

JELENA AVDALOVIĆ¹, VLADIMIR BEŠKOSKI²,
DANIJELA RANDELOVIĆ³, MIRJANA STOJANOVIĆ¹,
SNEŽANA ZILDŽOVIĆ¹, MIROSLAV VRVIĆ⁴

Originalni naučni rad
UDC:622.765.061:622.364.1(497.11)

Ispitivanje mogućnosti bioluženja fosfora iz fosfatne rude sa ležišta Lisina

Postupci rastvaranja fosfora iz nerastvornih fosfatnih ruda pomoću acidofilnih autotrofa i heterotrofa spadaju u veoma bitna istraživanja, zbog moguće primene ovih ruda kao đubriva, čija je upotreba ekonomski i ekološki prihvatljivija od industrijskih fosfatnih đubriva.

*Predmet ovog rada je bio da se ispita mogućnost rastvaranja fosfora iz fosfatne rude sa ležišta Lisina (Bosilegrad), u laboratorijskim uslovima, dejstvom sumporne kiseline generisane pomoću bakterijske kulture *Acidithiobacillus* (At.) *ferrooxidans*, izolovane i selekcionisane sa jalovišta površinskog kopa rudnika bakra u Boru.*

Cilj eksperimenta je da se utvrdi da li je moguće rudu sa navedenog ležišta u kombinaciji sa ispitivanom bakterijskom kulturom koristiti kao prirodno đubrivo.

*Dobijeni rezultati pokazuju da se tokom eksperimenta rastvara fosfor iz ispitivane rude pod uticajem *At. ferrooxidans* i da je stepen rastvaranja 24,5 %, dok je rastvaranje fosfora u kontrolnoj suspenziji (bez *At. ferrooxidans*) iznosilo 7,2 %.*

*Uticaj *At. ferrooxidans* na rastvaranje fosfora je potvrđen, tako da dalja istraživanja treba usmeriti na ispitivanja mikrobiološkog luženja mešavina apatita sa sulfidnim supstratima, zbog eventualne primene vezane za poboljšanje kvaliteta alkalnih zemljišta.*

Ključne reči: fosfatna ruda, luženje, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

1. UVOD

Fosfatne rude su glavni izvor fosfora u prirodi i koriste se kao sirovine za proizvodnju komercijalnih fosfatnih đubriva i elementarnog fosfora koji se upotrebljavaju u hemijskoj industriji i industriji hrane. Rude se sastoje od nerastvornog kalcijum fosfata poznatog kao apatit.

Opšta formula je $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl})$ i u zavisnosti od krajnjeg člana apatit se označava kao hidroksi, fluoro ili hloro apatit [Rogers, 1999]. Da bi fosfor postao dostupan za biljku potrebno ga je prevesti u rastvorni oblik, što se u prirodi dešava u prisustvu velikog broja acidofilnih autotrofa i heterotrofa (bakterije, gljive i kvasci), koji su sposobni da rastvore nerastvorne fosfate zahvaljujući svojim metabolitima, neorganskim ili organskim kiselinama [Alam, 2002; Bojinova, 2008; Delvasto, 2008].

Fosfor je nezamenljiv u ishrani biljaka i nekim industrijskim primenama. Jedan je od esencijalnih hranljivih sastojaka koji igra brojne uloge u metabolizmu, rastu i razvoju biljaka. Ima gradivnu ulogu u makromolekulima kao što su nukleinske kiseline.

Adrese autora: ¹Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, ²IHTM Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu, ³IHTM Centar za mikroelektronske tehnologije i monokristale, Univerzitet u Beogradu, ⁴Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Rad primljen: 10. 04. 2012.

Takođe učestvuje i u transferu energije u metaboličkim putevima biosinteze i biodegradacije [Bhatti, 2010]. Zbog svega navedenog, zemljište se đubri sa različitim tipovima komercijalnih fosfatnih đubriva da bi se poboljšala njegova plodnost.

Postupci rastvaranja fosfora iz nerastvornih fosfata pomoću acidofilnih autotrofa i heterotrofa spadaju u istraživanja od velikog značaja u oblasti održivog upravljanja zemljištem i mogli bi u budućnosti postati alternativa skupoj fabričkoj proizvodnji veštačkih đubriva.

