

**EFFECTO DE LA AGITACIÓN Y TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA  
BIOACIDULACIÓN DE ROCA FOSFÓRICA Y AJUSTE DE PARÁMETROS  
CINÉTICOS**

**CLAUDIA ALEXANDRA BOJACÁ TORRES**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERIA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2014**

**EFFECTO DE LA AGITACIÓN Y TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA  
BIOACIDULACIÓN DE ROCA FOSFÓRICA Y AJUSTE DE PARÁMETROS  
CINÉTICOS**

**CLAUDIA ALEXANDRA BOJACÁ TORRES**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:**

**Ingeniera Química**

**Director**

**Ph.D. Luis Javier López Giraldo**

**Codirector:**

**Ph.D. Nelson Walter Osorio Vega**

**Universidad Nacional de Colombia**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERIA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que me acompañaron, motivaron y brindaron su apoyo durante la realización de este trabajo. Deseo expresar un agradecimiento especial a:

Al Dr. Luis Javier López Giraldo, por aceptar dirigir mi proyecto, por su gran orientación, seguimiento y valiosos aportes al desarrollo del presente trabajo. Gracias.

Al Dr. Nelson Walter Osorio Vega, por acogerme en el grupo de investigación de microbiología de suelos y facilitarme la posibilidad de desarrollar mi trabajo en el laboratorio de Biogeoquímica de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín. A su vez agradezco su apoyo, consejos, enseñanzas, valiosos aportes y su orientación continua durante la realización del proyecto.

A Dorcas Zúñiga, por su gran amistad, su apoyo, y sus valiosos aportes en el área de Microbiología.

Al grupo de investigación de microbiología de suelos de la Universidad Nacional de Colombia, en especial a Laura Osorno por su gran colaboración.

A mi familia, en especial a mi hijo Juan Camilo, mi esposo Camilo, mi mamá, mis hermanas y mi abuelita por su gran apoyo y comprensión.

A mis amigos, en especial a Leonardo Caballero por su motivación y constante preocupación. A María Isabel Parra, por su amistad, su atenta lectura a mi proyecto y su gran apoyo.

A la Universidad Industrial de Santander, a la Escuela de Ingeniería Química. A la Universidad Nacional de Colombia. A todos gracias.

## RESUMEN

**TITULO:** EFECTO DE LA AGITACIÓN Y TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA BIOACIDULACIÓN DE ROCA FOSFÓRICA Y AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS\*

**AUTOR:** Bojacá Torres, Claudia Alexandra\*\*.

**PALABRAS CLAVES:** Microorganismos solubilizadores de fósforo, *Mortierella* sp., fósforo, solubilización, cinética.

### DESCRIPCIÓN:

El fósforo (P) es un elemento esencial pero limitante para las plantas. La roca fosfórica (RP) es la principal fuente de P inorgánico; no obstante, su baja solubilidad limita su uso extendido. El uso de microorganismos solubilizadores de fósforo (MSP) es una alternativa. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la velocidad de agitación y el tamaño de partícula sobre la bioacidulación de RF por *Mortierella* sp. Para esto, mediante un diseño completamente al azar y un arreglo factorial se evaluaron cuatro velocidades de agitación (0, 50, 100 y 150 rpm) y tres tamaños de partícula de RF (54-65, 150-180 y 250-300  $\mu\text{m}$ ). Los resultados indican que la inoculación con *Mortierella* sp., incrementa la disolución de RF. Adicionalmente, la velocidad de agitación y la interacción entre velocidad de agitación y tamaño de partícula inciden positivamente sobre la bioacidulación de la RF ( $P$ -value  $<0,05$ ). El tamaño de partícula no resultó significativo. Con base en los resultados obtenidos, se concluye que el modelo logarítmico es quien mejor describe la bioacidulación de la RF. Según este modelo, las condiciones que maximizan la bioacidulación de la RF son: la velocidad de agitación (107 rpm) y el tamaño de partícula (250-300  $\mu\text{m}$ ). La validación del modelo y la función que éste genera, son capaces de predecir la bioacidulación de la RF; con un (ERP) del 17%. Adicionalmente, el ajuste de los parámetros cinéticos que describen el crecimiento del hongo con las variables citadas, encuentra un modelo de crecimiento cuya velocidad específica es constante ( $\mu = 0,458 \text{ d}^{-1}$ ). La predicción del modelo cinético para producir P soluble, arrojó un ERP del 20,8%. El comportamiento cinético precisa que la solubilización de P, está asociada al crecimiento del hongo y a la acidificación del pH en el medio de biosolubilización de RP.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química, Director. Luis Javier López Giraldo.  
Co-director. Nelson Walter Osorio Vega, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

## ABSTRACT

**TITLE:** EFFECT OF AGITATION AND PARTICLE SIZE ON THE BIOACIDULATION OF PHOSPHATE ROCK AND ADJUSTMENT OF KINETIC PARAMETERS\*

**AUTHOR:** Bojacá Torres, Claudia Alexandra\*\*.

**KEYWORDS:** Phosphate solubilizer microorganism, *Mortierella* sp., phosphorus, solubilization, kinetic.

### DESCRIPTION:

Phosphorus is an essential but limiting element for plants. Phosphate rock (RP) is the main source of inorganic P; however, its low solubility limits their widespread use. The use of phosphorus solubilizing microorganisms (MSP) is an alternative. The objective of this study was to determine the effect of agitation and particle size in the process of bioacidulation of RP by the fungus *Mortierella* sp. For this, using a completely randomized design and factorial arrangement, 4 speed stirrer (0, 50, 100, 150 revolutions per minute –rpm- ) and 3 RP size particles (54-65, 150-180 y 250-300  $\mu\text{m}$ ) were evaluated. The results indicate that inoculation with the fungus *Mortierella* sp. increases RP dissolution. Additionally, the stirring speed and the interaction between stirring speed and particle size have a positive impact on the RP bioacidulation (P-value <0.05). Particle size was not significant. Based on these results, we conclude that the logarithmic model best describes the RP bioacidulation. In this model, the conditions that maximize the RP bioacidulation are: stirring speed (107 rpm) and particle size (250-300  $\mu\text{m}$ ). Validation of the model and the function it generates are able to predict the RP bioacidulation; with a (AvRE) of 17%. Additionally, adjustment of the kinetic parameters describing the growth of the fungus with the above variables, is a growth model whose specific speed is constant ( $\mu = 0.458 \text{ d}^{-1}$ ). The prediction of the kinetic model to produce soluble P, threw an AvRE of 20.8%. The kinetic behavior requires that solubilization of P, is associated with fungal growth and acidification of the pH in the medium RP biosolubilization.

---

\* Work Degree

\*\* Faculty of Physicochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Director. Luis Javier López Giraldo.

Co-director. Nelson Walter Osorio Vega, Faculty of Science, Universidad Nacional de Colombia, Medellín Campus.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	11
1. MATERIALES Y METODOLOGÍA	166
1.1 SITIO EXPERIMENTAL	16
1.2 MATERIALES Y EQUIPOS	16
1.3 MÉTODOS	16
1.3.1 Obtención y acondicionamiento de la roca fosfórica	16
1.3.2 Preparación del inóculo	177
1.3.3 Medio de cultivo y condiciones de solubilización	18
1.3.4 Determinación de biomasa seca del hongo	19
1.3.5 Método azul de molibdato	19
1.3.6 Seguimiento de la cinética de disolución de RF	20
1.3.7 Estimación del error relativo (ERP)	20
1.3.8 Modelo exponencial de crecimiento celular	21
1.3.9 Cinética de formación de producto	21
1.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	22
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
2.1 EFECTO DE LA AGITACIÓN Y TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA DISOLUCIÓN DE RF.	23
2.2 CINÉTICA DE DISOLUCIÓN DE RF	29
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Curva de producción y proyección de la producción de fósforo en MT por año desde el año 1900 hasta el año 2100 (Cordell <i>et al.</i> , 2009).	13
<b>Figura 2.</b> Indicadores del Banco Mundial del consumo de fertilizantes (kilogramos por hectárea de tierras cultivables) en Colombia con respecto al promedio del consumo de fertilizantes a nivel mundial.	14
<b>Figura 3.</b> Concentraciones de fósforo soluble ( $\text{mg P L}^{-1}$ ) en función de la agitación a diferentes tamaños de partícula y sus respectivos controles.	24
<b>Figura 4.</b> Crecimiento del hongo a diferentes agitaciones.	26
<b>Figura 5.</b> Diagrama de Pareto estandarizado de la influencia de la agitación y tamaño de partícula sobre la cantidad de fósforo soluble ( $\alpha=0,05$ ).	27
<b>Figura 6.</b> Superficie de respuesta obtenida para la concentración de fósforo solubilizado en función de la agitación y tamaño de partícula de acuerdo al modelo propuesto.	28
<b>Figura 7.</b> Variación del fósforo soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y pH en función del tiempo.	30
<b>Figura 8.</b> Variación de Biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función del tiempo.	31
<b>Figura 9.</b> Modelo simple de crecimiento exponencial entre el día 3 y el día 7.	33
<b>Figura 10.</b> Gráfica de P soluble vs Tiempo (días) representadas por los datos experimentales y modelo cinético en la zona exponencial.	34

