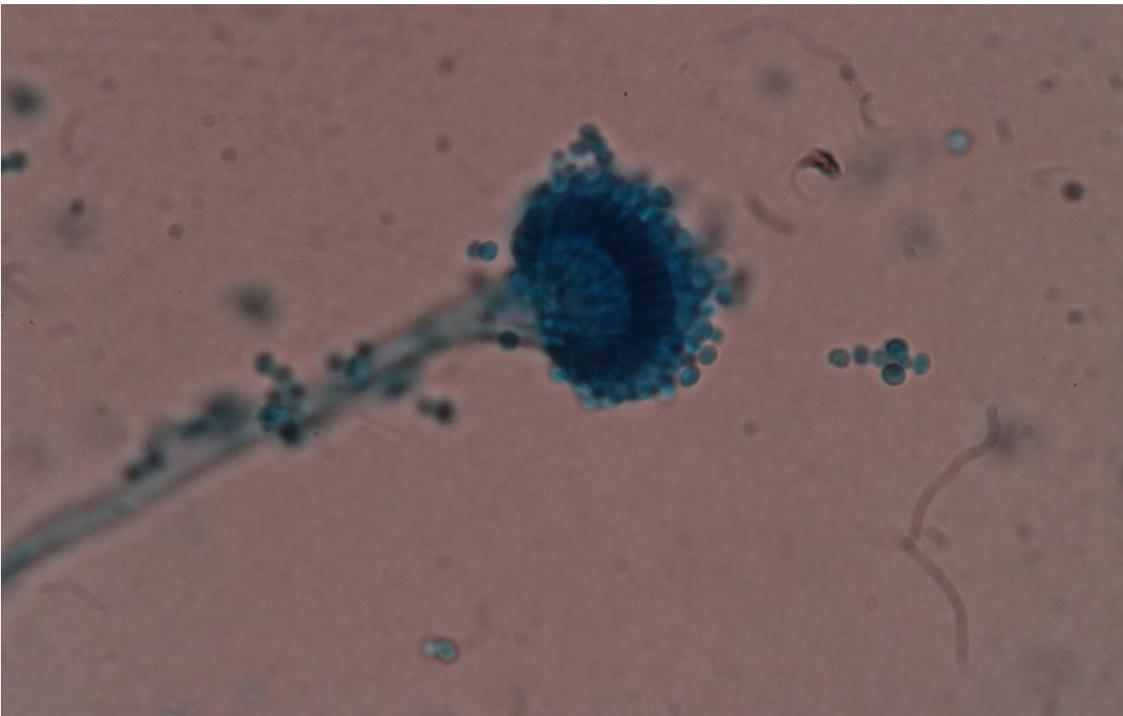


Ilustración A 13. Conidióforo del hongo *Penicillium* sp, tomada en el laboratorio de química ambiental de la Corhuila.

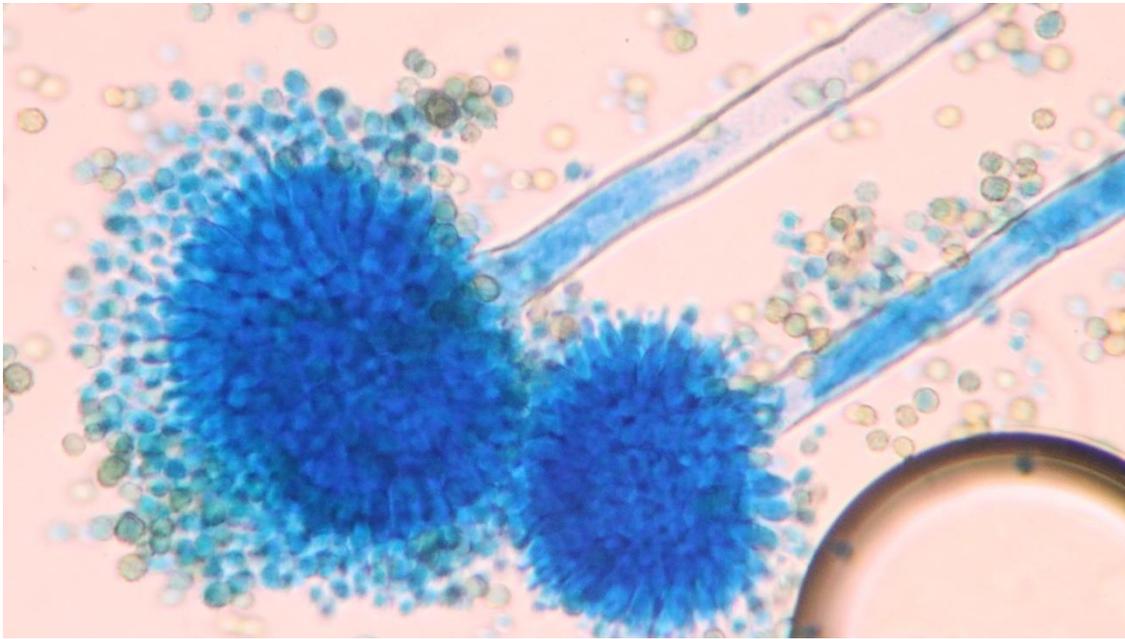


Ilustración A 50 Conidióforo del hongo *Aspergillus niger*, tomada en el laboratorio de química ambiental de la Corhuila.