Cilj ovog rada je bio da se prouči mogućnost rastvaranja fosfora iz fosfatne rude u laboratorijskim uslovima, dejstvom sumporne kiseline generisane pomoću *At. ferrooxidans*.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Izolovanje čiste kulture *At. ferrooxidans*

Čiste kulture *At. ferrooxidans* su izolovane iz uzoraka uzorkovanih na lokalitetu odlagalište jalovine rudarskih radova površinskog kopa rudnika bakra u Boru poznata kao Veliki i Visoki Planir i akumulacionog jezera Robule. Broj ukupnih sumpornih bakterija je određivan na podlozi Rodine [Rodina, 1965], *At. ferrooxidans* na podlozi 9K [Silverman, 1959], anaerobnih *Thiobacillus denitrificans* na podlozi po Tejloru [Taylor, 1971], ukupnih mezofilnih hemoorganoheterotrofnih bakterija na hranljivom agaru

[Anonymus, 1995] i kvasaca i spora plesni na sladnom agaru [Anonymus, 1995]. Čiste kulture *At. ferrooxidans* su izolovane metodom serijskog razblaženja i najverovatnijeg broja MPN (The Most Probable Number) [Collins, 2004].

2.2. Mikroskopija atomskih sila (Atomic force microscopy (AFM))

Proučavanje morfoloških osobina površine trajnih preparata čiste kulture *At. ferrooxidans* rađeno je na instrumentu "AutoProbe CP-Research SPM", firme "TM Microscopes-Bruker", (SAD), uz korišćenje "Large Area" piezoelektričnog skenera čija je nominalna maksimalna površina skeniranja u horizontalnoj ravni 90 μm x 90 μm, dok je nominalna vrednost maksimalnog hoda u vertikalnom pravcu oko 6 μm. Merenja su izvedena u vazduhu primenom kontaktne AFM tehnike. Korišćena je Veeco Phosphorus (n)-doped Si kontaktna merna sonda, model MPP-31123-10 sa reflektujućim Al slojem i simetričnim vrhom. Ove merne gredice su pravougaonog oblika i njihova nominalna širina, dužina i debljina su 35 mm, 450 mm i 4 mm, respektivno. Konstanta krutosti korišćenih gredica je 0,9 N/m, dok je njihova rezonantna frekvencija 20 kHz. Debljina reflektujućeg aluminijskog sloja na zadnjoj strani gredice je 40nm. Gredica nema reflektujući sloj na strani na kojoj se nalazi vrh.

Slike su analizirane upotrebom dva softverska paketa: Image Processing and Data Analysis Version 2.1.15 i SMPLab Analysis softver.

2.3. Pripremanje trajnih preparata čiste kulture *At. ferrooxidans* za Mikroskopiju atomskih sila

Kontaktom tehnikom mikroskopije atomskih sila je analizirana kultura *At. ferrooxidans* u eksponencijalnoj fazi rasta dobijena trostrukim presejavanjem na podlozi 9K (28° C, 5 dana) i koncentrovana popuštanjem kroz membranski filter veličine pora 0,45μm. Biomasa dobijena iz 1dm³ podloge, opalescentno sluzave konzistencije, sa membrane je resuspendovana u 20 mL sterilne podloge 0K (podloga 9K bez gvožđa) i nanošena u vidu kapi na mikroskopsku pločicu. Ovako pripremljen preparat je nakon sušenja u eksikatoru analiziran.

2.4. Određivanje generacionog vremena

Generaciona vremena su određivana metodom najmanjih kvadrata, gde su vrednosti računane sa grafika pod pretpostavkom linearne zavisnosti logaritma broja mikroorganizama u funkciji vremena.

2.5. Određivanje brzine oksidacije

Brzina oksidacije supstrata, računata je preko promene u koncentraciji Fe(II)-jona u određenom vremenskom intervalu (oko 24 h), od koje je oduzimana

promena u koncentraciji Fe(II)-jona u kontroli (koja je posledica oksidacije kiseonikom) za isti vremenski period.

$$V_{ox} = (\Delta c \text{ Fe}^{2+} - \Delta c \text{ Fe}^{2+}_k) / \Delta t$$

2.6. Hemijska analiza fosfatne rude sa ležišta Lisina

Hemijska karakterizacija fosfatne rude sa ležišta Lisina urađena je konvencionalnom metodom, alkalnim stapanjem sa NaKCO₃ i rastvaranjem u HCl [Savić 1990].