## LISTA DE TABLAS

**Pág.**

**Tabla 1.** Seguimiento cinético del pH, biomasa y concentración de fósforo solubilizado.

29

## INTRODUCCIÓN

El fósforo es un macroelemento esencial para la vida animal, vegetal y microbial (Schachtman *et al.*, 1998). Algunas funciones del fósforo que resumen su importancia en los seres vivos son: (i) forma parte del material genético, (ii) interviene en el metabolismo celular y (iii) es componente de las membranas celulares; en los animales este elemento hace parte estructural de huesos y dientes. Específicamente en las plantas, la presencia de fósforo es determinante para el crecimiento y desarrollo de las mismas (Johnston, 2000; Walpola y Yoon, 2012); el suministro de éste es esencial para la formación de semillas, el desarrollo de la raíz y la maduración de los cultivos. En ausencia de fósforo las plantas presentan un bajo rendimiento, sus hojas adquieren un color púrpura y no presentan un crecimiento apropiado. Además, es un elemento que no puede ser sustituido por otro en la producción de alimentos (Johnston, 2000; Syers *et al.*, 2011).

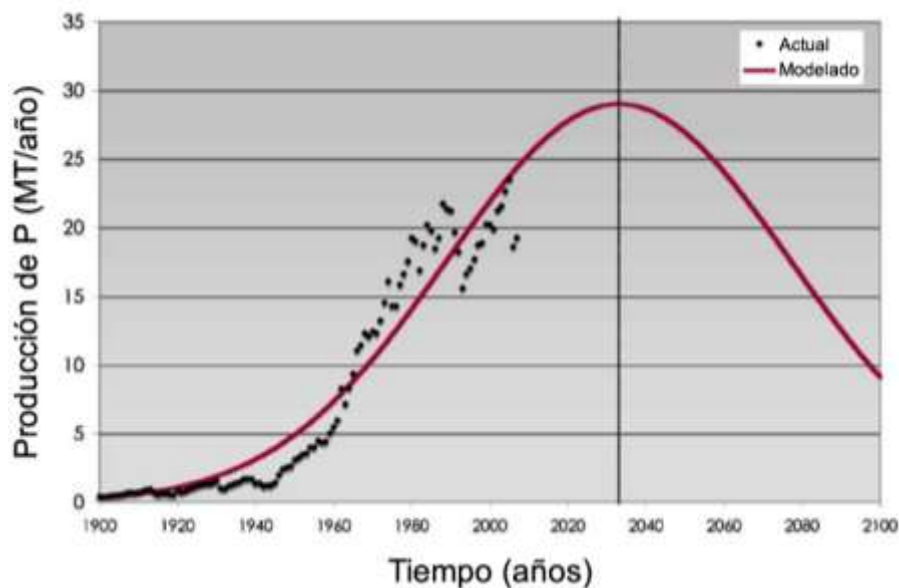
El fósforo es un nutriente limitante para el crecimiento de las plantas. Dependiendo del pH, las plantas absorben el fósforo disponible en el suelo a través de sus raíces principalmente en formas de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Arcand y Schneider, 2006; Illmer y Schinner, 1995; Schachtman *et al.*, 1998). Una muy pequeña porción del fósforo en el suelo puede ser utilizado por las plantas (<1% del fósforo total), el resto del fósforo es fijado por los suelos en formas insolubles. De manera general, los iones fosfato son adsorbidos por las arcillas o los óxidos del suelo. También estos iones reaccionan con cationes tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , para formar compuestos insolubles. Estos factores causan que la concentración de fósforo en el suelo sea muy baja,  $0,001 - 0,1 \text{ mg L}^{-1}$  (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Osorio, 2009; Osorio y Habte, 2011; Walpola y Yoon, 2012).

Para suplir la deficiencia de fósforo en los suelos cultivados se utilizan fertilizantes fosfóricos solubles. Sin embargo, la eficiencia de tal aplicación

es muy baja (5-10%) (Osorio, 2009, Vassilev y Vassileva, 2003). Para compensar la baja eficiencia se aplican altas cantidades de estos fertilizantes, lo que resulta en una práctica costosa y en algunos casos genera un impacto ambiental negativo (Vassilev y Vassileva, 2003). Además, la síntesis de fertilizantes fosfóricos solubles demanda altos niveles de energía y reactivos (ácido sulfúrico, entre otros) (Cordell *et al.*, 2009; Gyaneshwar *et al.*, 2002; World Bank Group, 1998). En consecuencia, este tipo de procesos son costosos y puede generar impactos ambientales tales como producción de residuos tóxicos, emisiones de gases (ácido fluorhídrico) (Cordell *et al.*, 2009; Tomlinson, 2010; Vassilev y Vassileva, 2003). El uso continuo y poco controlado de fertilizantes fosfóricos solubles pueden perturbar la diversidad microbial y sus actividades metabólicas (Walpola y Yoon, 2012), contaminar suelos y eutrofizar ríos (Arcand y Schneider, 2006; Correl, 1998; Shigaki, 2006).

Una alternativa al empleo de fertilizantes tradicionales es el uso de la roca fosfórica (RF), que además es menos costosa y amigable desde el punto de vista ambiental. La RF es una apatita que presenta concentraciones de fósforo que fluctúan entre 66 y 136 g kg<sup>-1</sup> RF (la concentración de fósforo está dada por la cantidad de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> presente en el mineral) (Zapata y Roy, 2007). Desafortunadamente, existen predicciones que suponen que a partir del año 2100 pueden agotarse las reservas de RF, la materia prima para producir los fertilizantes fosfóricos solubles (Cordell *et al.*, 2009; Gilbert, 2009; Tomlinson, 2010) (Figura 1). De otra parte, la RF es un compuesto muy insoluble, y para mejorar su eficiencia se debe acidular con ácido sulfúrico (Cordell *et al.*, 2009; Vassilev y Vassileva, 2003).

**Figura 1. Curva de producción y proyección de la producción de fósforo en MT por año desde el año 1900 hasta el año 2100**

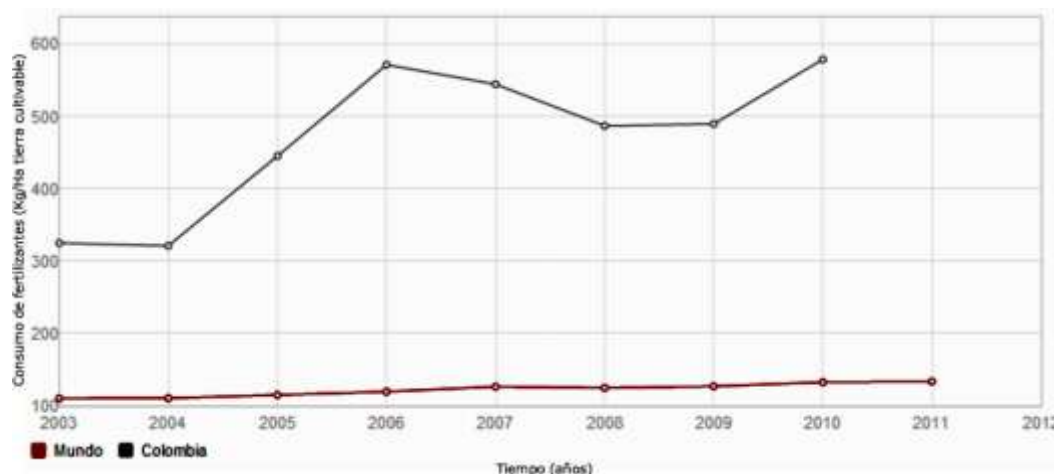


Fuente: Cordell *et al.*, 2009.

