

## Solubilización de fosfato inorgánico por acción de ácido sulfúrico biogenerado.

E Donati<sup>1,2</sup> y G Curutchet<sup>1</sup>

1 Química General e Inorgánica, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. CC 31, 1900 La Plata, Argentina.

2 Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina

Recibido: 23 de Septiembre de 1994. Aceptado: 3 de Marzo de 1995.

### RESUMEN

En la obtención de fertilizantes fosfatados es habitual el uso de ácido sulfúrico en la solubilización del fósforo a partir de apatitas. El ácido sulfúrico, que suele encarecer estos procesos a nivel industrial, puede generarse por acción sobre azufre elemental de un microorganismo mesófilo como el *Thiobacillus thiooxidans* a un costo mucho menor. En este trabajo estudiamos el crecimiento bacteriano y la productividad de ácido sulfúrico en cultivos de *Thiobacillus thiooxidans* sobre cantidades crecientes de azufre elemental y su aplicación en la solubilización de fósforo de un sistema modelo como el fosfato tricálcico.

**Palabras claves:** *Thiobacillus thiooxidans*, oxidación de azufre, ácido sulfúrico, solubilización de fosfato, fertilizantes

### Dissolution of inorganic phosphate by biological generated sulfuric acid

#### SUMMARY

Sulfuric acid is common used for apatites dissolution in the production of phosphates fertilizers. The sulfuric acid may be generated by the action of *Thiobacillus thiooxidans*, a mesophilic bacterium that grow on elemental sulphur. That is why the cost of production decreases. In this paper, cell growth, sulfuric acid productivity and its application in the dissolution of phosphates, were studied.

**Key words:** *Thiobacillus thiooxidans*, oxidation of sulfur, sulfuric acid, dissolution of phosphate, fertilizers

## INTRODUCCION

El *Thiobacillus thiooxidans* es un microorganismo mesófilo y quimioautotrófico que obtiene su energía a través de la catálisis oxidativa de compuestos reducidos de azufre (azufre elemental, sulfuros, etc). En la oxidación de estos compuestos, donde el oxígeno molecular es el último aceptor electrónico, generalmente se forman una serie de especies intermedias (sulfito y tiosulfato en mayor proporción) que han sido utilizadas en diversas aplicaciones debido a sus características reductoras (Shrihardi *et al* 1993; Porro y Tedesco 1990, Porro *et al* 1990); en presencia de la bacteria, la oxidación continúa hasta formar ácido sulfúrico lo que permite reducir el pH del cultivo a valores incluso menores a 1,0 (Imai 1978).

El ácido sulfúrico generado de este modo, a partir de una fuente relativamente barata como el azufre elemental, puede ser utilizado con diferentes fines (Imai 1978, Schröter and Sand 1992); sin embargo, resulta particularmente atractiva su aplicación para la solubilización de fósforo a partir de rocas fosfáticas con el fin de preparar fertilizantes como el superfosfato simple o normal.

En este trabajo se estudió el crecimiento en frascos agitados del *T. thiooxidans* sobre cantidades crecientes de azufre elemental siguiendo la evolución de los cultivos a través de la población bacteriana en solución y de la productividad de ácido sulfúrico. Además, se estudió la solubilización de fósforo a partir de un sistema modelo como el fosfato tricálcico provocada por el ácido biogenerado en sistemas en los cuales se cultivó *T. thiooxidans*.

## MATERIALES Y METODOS

### Medio de cultivo

En los ensayos de crecimiento bacteriano se utilizó medio de Imai (Imai 1978) consistente en una mezcla de sales minerales con un suplemento de azufre con un pH inicial igual a 2,0 (ajustado por agregado de solución de ácido sulfúrico 1,8 M). Para los ensayos de solubilización de fósforo se modificó ligeramente el medio disminuyendo la concentración de fosfatos presentes y eliminando la presencia de calcio. El medio modificado consistió en 66 mg de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 35 mg de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 123 mg de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  por litro de solución.