Alkalni metali su određivani metodom atomske emisije plamene spektrofotometrije, Fe, Al, Ca, Mg i metali u tragu, metodom atomske apsorpcione plamene spektrofotometrije na uređaju Perkin Elmer AAS Analyst 300, a fosfor je određivan spektrofotometrijski u obliku žutog fosfomolibdatnog kompleksa na talasnoj dužini od 460 nm, na uređaju Spekol 1300.

2.7. Opis i postavka eksperimenta luženja

Eksperiment luženja fosfatne rude je izveden sa bakterijom *At. ferrooxidans* soj B4 u erlenmajerima zapremine 500ml sa 100ml podloge 9K [Silverman, 1959], pri početnoj vrednosti pH od 2,5 i gustini pulpe 1%(m/V)(1gr rude fosfata u 100ml rastvora) (28°C, 28 dana). Broj mikroorganizama je određen metodom najverovatnijeg broja [Collins, 2004]. Kao kontrola upotrebljena je istovetna suspenzija u kojoj su mikroorganizmi inaktivirani sterilizacijom. Eksperiment je izveden u triplikatu na horizontalnoj tresilici firme New Brunswick Scientific. Temperatura inkubacije je bila 28°C, pri 100 rpm. Svakih sedam dana je analiziran pH, broj mikroorganizama i koncentracija P₂O₅.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

3.1. Izolovanje čiste kulture *At. ferrooxidans* i morfološka analiza Mikroskopijom atomskih sila

Odlagalište jalovine rudarskih radova površinskog kopa rudnika bakra u Boru poznata kao Veliki i Visoki Planir, su najkarakterističniji deo ovog kompleksnog prostora. Sa lokaliteta Velikog i Visokog Planira i akumulacionog jezera Robule, uzorkovana su tri tečna (B₁, B₂, B₃) i dva čvrsta uzorka (B₄, B₅). Pokazatelji dejstva sumpornih bakterija na sulfidne supstrate gvožđa i bakra vidljivi su na terenu i na čvrstim i na tečnim uzorcima. Posledice se ogledaju prvenstveno u prisustvu trovalentnog gvožđa u vodi, što se ogleda u karakterističnoj crveno-mrkoj boji, kao i pojavama "plavih voda", odnosno rastvora bakar(II)-jona, što je vidljivo i pri dominantnom prisustvu gvožđe(III)-jona. Prisustvo sulfidnog gvožđa i njegova bakterijska oksidacija u gvožđe(III)-sulfat, odnosno hidroliza trovalentnog gvožđa i nastanak

sumporne kiseline rezultuju u masovnoj pojavi izluženih soli i "okera" kao i raspadanju stenske matrice.

Lokalitet borskog rudnika je u pogledu mikrobiološke komponente biogeocenoze tipičan primer za sulfidna ležišta, što se jasno vidi iz tabele 1.

Tabela 1 - Ukupan broj sumpornih bakterija i hemoorganoheterotrofnih mikroorganizama

	Sumporne bakterije			Heterotrofi	
	Ukupne sumporne bakterije	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Aerobne mezofilne hemoorganoheterotrofne bakterije	Kvasci i spore plesni
B₁*	3,7 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	<10	4,9 x 10 ³	1,2 x 10 ⁴
B₂*	7,1 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁵	<10	3,5 x 10 ²	2,0 x 10 ⁴
B₃*	4,5 x 10 ⁵	8,9 x 10 ⁴	<10	1,5 x 10 ³	4,2 x 10 ³
B₄**	1,5 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	<10	1,0 x 10 ¹	<10
B₅**	2,2 x 10 ⁶	9,4 x 10 ⁵	<10	1,7 x 10 ¹	6,8 x 10 ¹

*(CFU/g)

** (CFU/ml)

Dominantan mikroorganizam ovog lokaliteta je *At. ferrooxidans*. U svim uzorcima njegova brojnost je reda veličine 10⁵-10⁶ mL⁻¹ (g⁻¹). Prisustvo hemoorganoheterotrofa je samo dokaz da se svi biogehemijski ciklusi elemenata odvijaju istovremeno i svuda, sa manjim ili većim intenzitetom, što diktira hemijska komponenta biogeocenoze.

Pet zimogenih sojeva *At. ferrooxidans* B₁-B₅ su izolovani i održavani u podlozi 9K. Za eksperiment bioluženja su upotrebljavane fiziološki aktivne kulture u eksponencijalnoj fazi rasta dobijane višestrukim uzastopnim presejavanjem.