Otro aspecto a considerar es que en Colombia el 98% de los suelos presenta deficiencia de fósforo para las plantas (Jaramillo, 2004), lo que implica una mayor demanda de fertilizante, del cual el 90-95% del P se pierde por la fijación del suelo (Osorio, 2009). De acuerdo con los indicadores del Banco Mundial en lo que respecta al consumo de fertilizantes, Colombia es uno de los países que más aplicación tiene de fertilizantes -entre ellos fertilizantes fosfóricos - comparado con el promedio mundial (Figura 2).

Según el CONPES 3577 (2009) “La producción colombiana de minerales como materia prima para la fabricación de fertilizantes no alcanza a satisfacer la demanda interna. Por esta razón, se importa anualmente un alto volumen de compuestos de fósforo, nitrógeno, potasio, calcio, magnesio y azufre”, lo que conlleva a que los costos de los fertilizantes sean altos. Recientemente, se ha reportado que en Colombia los precios se encuentran 25 – 35% por encima del precio internacional (Suarez, 2013), lo que hace poco viable y competitiva la agricultura colombiana.

**Figura 2. Indicadores del Banco Mundial del consumo de fertilizantes (kilogramos por hectárea de tierras cultivables) en Colombia con respecto al promedio del consumo de fertilizantes a nivel mundial.**



Fuente: <http://datos.bancomundial.org/indicador>

Por las razones anteriormente expuestas, se hace necesario encontrar otras opciones que permitan la obtención del fósforo requerido por los cultivos de manera económica y sostenible. Una alternativa que ha ganado mucho interés recientemente es el uso de microorganismos solubilizadores de fósforo (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Zaidi *et al.*, 2009).

Esta alternativa biotecnológica puede reducir costos, es efectiva, permite la utilización de recursos biológicos renovables y se ajusta a la política CONPES 3577 que promueve el uso de biofertilizantes, el uso de recursos naturales locales y un uso sostenible y eficiente de los fertilizantes. Además promueve medidas que reduzcan la fuerte dependencia hacia los fertilizantes importados.

La biosolubilización de la roca fosfórica ha sido estudiada por diferentes trabajos de investigación en los que se han empleado diferentes tipos de roca fosfórica y microorganismos (hongos y bacterias) (Arcand y Schneider, 2006; Goenadi y Sugiarto, 2000; Illmer y Schinner, 1995; Osorio, 2003, 2009; Osorio y Habte, 2011; Richardson y Simpson, 2011; Walpola y Yoon, 2012;

Zaidi *et al.*, 2009). Entre los mecanismos propuestos para explicar la solubilización del fósforo por parte de los microorganismos se encuentran: *i*) la liberación de ácidos orgánicos, *(ii)* quelación, que es la formación de complejos entre ácidos orgánicos con cationes ( $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) y *(iii)* acidificación (Arcand y Schneider, 2006; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Osorio, 2003, 2009; Walpola y Yoon, 2012; Zaidi *et al.*, 2009). De acuerdo con los estudios, microorganismos del tipo fúngico como *P. Oxalicum* (Singh y Reddy, 2010), *A. aculeatus* (Varsha y Patel, 1999), *A. tubingensis* (Reddy, *et al.*, 2001), *A. niger* (Bojinova, *et al.*, 2008; Osorno, 2014; Reddy, *et al.*, 2001; Vassilev *et al.*, 1997), *Mortierella* sp (Osorio, 2003; Osorno, 2014), *Candida Krissii*, *Penicillium expansum*, *Mucor ramosissimus* (Xiao *et al.*, 2008), fueron capaces de solubilizar la roca fosfórica.

Dada la importancia y el impacto del fósforo como fertilizante, actualmente el grupo de investigación de microbiología de suelos, de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, adelanta estudios sobre los efectos de la solubilización de la roca fosfórica por los hongos *Mortierella* sp. y *A. Niger*. En este grupo se busca encontrar el valor óptimo de algunas variables como son la composición de medios de cultivo, tipo de microorganismos, temperatura, pH, fuente de energía para los MSF y tiempo de reacción en los cuales se da una mayor solubilización de la roca por parte de los microorganismos.

En ese contexto, este trabajo centra su atención en determinar las mejores condiciones de agitación y tamaño de partícula que facilitan la solubilización de la roca fosfórica empleando el hongo *Mortierella* sp., y proponer un modelo cinético de la solubilización de la RF.

# 1. MATERIALES Y METODOLOGÍA

## 1.1 SITIO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Biogeoquímica de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín.

## 1.2 MATERIALES Y EQUIPOS

Para el desarrollo experimental se utilizaron los siguientes reactivos analíticos: cloruro de sodio (NaCl), glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), sulfato de magnesio hepta – hidratado (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), cloruro de calcio di-hidratado (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O), ácido ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>), ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido clorhídrico (HCl).

Así mismo, fueron utilizados los siguientes equipos: Centrífuga 004 SPECIAL marca INDULAB, autoclave SMT-EL marca MARKET FORGE, medidor de pH INOLAB pHmetro 730 marca WTW, balanza analítica AB204 marca METTLER TOLEDO, cabina de flujo laminar horizontal marca FORMA SCIENTIFIC, incubadora B6 marca HERAUS, espectrofotómetro 4001/4 marca THERMOSPECTRONIC, cámara de Neubauer 1/10mm marca BOECO Germany, microscopio OLYMPUS modelo CX31, VULCAN 3-550 marca NEY.

## 1.3 MÉTODOS

**1.3.1 Obtención y acondicionamiento de la roca fosfórica.** La muestra de RF usada en el experimento se obtuvo del laboratorio de Biogeoquímica de la Universidad Nacional de Colombia. La muestra proviene del yacimiento Media Luna ubicado en el departamento del Huila (Colombia). La RF es una fluoroapatita  $\text{Ca}_{9,69}\text{Na}_{0,22}\text{Mg}_{0,09}(\text{PO}_4)_{5,14}(\text{CO}_3)_{0,86}\text{F}_{2,34}$  cuya concentración en fósforo es de 122 g kg<sup>-1</sup>.

La muestra de RF utilizada se recibió en forma de un polvo previamente molido, el cual se clasificó de acuerdo con el tamaño de partícula obtenido en tamices de la serie Estandar E-11. Para ello se dispuso de una columna de 6 tamices vibratorios + bandeja en orden descendente en relación a número de aberturas por pulgada: 300  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 53  $\mu\text{m}$ , que corresponden a los números 50, 60, 80, 100, 200, 270, respectivamente. Una vez organizados los tamices, les fue aplicado 2 ciclos de vibración de 10 minutos cada uno. Después, la roca retenida por la malla No. 60, la malla No. 100 y la malla No. 270. se almacenó en bolsas separadas etiquetadas como tamaño de partícula grande (300-250  $\mu\text{m}$ ), mediano (180-150  $\mu\text{m}$ ) y pequeño (75-53  $\mu\text{m}$ ), respectivamente.

**1.3.2 Preparación del inóculo.** Como inóculo se utilizó una cepa del hongo MSF *Mortierella* sp. obtenida de la colección del Laboratorio de Ecología y Conservación Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia. Este hongo fue aislado por Osorio y Habte (2001) y desde entonces se ha mantenido y replicado en un medio papa-dextrosa-agar (PDA) a 4°C. Se realizaron varios subcultivos en caja petri de esta cepa en Papa - Dextrosa - Agar (PDA) con sulfato de estreptomicina (300 mg L<sup>-1</sup>) durante 15 días a temperatura ambiente y sin exposición a la luz. Previamente, a la cepa se le realizó una prueba de viabilidad (Calich *et al.*, 1979) y de su capacidad solubilizadora (Osorio y Habte, 2011). Los subcultivos fueron sometidos a estrés lumínico por 30 min. cada tres días para promover la propagación de esporas y garantizar la viabilidad celular. Transcurrido ese tiempo, se preparó una suspensión del MSF en una solución salina al 0,85%. Para preparar la suspensión, a un subcultivo en caja de Petri se le adicionó un aproximado de 15 mL de solución salina estéril y con un asa se removió el micelio, el cual se descartó. Luego, se tomó la solución remanente en la caja de Petri con una micropipeta y se llevó a un tubo de ensayo estéril hasta completar 10 mL (este volumen se obtiene por cada caja petri subcultivada).