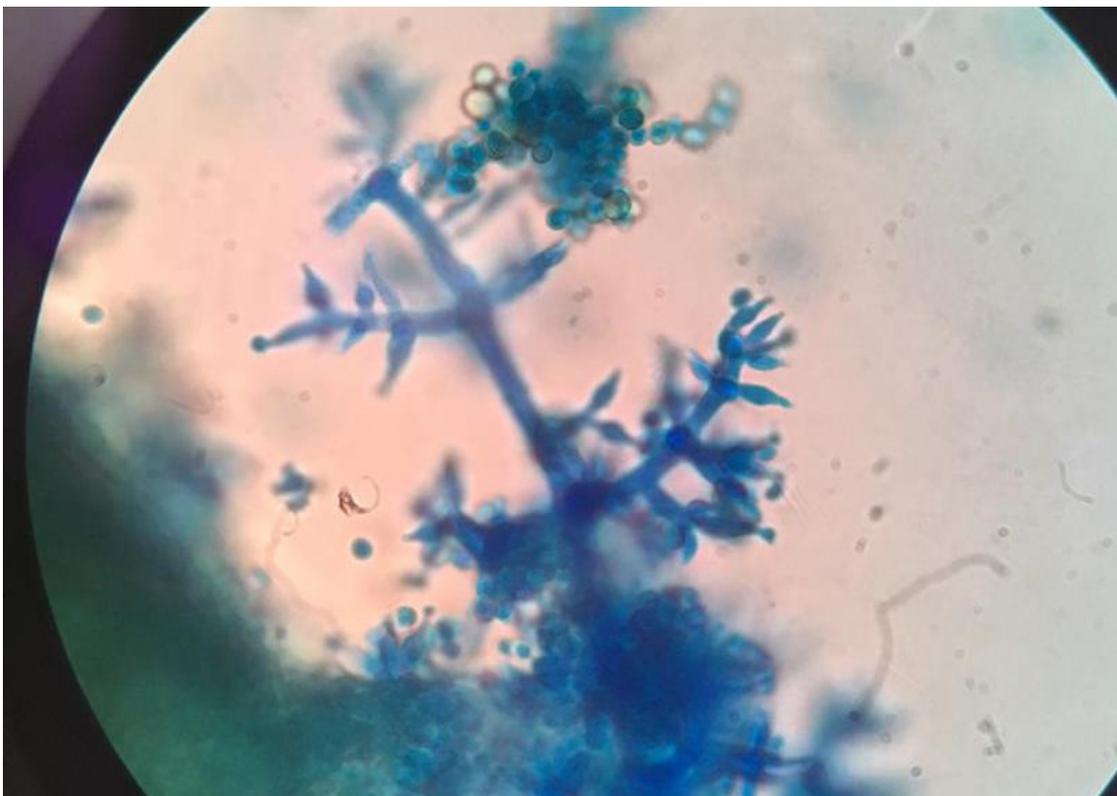


Ilustración A 51. Ramificaciones del hongo *Penicillium* sp

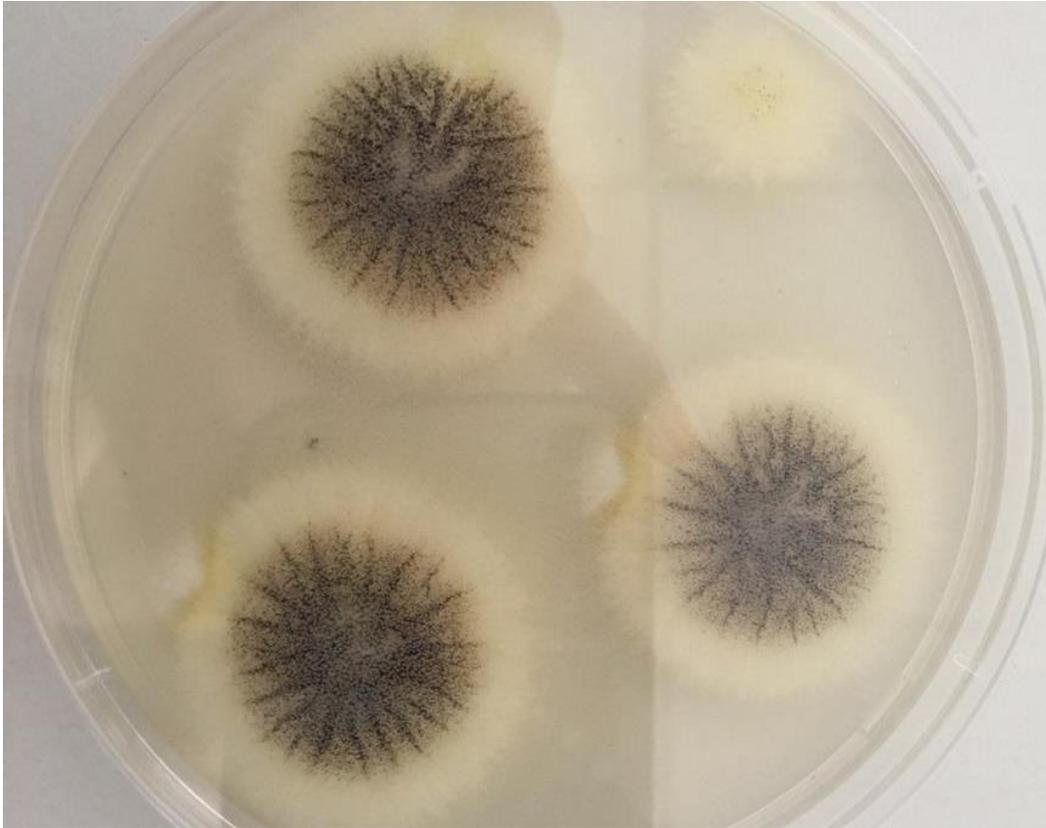


Ilustración A 52. Colonias de *Aspergillus niger* sobre MEA

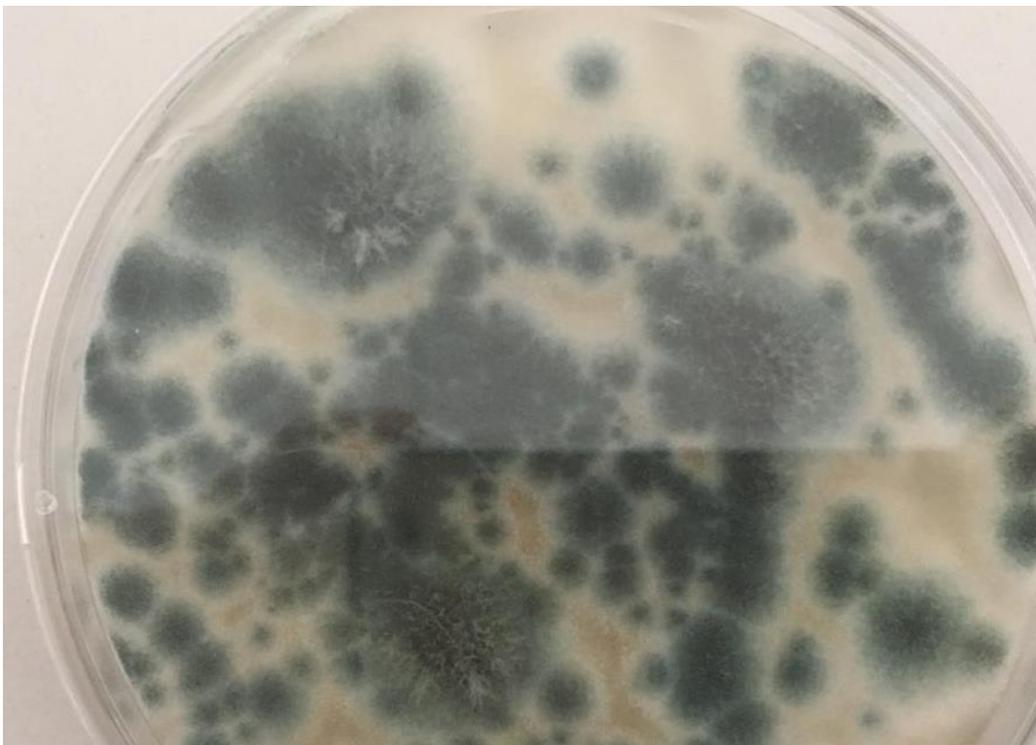


Ilustración A 53. Colonias de *Penicillium* sp sobre MEA (vista al reverso)



Ilustración A 54. Visita a planta de Fosfatos del Huila SA



Ilustración A 55. visita a mina sinclinal Media Luna – Aipe (Huila)



Ilustración A 56. Recorrido de los niveles 6, 7 y 8 de la mina sinclinal Media Luna – Aipe

Aprender a investigar es difícil, pero es hermoso y apasionante...