U tabeli 2. date su karakteristike izolovanih sojeva u pogledu generacionog vremena i brzine oksidacije gvožđe(II)-jona.

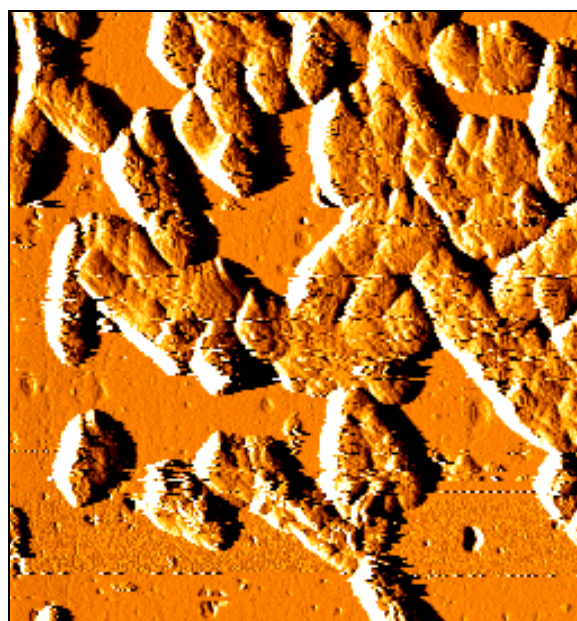
Tabela 2 - Brzina oksidacije Fe(II)-jona i generaciono vreme izolovanih sojeva

Oznaka soja	Brzina oksidacije (g/dm ³ /h)	Generaciono vreme (h)
B₁	0,23	8,1
B₂	0,16	20,1
B₃	0,15	20,1
B₄	0,25	7,1
B₅	0,17	15,4

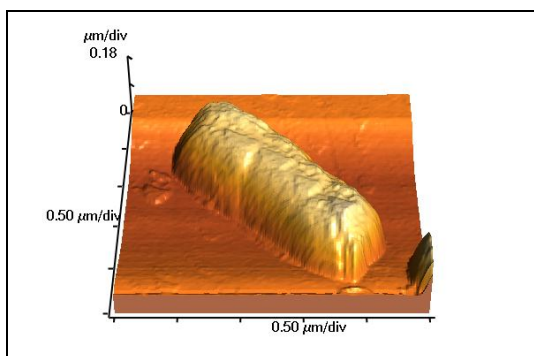
Soj B₄ je pokazao najveću aktivnost, tj. najkraće generaciono vreme (7,1 h) i najveću brzinu oksidaciju

gvožđe(II)-jona (0,25g/dm³/h) i stoga je poslužio u eksperimentima luženja fosfatne rude.

Izolovana čista kultura je analizirana mikroskopijom atomskih sila, kontaktnom tehnikom, kojom se postiže izuzetno visoka rezolucija snimaka u sve tri dimenzije što omogućava morfološku karakterizaciju uzorka. Fotomikrografije izolovanog soja B₄ u eksponencijalnoj fazi rasta i pojedinačne ćelije prikazani su na slikama 1. i 2.