Después se realizó un conteo de células en una cámara de Neubauer (BOECO, Germany) con un objetivo 40x en un microscopio. Para esto, la suspensión se agitó previamente en un vórtex y se tomó una muestra de la misma en el portaobjetos de la cámara. El conteo se realizó en la parte central de la cámara que consta de 25 cuadros principales, cada uno dividido a su vez en 16 cuadrículas más pequeñas. Para conocer la concentración de esporas por mL de la suspensión se realizó el siguiente cálculo:

$$\left[ \frac{\text{células}}{\text{mL}} \right] = \frac{N}{25} * 10^6 \text{ Ecuación 1}$$

donde,

*N = número total de células contadas en la parte central.*

Los medios fueron inoculados a una concentración de  $10^7$  esporas por mL.

**1.3.3 Medio de cultivo y condiciones de solubilización.** Toda la vidriería utilizada en la preparación de los medios y en la medición de fósforo fue mantenida en HCl 0,03 M durante 24 horas y después lavada 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada. Este procedimiento tiene como objetivo liberar el material de fósforo.

El medio de cultivo para las pruebas de disolución de la RF tuvo la siguiente composición (g L<sup>-1</sup>) NaCl 1,0; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,4, glucosa 10, NH<sub>4</sub>Cl 0,5 y RF: 3,5. Seguidamente, 75 mL del medio fue transferido a Erlenmeyer de 250 mL; se midió el pH y posteriormente se esterilizó en autoclave por 30 minutos a 120 °C y 0,1 MPa. El número total de unidades experimentales fue de 96, de las cuales 48 corresponden a los controles que no fueron inoculados.

Una vez esterilizado, cada Erlenmeyer se inoculó con 1 mL de la suspensión del hongo, lo cual equivale a una concentración del inóculo de 1,3% (V/V). Para efectos de comparación se incluyeron controles no inoculados. Los

Erlenmeyers se llevaron a un agitador reciproco constante durante 5 días a temperatura ambiente (22-26 °C).

Luego, la suspensión se pasó a través de un papel filtro (Boeco, 3 hw) para separar la biomasa y los residuos de RF de la solución. Posteriormente, se determinó el pH de la solución. Las soluciones se centrifugaron a 4000 r.p.m. durante 10 minutos y del sobrenadante, se tomó una alícuota de 10 mL, en los cuales se midió la concentración de fósforo de la solución empleando el método de azul de molibdato (Murphy y Riley, 1962).

**1.3.4 Determinación de biomasa seca del hongo.** El crecimiento celular fue cuantificado de la siguiente manera: cada muestra (suspensión de medio, RF y biomasa) se pasó a través de un papel filtro (Boeco, 3 hw) y el filtrado (micelio y RF) fue secado a 60°C durante 24 horas (Shuler y Kargi, 2002). La biomasa seca con la roca fosfórica fue removida del papel filtro con una espátula. Acto seguido, se registró el peso de la muestra y la cual fue transferida a un tubo de ensayo previamente marcado para ser llevada a la mufla a 500°C durante 3 horas. El remanente del calcinado en los tubos fue pesado y la diferencia de pesos antes y después de la calcinación correspondió a la cantidad de biomasa por muestra.

**1.3.5 Método azul de molibdato.** Es un método colorimétrico que consiste en la reacción del molibdato de amonio con las formas iónicas para formar ácido molíbdico fosfórico el cual será reducido a azul de molibdeno por el ácido ascórbico. El protocolo para la medición de fósforo soluble fue el siguiente:

- Preparación de la línea de calibración de fósforo con soluciones estándar a diferentes concentraciones: 0,0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 mg P L<sup>-1</sup>, a partir de la solución 1 mg P L<sup>-1</sup> con CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,01 M.

- Preparación de las soluciones de trabajo A y B. La solución A contiene el molibdato de amonio y ácido sulfúrico. La solución B contiene la solución A y ácido ascórbico.

- Se tomó una alícuota de 10 mL de la muestra a medir en un tubo de ensayo y se adicionaron 2,5 mL de solución B. La solución se agitó en vórtex y se dejó en reposo durante 20 minutos, para realizar la medición en el espectrofotómetro a 890nm.

**1.3.6 Seguimiento de la cinética de disolución de RF.** Para medir la variación de fósforo soluble, biomasa y pH en función del tiempo se realizó un experimento con 30 unidades experimentales inoculadas a las condiciones óptimas obtenidas en el diseño de experimentos (ver Sección 2.4).

El experimento consistió en la medición diaria por triplicado de la concentración de fósforo soluble en la solución (Murphy y Riley, 1962), pH y biomasa seca del hongo durante 9 días. Así mismo, se realizaron medidas de control del fósforo soluble y pH el día de montaje del experimento.

**1.3.7 Estimación del error relativo (ERP).** La validación del modelo de fósforo soluble en función de la agitación y el tamaño de partícula se verificó empleando puntos experimentales diferentes a los del diseño, los cuales fueron seleccionados con base en los datos óptimos obtenidos a partir del modelo. La capacidad predictiva del modelo fue evaluada calculando la diferencia entre los valores experimentales y los datos calculados empleando el error relativo promedio (ERP) según se muestra en la ecuación 2:

$$ERP = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|experimental - calculado|}{experimental} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Así mismo, la ecuación 2 fue empleada para evaluar el ajuste del modelo cinético de formación de producto con los valores experimentales obtenidos de fósforo soluble.

**1.3.8 Modelo exponencial de crecimiento celular.** La velocidad de crecimiento exponencial está definida de acuerdo con la ecuación 3:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Ecuación 3 (Díaz, 2012 y Shuler y Kargi, 2002)}$$

Asumiendo que la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) es constante e integrando, se obtiene la ecuación 4:

$$X = X_o * e^{\mu * t} \quad \text{Ecuación 4 (Díaz, 2012 y Shuler y Kargi, 2002)}$$

donde:

$X$  = Concentración celular ( $mg L^{-1}$ ) (ecuación 3 y 4)

$t$  = Tiempo (días) (ecuación 3 y 4)

$X_o$  = Concentración celular ( $mg L^{-1}$ ) en el tiempo  $t = 0$ . (ecuación 3)

**1.3.9 Cinética de formación de producto.** Para un proceso en discontinuo, la velocidad de formación de producto se define como:

$$r_p = \frac{dP}{dt} = q_p * X \quad \text{Ecuación 5 (Díaz, 2012 y Shuler y Kargi, 2002)}$$

donde,

$q_p$  = Velocidad específica de formación de producto  $mg L^{-1}d^{-1}$ .

$r_p$  = Velocidad de formación de producto  $d^{-1}$ .

$X$  = Concentración de biomasa  $mg L^{-1}$ .