### Cepa de *Thiobacillus thiooxidans*

Se utilizó una cepa de *T. thiooxidans* cedida por la Dra. V. Fridman (Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Sao Paulo, Brasil) sistematizada como Tth04. La cepa era habitualmente repicada (en frascos agitados a 180 rpm y termostatizados a 28°C) en el medio mencionado más arriba. Los inóculos utilizados en las experiencias se obtuvieron centrifugando (4000 rpm por 20 minutos), previo filtrado del azufre, un cultivo de *T. thiooxidans* en etapa exponencial y resuspendiéndolo en medio de cultivo estéril. La población bacteriana final en los inóculos utilizados fue de  $2 \times 10^9$  bact.ml<sup>-1</sup>.

### Crecimiento en frascos agitados

Se realizaron estudios de crecimiento en frascos agitados (mantenidos en agitación rotatoria a 180 rpm y termostatizados a 28°C) sobre diferentes cantidades de azufre elemental en polvo: 0,2 g, 0,5 g, 1,0 g, 1,5 g y 2,0g por cada 100 ml de medio, lo que implica densidades de pulpa -porcentajes peso en volumen (p/v)- iguales a 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0% p/v.

### Solubilización de fósforo en frascos agitados

Se realizaron estudios de solubilización agregando 0,35 g de fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y 1 g de azufre elemental a 100 ml del medio descrito más arriba. También en este caso los frascos se mantuvieron en agitación rotatoria a 180 rpm y termostatizados a 28°C.

En ambos casos (experiencias de crecimiento sobre azufre y de solubilización de fósforo), cada sistema fue inoculado al 5% v/v. En los sistemas estériles fue reemplazado el inóculo por un volumen igual de solución al 2% p/v de timol en metanol. Todos los ensayos realizados en frascos agitados fueron realizados por duplicado.

### Determinaciones analíticas

El crecimiento bacteriano (analizado a través de la generación de ácido sulfúrico) fue seguido mediante la titulación, con soluciones patrones de NaOH 0,01 Normal, de muestras de los cultivos extraídas periódicamente.

La solubilización de fósforo fue seguida por la determinación de la concentración de ion calcio en solución por espectrofotometría de absorción atómica utilizando un equipo Metrolab 4200 con lámpara específica de cátodo hueco.

### Determinación de la población bacteriana

La población bacteriana en solución (no adherida) fue determinada en todos los sistemas inoculados por conteo bacteriano en una cámara de Petroff-Haüser utilizando un microscopio Nikon equipado con dispositivo de contraste de fase. Todos los conteos fueron realizados por duplicado y con una dispersión no mayor al 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En las Figuras 1 y 2 se muestran las

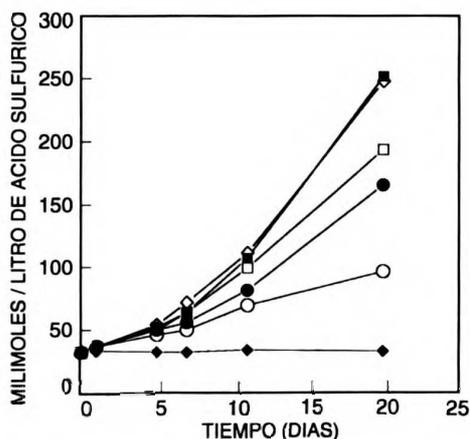


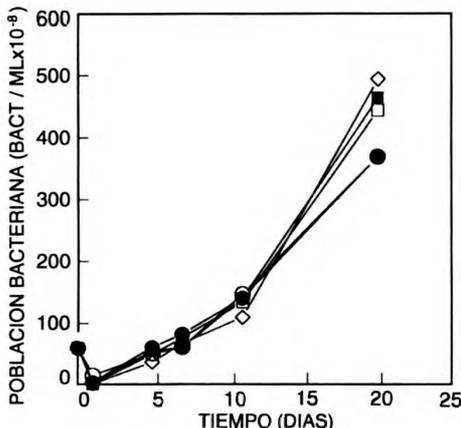
Figura 1: Producción de ácido sulfúrico en cultivos de *Thiobacillus thiooxidans* sobre cantidades variables de azufre elemental