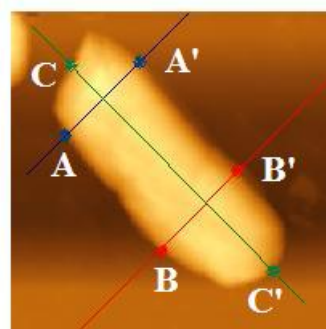
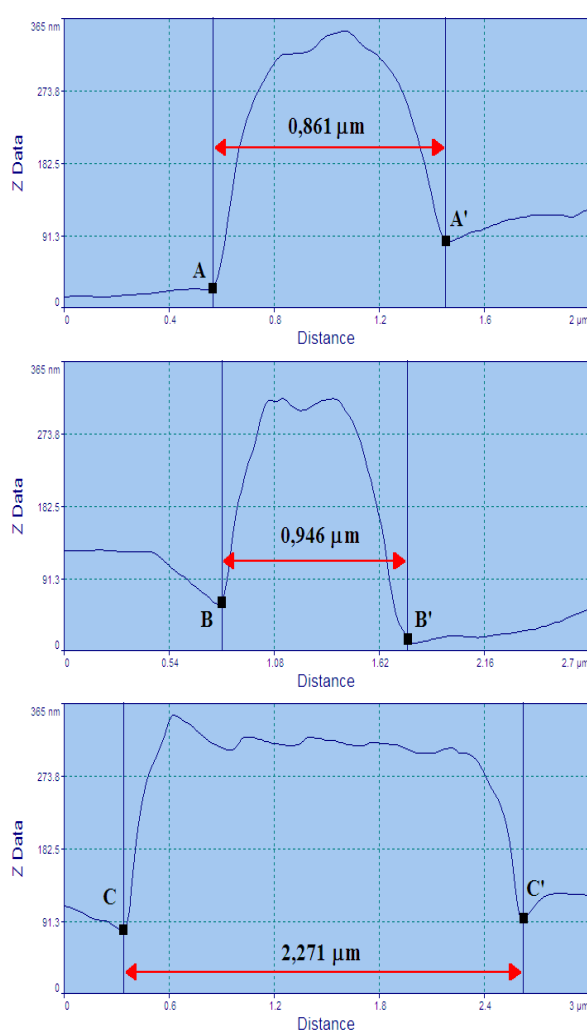
Slika 1 - Čista kultura *At. ferrooxidans* soj B₄ u eksponencijalnoj fazi rasta (2D prikaz topografije, površina snimanja 10 μm x 10 μm).



Slika 2 - Pojedinačna ćelija *At. ferrooxidans* soj B₄ (3D prikaz topografije, površina snimanja 2,5 μm x 2,5 μm).

Na glatkoj staklenoj površini mikroorganizmi *At. ferrooxidans* se uočavaju kao izdignuća štapićaste strukture sa zaobljenim krajevima. Uočava se sloj ćelija uniformne morfologije i dimenzija što je u skladu sa činjenicom da su analizirani mikroorganizmi u istoj fazi rasta.

Topografska analiza pojedinačne ćelije data je na slici 3. Proučavani su profili ćelije duž odabranih pravaca primenom softvera za linijsku analizu "Line Measure tool" softvera SPMLab Analysis.



Slika 3 - Topografska analiza pojedinačne ćelije (površina snimanja 2 μm x 2 μm).

Pojedinačna ćelija je dodatno analizirana softverski u cilju merenja dimenzija (slika 3), pri čemu je potvrđeno da su ćelije dužine $2,20 \pm 0,15$ μm i širine $0,87 \pm 0,10$ μm, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima [Peverzev, 1981; Vrvić, 1991; Kelly, 2000].

3.2. Hemijska analiza fosfatne rude i rezultati izluženja P_2O_5

Rezultati silikatne analize fosfatne rude sa ležišta Lisina dati su u tabeli 3.

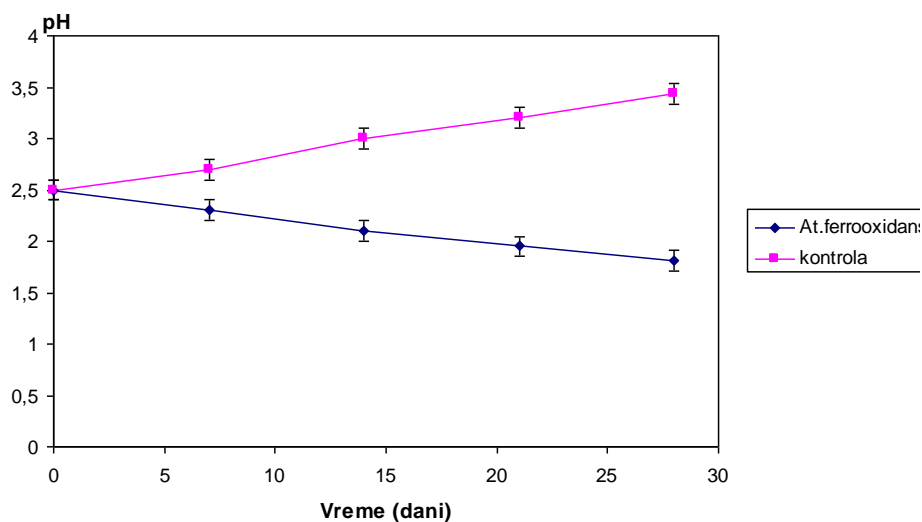
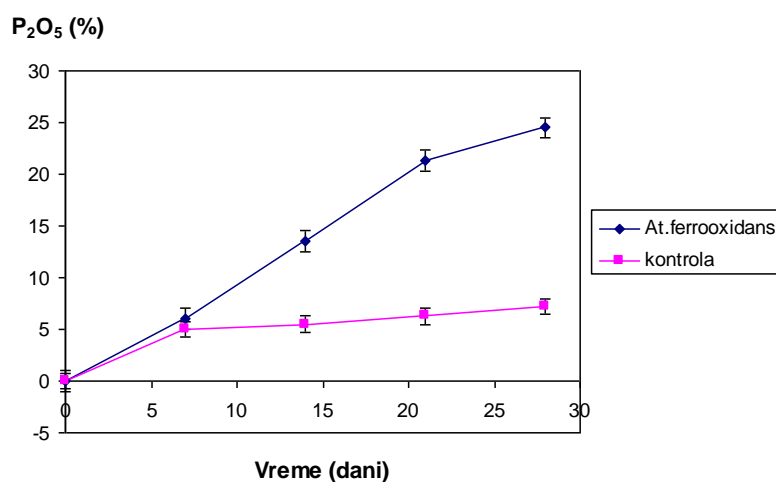
Tabela 3 - Silikatna analiza fosfatne rude sa ležišta Lisina