La producción asociada al crecimiento en la zona exponencial, se basó en un modelo no estructurado, no segregado, que relaciona el crecimiento celular, la formación de producto y el mantenimiento así:

$$\frac{dP}{dt} = (Y_{P/X} * \mu + m_p) * X \quad \text{Ecuación 6}$$

$$q_p = Y_{P/X} * \mu + m_p \quad \text{Ecuación 7 (Díaz, 2012)}$$

En la ecuación (7)  $m_p$  es la constante de mantenimiento relacionada con la formación de producto y  $Y_{P/X}$  es el rendimiento estequiométrico de la

formación de producto relacionado con el crecimiento celular. Linealizando la ecuación (6) se obtiene:

$$Y'_{P/X} = \frac{r_p}{r_x} = Y_{P/X} + m_p \left( \frac{1}{\mu} \right) \quad \text{Ecuación 8}$$

La ecuación 8 se simplifica porque  $\mu = \text{constante}$ , luego se infiere  $m_p \approx 0$ , entonces:

$$Y'_{P/X} = Y_{P/X} \quad \text{Ecuación 9}$$

Integrando la ecuación 5 se obtiene el modelo de formación de producto en la zona exponencial:

$$P = Y_{P/X} * X_o [e^{\mu * t} - 1] \quad \text{Ecuación 10}$$

donde,

$$Y_{P/X} = \frac{P_{t=t} - P_{t=0}}{X_{t=t} - X_{t=0}} \quad \text{Ecuación 11 (Shuler y Kargi, 2002)}$$

#### 1.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto de la agitación y el tamaño de partícula sobre el pH y el fósforo soluble se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos 4x3, esto se refiere a 4 niveles de agitación (0, 50, 100, 150 rpm) y 3 tamaños de partícula (53 – 75  $\mu\text{m}$ , 150 – 180  $\mu\text{m}$ , 250 – 300  $\mu\text{m}$ ). Cada tratamiento tuvo 4 réplicas. Se realizó un análisis de varianza para evaluar la significancia de los tratamientos y cuando éstos fueron significativos se utilizó la prueba de separación de medias de Duncan. En ambos casos, se utilizó un nivel de significancia ( $P \leq 0,05$ ). El análisis estadístico se realizó con el software STATGRAPHICS CENTURION XVI (licencia de prueba de 30 días).

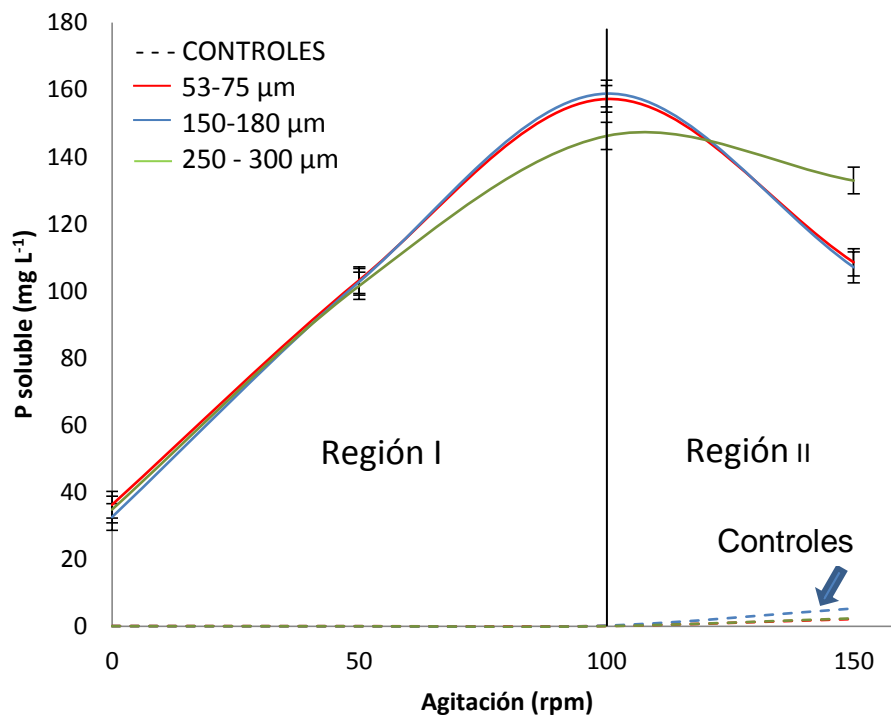
## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1 EFECTO DE LA AGITACIÓN Y TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA DISOLUCIÓN DE ROCA FOSFÓRICA.

En la Figura 3 se observan los resultados de concentración de fósforo solubilizado para cada tamaño de partícula en función de la agitación. Las curvas continuas en la parte superior de la figura corresponden a tratamientos inoculados, con valores promedio de fósforo soluble de  $34,5 \pm 1,8$ ,  $102,4 \pm 0,5$ ,  $154,0 \pm 4,7$  y  $116,1 \pm 8,4$  mg L<sup>-1</sup> para agitaciones de 0, 50, 100 y 150 rpm, respectivamente. Adicionalmente, en la parte inferior de la figura se observan los resultados obtenidos de los controles con valores de fósforo soluble que varían entre 0,027 y 5,329 mg L<sup>-1</sup>. En esta figura se aprecia una marcada diferencia entre los tratamientos inoculados frente a los no inoculados, de lo que se infiere que el hongo *Mortierella* sp. tiene una fuerte capacidad de solubilizar el fósforo. En efecto, los experimentos con inóculo a 100 rpm fueron aproximadamente 150 veces superiores a los tratamientos sin inocular. Así mismo, se evidenció un descenso del pH del medio de  $7,3 \pm 0,3$  a  $3,06 \pm 0,15$ . Esta acidificación se sustenta en el hecho que la *Mortierella* sp., como parte de su metabolismo, libera al medio ácidos orgánicos que son los encargados de solubilizar el fósforo contenido en la roca fosfórica (Osorio, 2003 y Osorno, 2014).

En la gráfica también se aprecia un punto de inflexión a 100 rpm para cada una de las curvas a diferentes tamaños de partícula en los tratamientos inoculados. La disminución en la concentración de fósforo soluble a una velocidad de agitación a 150 rpm, puede estar relacionada con la exposición de los micelios a las fuerzas mecánicas, lo que puede dar lugar a daños y lesiones (Doran, 1995). Altas velocidades de agitación pueden dañar las células y afectar el crecimiento de las mismas (Kelly *et al.*, 2004).

**Figura 3. Concentraciones de fósforo soluble - P soluble ( $\text{mg P L}^{-1}$ ) en función de la agitación a diferentes tamaños de partícula y sus respectivos controles.**



Fuente: Autora.

Así mismo, en la Figura 3, se aprecian claramente 2 regiones. En la primera, la tendencia es que sin importar el tamaño de la roca fosfórica, la cantidad de fósforo en solución aumenta. Sin embargo, en la región II esta tendencia se invierte y las mayores cantidades de fósforo solubilizado se obtienen cuando el tamaño de la roca fosfórica es el más grande (250- 300  $\mu\text{m}$ ). Este comportamiento podría explicarse si se consideran las observaciones hechas durante el experimento. Así, para los experimentos llevados a cabo a 150 rpm y tamaños pequeños de roca (53 - 75  $\mu\text{m}$  y 150 - 180  $\mu\text{m}$ ), la RF se distribuyó de tal forma que quedó adherida en las paredes de los erlemeyers por el efecto de la agitación, disminuyéndose así el contacto con la solución.

Por otra parte, el tamaño de roca fosfórica grande, tendió a acumularse en el fondo del recipiente permitiéndose así un contacto íntimo con el medio.

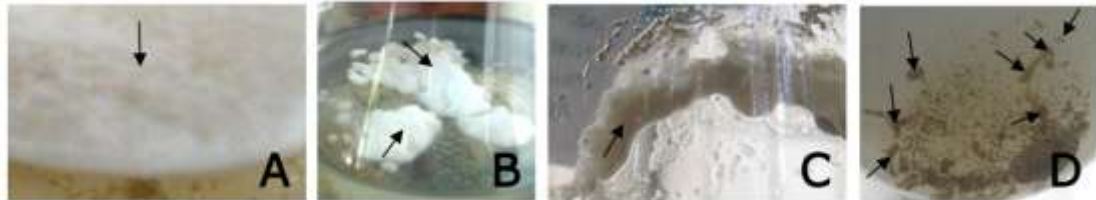
Además, el efecto de la agitación se ve reflejado en la morfología y apariencia del hongo, tal como se muestra en la Figura 4. El efecto se hace visible al observar cómo un pellet de micelio que cubre la superficie del fluido a 0 rpm (figura 4A) se fracciona hasta formar pellets más pequeños de micelio a medida que la agitación aumenta hasta 100 rpm. Estos cambios que sufre el micelio, se pueden apreciar en la Figura 4B para la agitación a 50 rpm y la Figura 4C - 4D para la agitación a 100 rpm. El cambio de morfología de hongos filamentosos debida a la agitación ha sido abordado en la literatura especializada. Así por ejemplo, [Posch et al. \(2012\)](#) indicó que la formación del pellet en hongos filamentosos está influida por las fuerzas mecánicas producto de la agitación a las cuales están sometidos.