Sulfuric acid production by *Thiobacillus thiooxidans* in cultures on variable amounts of elemental sulfur

- 0,2 g de azufre - Inoculado
- 0,5 g de azufre - Inoculado
- 1,0 g de azufre - Inoculado
- 1,5 g de azufre - Inoculado
- ◇ 2,0 g de azufre - Inoculado
- ◆ 2,0 g de azufre - Estéril

poblaciones bacterianas y la concentración de ácido en función del tiempo para los cultivos de *T. thiooxidans* sobre azufre en frascos agitados. Los valores de productividad se muestran en la Tabla 1; los mismos fueron calculados a partir de las diferencias entre las concentraciones iniciales y finales (luego de 20 días de crecimiento) de ácido sulfúrico.

Resulta interesante observar que la cinética de producción de ácido se incrementa a medida que se aumenta la cantidad de azufre adicionado hasta alcanzar un valor límite (1,5% p/v de densidad de pulpa) a partir del cual prácticamente no hay diferencias en productividad. Esto puede interpretarse



**Figura 2:** Población bacteriana no adherida presente en cultivos de *Thiobacillus thiooxidans* sobre cantidades variables de azufre elemental

Unattached bacterial population in cultures of *Thiobacillus thiooxidans* on variable amounts of elemental sulfur

- 0,2 g de azufre - Inoculado
- 0,5 g de azufre - Inoculado
- 1,0 g de azufre - Inoculado
- 1,5 g de azufre - Inoculado
- ◇ 2,0 g de azufre - Inoculado

**Tabla 1:** Productividad de ácido sulfúrico en cultivos de *Thiobacillus thiooxidans* sobre cantidades variable de azufre elemental luego de 20 días

Sulfuric acid productivity by *Thiobacillus thiooxidans* in cultures on variable amounts of elemental sulfur after 20 days

Densidad de pulpa en azufre elemental (% p/v)	Productividad volumétrica mmoles (litro.día) <sup>-1</sup>
0,2	3,3
0,5	6,9
1,0	8,4
1,5	11,5
2,0	11,3

\*: dispersión 0,2

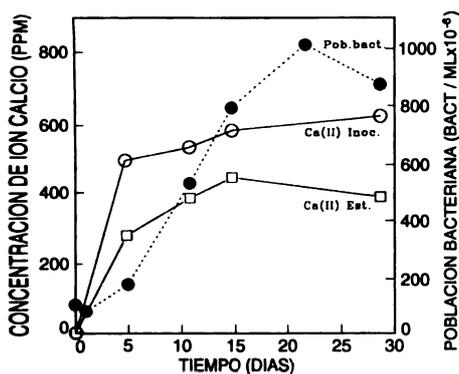
considerando que, debido a que la oxidación del azufre es un proceso que ocurre en la superficie del mismo, a partir de cierto valor de densidad de pulpa la superficie expuesta por el sustrato deja de ser limitante. El número de células bacterianas en solución no muestran una diferencia tan marcada cuando varía la cantidad de azufre presente lo cual debe adjudicarse a una mayor población bacteriana adherida al sólido debido al incremento de la superficie expuesta.

En la Figura 3 se observa la disolución de fósforo (a través de la concentración de calcio liberado) a partir de fosfato tricálcico producida en los sistemas inoculados y estériles.

En el sistema estéril, luego de 30 días de cultivo, se observa una disolución del 27% del fósforo total adicionado. Esta disolución se debe esencialmente a la acidez propia del medio (pH inicial 2,0) y se detiene a partir de los quince días, momento en el cual el pH alcanza el valor 3,6.

En el sistema inoculado en cambio, en el mismo lapso la extracción alcanza el 55% del fósforo total. La población bacteriana en el sistema inoculado tiende a estabilizarse e inclusive a descender a partir del día 22 lo cual es atribuido a los bajos valores de pH que se alcanzan en el sistema (menores a 1,0) y que inhiben el crecimiento bacteriano (Torma 1977); no obstante, la solubilización de fósforo sigue aumentando y probablemente continúe con un comportamiento semejante al sistema estéril hasta que el pH suba a valores semejantes a los alcanzados precisamente en dicho sistema.