Element ili jedinjenje	Sadržaj %
P ₂ O ₅	14,4
Fe ₂ O ₃	4,0
Al ₂ O ₃	8,5
CaO	21,5
MgO	1,0
SiO ₂	44,9
K ₂ O	2,9
Na ₂ O	0,2
gubitak žarenja	2,6

Eksperiment luženja fosfatne rude čiji je prosečni sastav P₂O₅ iznosio 14,4 % izveden je sa bakterijskom kulturom *At. ferrooxidans*, koja kao izvor el-

ektrona za svoj metabolizam koristi FeSO₄ iz podloge, pri čemu nastaje Fe₂(SO₄)₃, koji hidrolizuje uz oslobađanje sumporne kiseline, što dovodi do smanjenja pH vrednosti u reakcionoj suspenziji i prevođenja fosfora iz fosfatne rude u rastvorni oblik. Početni broj *At. ferrooxidans* je bio 1,5x10⁶/ml. Vremenom se broj mikroorganizama povećavao tako da je sedmog dana eksperimenta iznosio 3,7x10⁶/ml, četrnaestog 9,6 x10⁶/ml, dvadesetprvog 1,7 x10⁷/ml, a na kraju eksperimenta 8,5x10⁷/ml, što ukazuje na to da fosfatna ruda u datoj koncentraciji u reakcionoj smeši nije toksičan supstrat za izolovani mikroorganizam.

Promena pH vrednosti i izluženja P₂O₅ u suspenziji sa bakterijama kao i u kontrolnoj suspenziji, određivana su na početku i nakon 7, 14, 21 i 28 dana eksperimenta. Dobijene vrednosti su prikazane na slikama 4 i 5.

Slika 4 - Promena pH vrednosti u kontrolnoj i u suspenziji sa *At. ferrooxidans* tokom inkubacije na tresiliciSlika 5 - Izluženje P₂O₅ tokom inkubacije na tresilici

Dobijeni rezultati pokazuju da je rastvaranje fosfora iz fosfatne rude povezano sa smanjenjem pH

vrednosti, tj. povećanjem koncentracije bakterijski generisane sumporne kiseline u rastvoru za luženje,

dok u kontrolnoj suspenziji (suspenzija bez *At. Ferrooxidans*) nema pada pH vrednosti, jer nema ni mikroorganizama koji bi generisali kiselinu.

Procenat izluženja P_2O_5 koji se može pripisati dejstvu *At. ferrooxidans* (tj. efektivno izluženje) se dobija oduzimanjem procenta izluženja P_2O_5 iz kontrolne suspenzije od procenta izluženja metala iz suspenzije sa *At. ferrooxidans* i iznosi 17, 3%.

4. ZAKLJUČAK

Početna istraživanja pokazuju da fosfatna ruda sa ležišta Lisina nije toksičan supstrat za *At. Ferrooxidans*, obzirom da je broj mikroorganizama veći na kraju eksperimenta ($8,5 \times 10^7$), nego na početku, kao i da dolazi do rastvaranja fosfora dejstvom biološki generisane kiseline u fermentacionoj tečnosti. Dobijeni rezultati će poslužiti kao polazna osnova za detaljnija ispitivanja mogućnosti mikrobiološkog luženja fosfatnih ruda u kombinaciji sa supstratima (kao što je npr. pirit), koji se pod uticajem *At. ferrooxidans* transformišu u sumpornu kiselinu neophodnu za prevođenje fosfora u rastvorni oblik.