A partir de lo anterior, y considerando que la concentración de fósforo soluble es mayor a medida que aumenta la agitación hasta 100 rpm, y con base en las observaciones del hongo a las diferentes agitaciones, se podría sugerir que el hongo *Mortierella* sp. es más efectivo como solubilizador de fósforo cuando se forman fracciones más pequeñas de micelio. Estas observaciones respecto a la influencia de la agitación en el tamaño del pellet del hongo *Mortierella* sp. y su influencia en la disolución de la RF podría ser materia de estudio en otros trabajos de investigación así como el cambio en la cantidad de biomasa cuando la agitación varía y que no fue cuantificada en el presente estudio.

El aumento de fósforo soluble a medida que aumenta la agitación hasta 100 rpm puede ser explicado porque a medida que la velocidad de agitación aumenta se logra una mayor homogenización y dispersión de la mezcla ([Diaz, 2012](#); [Doran, 1995](#)) y por tanto un mayor contacto del micelio con el medio ácido y una mayor difusión del ácido en el medio. Esto en cierta

forma, también explica la morfología del hongo a 0 y 50 rpm (figura 4A y 4B, respectivamente), pues al no existir una buena mezcla (producto de la agitación), se da una pobre dispersión de oxígeno en el medio (Doran, 1995), lo que influye en la formación del hongo en la superficie del fluido.

**Figura 4. Crecimiento del hongo a diferentes agitaciones**

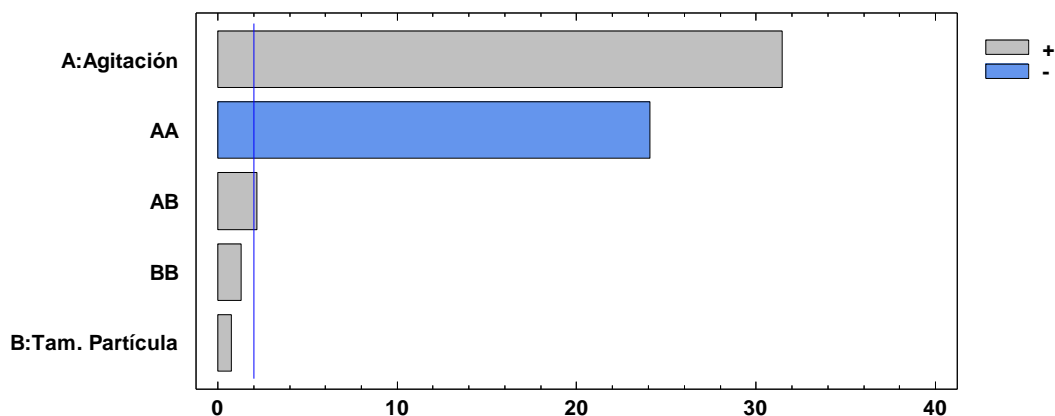


Las flechas negras en la imagen identifican el micelio formado A - Micelio formado a 0 rpm; B - Micelio formado a 50 rpm. C - Micelio formado en las paredes del Erlenmeyer a 100 y 150 rpm y D – Pellets del hongo envolviendo la roca en el fondo del recipiente a 100 rpm y 150 rpm. **Fuente:** Autora.

En lo que respecta al análisis de varianza, los resultados obtenidos permiten inferir que los efectos de agitación, su efecto cuadrático y la interacción agitación – tamaño de partícula tienen un efecto significativo a un nivel de confianza del 95% ( $P < 0,05$ ). Este resultado está en concordancia con lo esquematizado en el diagrama de Pareto de la Figura 5. En el diagrama se muestra que los efectos con mayor influencia son la agitación con un efecto positivo, y el efecto cuadrático de la agitación con un efecto negativo. A su vez se observa, que el efecto de la interacción agitación-tamaño de partícula, es estadísticamente significativo, sin embargo su contribución es pequeña comparada con el efecto de la agitación. Esto se evidencia con la relación  $F(\sigma_{intergrupos}/\sigma_{intragrupos})$  cuyo valor  $F(988,57)$  para la agitación y  $F(580,22)$  para su contribución cuadrática es superior a la relación  $F$  para la interacción agitación – tamaño de partícula  $F(4,78)$ . Los efectos tamaño de partícula y su interacción cuadrática tienen una significancia estadística mínima con valores  $F(0,60)$  y  $F(1,65)$ , respectivamente.

De este análisis se infiere que la agitación es la variable decisiva en la disolución de la RF por MSF y aunque la interacción Agitación – Tamaño de partícula es mínima comparada con la agitación y su contribución cuadrática, podría representar la tendencia en la concentración de fósforo obtenida para el tamaño grande (250-300  $\mu\text{m}$ ) a 150 rpm (Figura 3).

**Figura 5. Diagrama de Pareto estandarizado de la influencia de la agitación y tamaño de partícula sobre la cantidad de fósforo soluble ( $\alpha=0,05$ ).**



Las barras en dicho gráfico que superan la línea vertical localizada entre los valores 0 y 0,4 indican los factores e interacciones que afectan significativamente a la variable respuesta.

**Fuente:** Autora.

Así mismo, los resultados del análisis de varianza guardan una estrecha relación con los obtenidos mediante la comparación de medias de Duncan, la cual determinó que existe diferencia significativa para los niveles de agitación y no existe diferencia significativa para los niveles de la variable tamaño de partícula a un nivel de confianza del 95%. En relación al tamaño de partícula, este resultado contrasta con lo encontrado por [Xiao et al. \(2008\)](#). En el referido estudio se evaluaron diferentes tamaños de RF (40, 50, 60, 70, 80, 90, 100  $\mu\text{m}$ ) en la solubilización de RF por MSF y se determinó una disminución gradual de P liberado a medida que el tamaño de RF es mayor.

Con base en este análisis se propone un modelo logarítmico (Ecuación 10) que describe la influencia de la agitación y el tamaño de partícula sobre la variable respuesta (concentración de fósforo):

$$\ln(P) = 3,67641 + 0,0277353 * A - 0,00160554 * TP - 0,000138011 * A^2 + 0,00000642267 * A * TP + 0,00000355076 * TP^2 \quad \text{Ecuación 10}$$

donde,

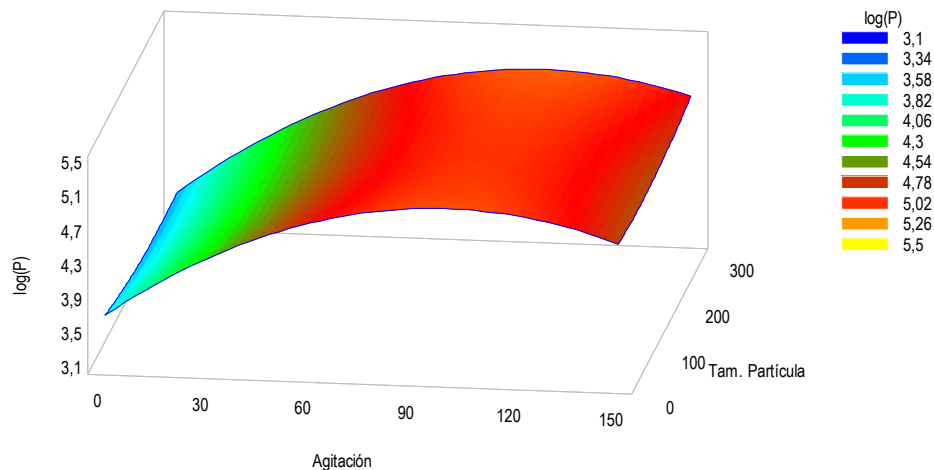
$P = P \text{ soluble (mgL}^{-1}\text{)}$

$TP = \text{Tamaño de partícula } (\mu\text{m})$

$A = \text{Agitación (rpm)}$

Con el modelo propuesto se generó la superficie de respuesta (Figura 6); en ella se observó que a una velocidad de agitación alrededor de 100 rpm se favorece la solubilización del fósforo. Así mismo se observó que a partir de 100 rpm los valores de fósforo solubilizado comienzan a decrecer para todos los rangos de tamaño de partícula evaluados. Por tanto, el modelo representa correctamente las tendencias observadas experimentalmente.