El detenimiento de la acción bacteriana por los bajos valores de pH alcanzados puede evitarse aislando las bacterias de la roca fosfática a través del uso de biorreactores (de la Fuente *et al* 1994). En los biorreactores se genera inicialmente una película de bacterias



**Figura 3:**  
Lixiviación de fosfato tricálcico en cultivos de *Thiobacillus thiooxidans* en presencia de azufre

Leaching of calcium phosphate in cultures of *Thiobacillus thiooxidans* in presence of sulfur

- Concentración de ion calcio en solución - (sistema inoculado)
- Población bacteriana no adherida - (sistema inoculado)
- Concentración de ion calcio en solución - (sistema estéril)

adheridas sobre azufre elemental mediante crecimientos sucesivos del *T. thiooxidans* (reemplazando el medio cada vez que las bacterias alcanzan la etapa exponencial de crecimiento) hasta alcanzar una velocidad máxima de crecimiento medida por la generación de ácido sulfúrico. En estas circunstancias, se hace circular a través del biorreactor medio nuevo generándose el ácido que posteriormente pasará a través de la roca fosfática. Regulando la velocidad de circulación es

posible reciclar el medio nuevamente al biorreactor una vez que el pH haya ascendido lo suficiente como para no detener los mecanismos bacterianos.

### CONCLUSIONES

En base a los resultados presentados puede verse al *T. thiooxidans* como un microorganismo adecuado para generar ácido sulfúrico diluido a partir de la oxidación de azufre elemental en condiciones aeróbicas. La inoculación de un sistema con fosfato tricálcico y con el agregado de cantidades estequiométricas de azufre permite duplicar la lixiviación producida en los sistemas estériles. Esta habilidad del *T. thiooxidans* permitiría su potencial uso en la lixiviación ácida de rocas fosfáticas para la producción de fertilizantes como el superfosfato simple. De este modo se reducirían ostensiblemente los costos del proceso y se evitaría la manipulación de soluciones concentradas de ácido sulfúrico con la consecuente disminución de su impacto ambiental. Adicionalmente, la limitación en la velocidad de bio-oxidación del azufre provocada por la magnitud de la superficie expuesta (consistente con la necesidad de adherencia bacteriana previa) y/o por los bajos pH alcanzados, sugiere la posibilidad de utilizar los biorreactores, usando una gran superficie de azufre expuesta saturada de bacterias adheridas con el fin de producir ácido sulfúrico en forma continua y, eventualmente, en forma separada del sistema donde ocurre la disolución ácida del fósforo.

Donati y Curutchet, Solubilización de fosfato inorgánico por acción de ...

## BIBLIOGRAFIA

- de la Fuente V, P Chiacchiarini, T Lavalle, A Giaveno, E Donati y P Tedesco** (1994) Uso combinado de dos biorreactores en la biolixiviación de un mineral sulfurado de cobre. *Rev Metal Madrid* 30: 1-6
- Imai K** (1978) On the mechanism of bacterial leaching. En: *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena* Eds. L Murr, A Torma and J Brierley, Academic Press New York 275-294
- Porro S y P Tedesco** (1990) Biolixiviación de un mineral de manganeso y plata. *Rev Metal Madrid* 26: 36-40
- Porro S, E Donati and P Tedesco** (1990) Bioleaching of manganese (IV) oxide and application to its recovery from ores. *Biotechnol Lett* 12: 845-850
- Schröter A and W Sand** (1992) Enhanced leaching of a sulphide ore by biological acidification. *Biorecovery* 2: 69-81
- Shrihari S, R Bhavaraju, J Modak, R Kumar and K Gandhi** (1993) Dissolution of sulphur particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: substrate for unattached cells. *Biotechnol Bioeng* 41: 612-616
- Torma A** (1977) The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical processes. *Adv Biochem Eng* 6: 1-37