Tretman zemljišta sa fosfatnim rudama u kombinaciji sa acidofilnim gvožđe i sumpor oksidujućim bakterijama mogao bi u skorijoj budućnosti da postane atraktivan, alternativan način za poboljšanje kvaliteta baznih zemljišta, zbog ekonomske isplativosti i pogodnosti sa aspekta zaštite životne sredine.

Zahvalnost

Zahvaljujemo se Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije, koje je svojim finansiranjem kroz projekate III 43004, TR 31003 i TR 32008 pomoglo istraživanja objavljena u ovom radu.

LITERATURA

[1] Alam S., Samina K., Najma A., Maliha R., (2002), In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PMS) from

maize rhizosphere, International Journal of Agriculture Biology 4, 454

[2] Anonymus, (1995), Suve podloge "Torlak" – Katalog, Torlak – Institut za imunologiju i virusologiju, Beograd

[3] Bojinova D., Velkova R., Ivanova R., (2008), Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*, Bioresource Technology 99, 7348

[4] Bhatti T.M., Yawar W., (2010) Bacterial solubilization of phosphorus from phosphate rock containing sulfur-mud, Hydrometallurgy 103, 54

[5] Collins C., Lyne P., Grange J., Falkinham J. (2004), *Microbiological Methods*, Arnold, London, 144

[6] Delvasto P., Valverde A., Ballester A., Moñoz J.A., Gonzáles F., Blázquez M.L., Igual J.M., Garcia-Balboa C., (2008), Diversity and activity of phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore, Hydrometallurgy 92, 124

[7] Kelly D.P., Wood A.P., (2000), Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 511

[8] Pereverzev N.A., Gromova L.A., Karavaiko G.I., Manykin A.A., (1981) *Microbiologiya* 50: 638

[9] Rodina A.G., (1965) *Metody vodnoi mikrobiologii - Prakticheskoe rukovodstvo*, Nauka, Moskva, Leningrad

[10] Rogers, R.D., Wolfram J.H., (1991) Biological separation of phosphate from ore. Mineral Processing. Minerals, Metals and Material Society, Nevada, USA, 219

[11] Savić J., Savić M., (1990), *Osnovi analitičke hemije: klasične metode*, Sarajevo, 278

[12] Silverman M.P., Lundgren D.G., (1959), J. Bacteriol. 77, 642

[13] Taylor B.F., Hoare D.C., Hoare S.L., (1971) Arch. Microbiol. 78, 193

[14] Vrvic M.M., (1991), *Dejstvo tionskih bakterija na sulfidne supstrate – fundamentalni i primenjeni aspekti*, dok. disertacija, Hemijski fakultet, Beograd

ABSTRACT

EXAMINATION OF PHOSPHATE ORES BIOLEACHING FROM LISINA DEPOSIT

Phosphorus solubilization from insoluble phosphate ores by acidophilic autotrophs and heterotrophs is a research of significant interest, because of potential use of these ores as fertilizers, which are economically and ecologically more acceptable than industrial phosphate fertilizers.

*The object of this paper was to examine the possibility of phosphorus leaching from phosphate ore from Lisina deposit (Bosilegrad), by bacterially generated sulfuric acid, in laboratory conditions. The experiments were carried out with bacterium *Acidithiobacillus* (*At.*) *ferrooxidans*, which is isolated and selected from the copper sulphide mine in Bor. The main goal of the experiment was to confirm if it is possible to use phosphate ore in combination with examined bacterial culture, as a natural fertilizer.*

*Results obtained show that phosphorus has been leached up to 24,5 % in suspension with *At. ferrooxidans*, and in the same time, degree of leaching in control suspension (without *At. ferrooxidans*) was up to 7,2 %.*

*Influence of *At. ferrooxidans* on phosphorus solubilization has been confirmed, so the future perspective of our investigations should be directed to examination of microbiological leaching of apatite mixtures with sulphide substrates, and their potential use in quality improvement of alkaline soils.*

Key words: phosphate ore, leaching, *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Scientific paper

Paper received: : 10. 04. 2012.