**Figura 6. Superficie de respuesta obtenida para la concentración de fósforo solubilizado en función de la agitación y tamaño de partícula de acuerdo al modelo propuesto.**



Fuente: Autora.

Las condiciones de agitación y tamaño de partícula que maximizan la concentración de fósforo solubilizado en el proceso de disolución de RF fueron 107 rpm y 250-300, respectivamente. Bajo estas condiciones el modelo predice un valor máximo de concentración de fósforo de  $165 \text{ mg P L}^{-1}$ . Así mismo, los valores optimizados de velocidad de agitación y tamaño de partícula se evaluaron de forma experimental, con el fin de determinar el grado de predicción del modelo. Bajo estas condiciones, el valor promedio de la concentración de fósforo solubilizado fue de  $140,43 \text{ mg L}^{-1}$ , es decir que el modelo predice el comportamiento con un error relativo de 17,4%.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con otros trabajos equivalentes, se constata que el valor de la concentración de fósforo solubilizado es superior hasta 1,45 veces. Así por ejemplo, en el trabajo de [Osorno \(2014\)](#), las concentraciones de fósforo solubilizado usando *Mortierella* sp. y *A. Niger* fueron  $86,59 \text{ mg L}^{-1}$  y  $96,0 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, para un período de incubación de 5 días inoculados a  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , una velocidad de agitación de 100 rpm y tamaño de partícula (0 – 250  $\mu\text{m}$ ). Así mismo se ha reportado concentraciones de  $107,5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $105,3 \text{ mg L}^{-1}$  y  $102,7 \text{ mg L}^{-1}$  para los hongos *Candida Krissii*, *Penicillium expansum* y *Mucor ramosissimus*, respectivamente, a 160 rpm, un tamaño de partícula de 40  $\mu\text{m}$  e inoculados a  $10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  durante 5 días ([Xiao et al., 2008](#)).

## 2.2 CINÉTICA DE DISOLUCIÓN DE RF

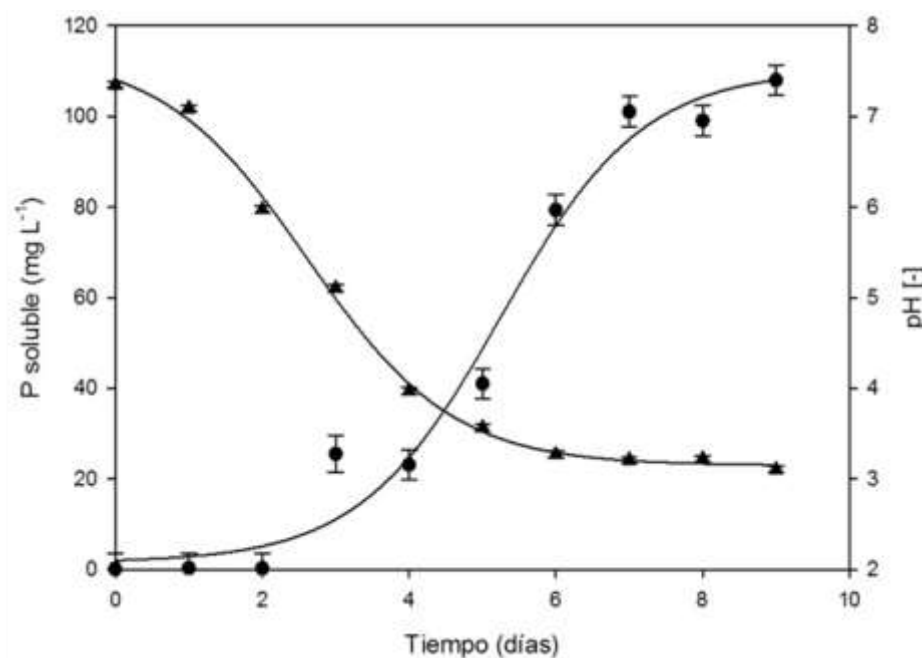
En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de pH, biomasa seca del hongo ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y concentración de fósforo solubilizado ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función del tiempo.

**Tabla 1. Seguimiento cinético del pH, biomasa y concentración de fósforo solubilizado.**

Tiempo (días)	pH	Biomasa seca del hongo	Fósforo soluble
0	7,35	----	0,127
1	7,08	82,7	0,290
2	5,88	106,0	0,252
3	4,04	188,0	25,522
4	3,97	241,3	23,108
5	3,64	285,0	41,015
6	3,24	802,0	79,361
7	3,24	1021,0	101,033
8	3,21	1047,0	99,072
9	3,12	1101,3	107,983

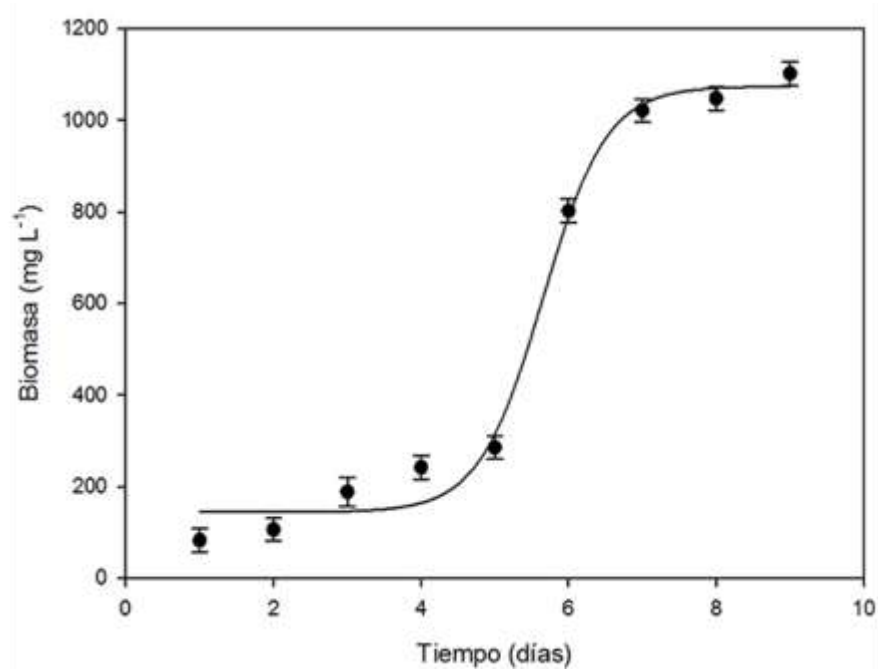
En la Figura 7 se observa una disminución gradual del pH a través del tiempo. Este descenso de pH está asociado con la producción de ácidos orgánicos por parte del hongo *Mortierella* sp (Osorio, 2003, Osorio y Habte, 2011, Osorno, 2014).

**Figura 7. Variación del fósforo soluble - P soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y pH en función del tiempo.**



El pH y la concentración de P soluble ( $\text{mg L}^{-1}$ ) están representadas por líneas continuas con triángulos negros y círculos negros, respectivamente. **Fuente:** Autora.

**Figura 8. Variación de biomasa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en función del tiempo.**



Fuente: Autora.

Así mismo se presenta un aumento en la concentración de fósforo solubilizado a medida que el pH disminuye. Osorio (2003) reportó una relación inversa entre el pH del medio y la concentración de fósforo para *Mortierella* sp. Osorno (2014) reportó al día 5 una disminución del pH de 7,6 a 3,15, con una concentración final de fósforo de 88,26  $\text{mg P L}^{-1}$  para *Mortierella* sp y una disminución del pH de 7,6 a 3,3, con una concentración final de 57,38  $\text{mg P L}^{-1}$  para *A. Niger*. Otros estudios también han mencionado que la reducción del pH está asociada a procesos de disolución de RF por MSF (Bojinova, *et al.*, 2008; Singh y Reddy, 2010; Zaidi *et al.*, 2009; Varsha y Patel, 1999). De acuerdo con lo anterior, las disminuciones de pH en este trabajo están en los rangos observados por otros autores. En lo que respecta a la concentración de fósforo, los resultados reportados son hasta 1,4 veces superiores.

En la literatura están documentadas tres situaciones en las que puede darse la formación de producto: *i*) asociada al crecimiento, *ii*) asociación mixta al crecimiento y *iii*) formación de productos no asociada al crecimiento (Díaz, 2012 y Shuler y Kargi, 2002). Al analizar la tendencia de la curva de fósforo solubilizado (Figura 7) y el crecimiento de biomasa (Figura 8) se observa que siguen la misma tendencia, lo cual indica que la formación de producto, es decir, la liberación de fósforo desde la RF, se encuentra asociada al crecimiento del hongo.

En la Figura 8 es posible diferenciar las 3 fases de crecimiento celular para la curva de biomasa: fase de latencia (día 1 y 2), exponencial (día 3 – día 7) y estacionaria (día 7 – día 9). La fase de latencia se consideró hasta el día 2 con un valor promedio de biomasa equivalente a  $94,3 \text{ mg L}^{-1}$ . Esta fase está relacionada con la adaptación al medio por parte del microorganismo. Al ser el P un constituyente importante para la síntesis metabólica de los microorganismos (Madigan *et al.*, 2003, Shuler y Kargi, 2002), la carencia de P en la concentración inicial del medio, puede ser un factor que prolongue la adaptación del hongo en esta etapa.

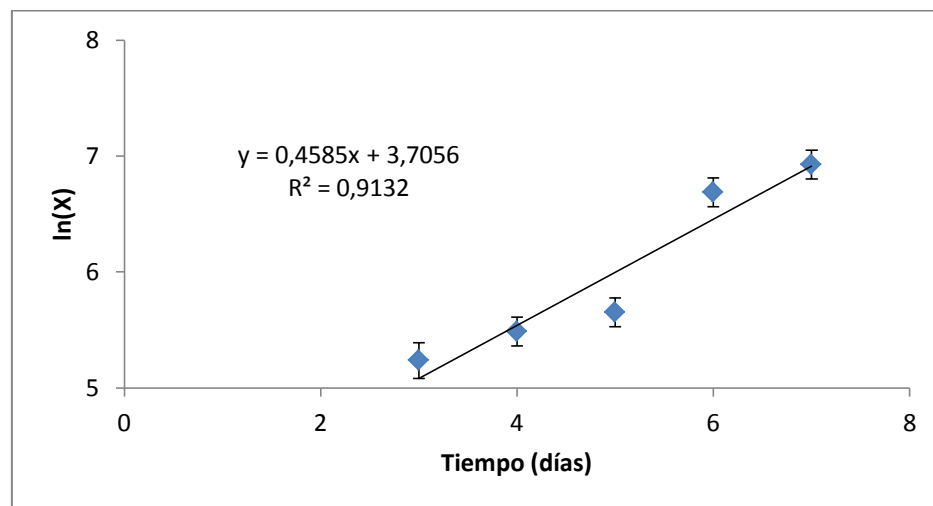
El comienzo de la fase exponencial se evidenció a partir del día 3 por un aumento significativo de biomasa  $X=188 \text{ mg L}^{-1}$  con respecto a los días 1 y 2. Esta fase continuó hasta el día 7, con un pronunciado crecimiento del hongo tal como se muestra en la Figura 8. A partir del día 7 se inició la fase estacionaria, donde no se presentaron diferencias significativas en los valores de biomasa, con un valor promedio de biomasa entre los días 7 y 9 de  $X=1056,44 \text{ mg L}^{-1}$ .

Al linealizar la ecuación de crecimiento exponencial (ecuación 3), se obtuvo una gráfica  $\ln(X)$  vs tiempo (Figura 9). En la gráfica se observa que los datos experimentales tienen tendencia a distribuirse sobre una línea recta, con un factor de ajuste  $R^2=0,913$ . A pesar de que el ajuste es bajo, representa un

primer intento por explicar el crecimiento del hongo en la zona exponencial. Un ajuste más riguroso implicaría el seguimiento de otras variables no contempladas en el presente estudio.

Basado en lo anterior, esta línea de tendencia indica que en la fase exponencial del crecimiento la velocidad específica ( $\mu$ ), es constante. Bajo esta consideración, la pendiente de la línea de tendencia representa el valor de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) con un valor de  $0,458 \text{ d}^{-1}$ .

**Figura 9. Modelo simple de crecimiento exponencial entre el día 3 y el día 7.**

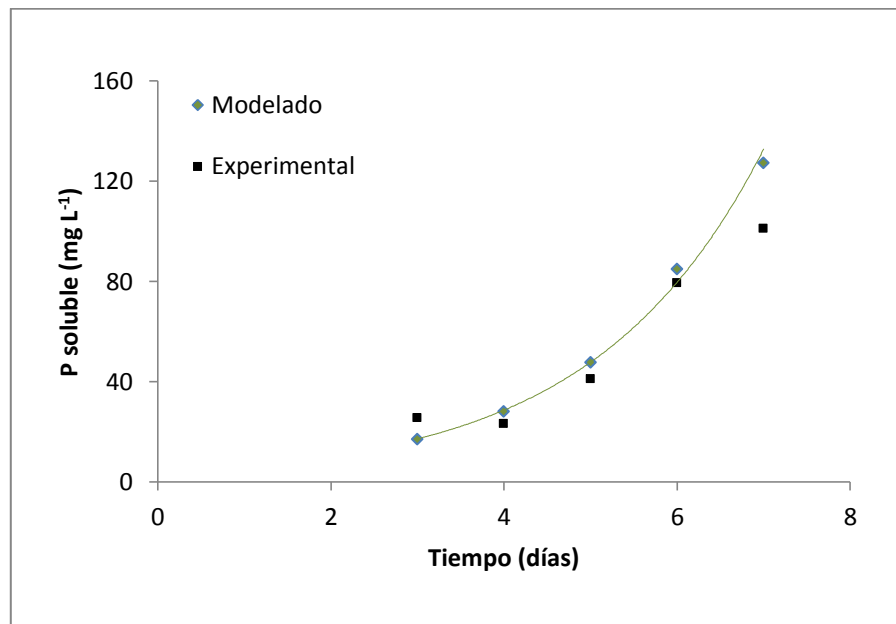


**Fuente:** Autora.

Dado que los datos experimentales se ajustaron al modelo simple de crecimiento celular en la zona exponencial se infirió una cinética de orden 1, lo cual indica que la velocidad de crecimiento es independiente de la concentración de sustrato (Díaz, 2012, Shuler y Kargi, 2002, Hernández, 2003). Si bien el modelo es el más simple se encontró que éste explica el crecimiento del hongo en la fase exponencial. El parámetro cinético  $Y_{P/X} = 0,1429$  fue calculado basado en la ecuación 11.

Una vez ajustados los parámetros cinéticos, se procedió a determinar el grado de predicción del modelo para la formación del producto (concentración de fósforo solubilizado). Si bien, el valor de la desviación relativa promedio fue de 20,8% las tendencias del modelo y los datos experimentales (Figura 10) son concordantes.

**Figura 10. Gráfica de fósforo soluble - P soluble vs Tiempo (días) representadas por los datos experimentales y modelo cinético en la zona exponencial.**



Fuente: Autora.

### 3. CONCLUSIONES

- Se encontró que la agitación es el factor que más contribuye en el proceso de bioacidulación de la roca fosfórica, con un valor de agitación de 107 rpm para obtener una concentración máxima de fósforo soluble de  $165 \text{ mg P L}^{-1}$ .
- Así mismo, se determinó que el factor tamaño de partícula no es determinante para el proceso, no obstante, existe una interacción mínima entre la agitación y tamaño de partícula.
- Se obtuvo un modelo de ajuste cinético de primer orden, cuyos parámetros cinéticos son  $\mu = 0,458 \text{ d}^{-1}$  y  $Y_{P/X} = 0.1429$  con un margen de error del 20.8%. Este resultado es el primer intento en describir el crecimiento del hongo y la formación de producto en la zona exponencial, en un proceso de bioacidulación de roca fosfórica por el hongo *Mortierella* sp.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arcand M, Schneider K. Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *An. Acad. Bras. Cienc.*. 2006; 78(4):791-807.
- Bojinova D, Velkova R, Ivanova R. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus Niger*. *Bioresour. Technol.* 2008; 99(15):7348-7353.
- Calich V, Purchio A, Paula C. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia.* 1978; 66(3):175-177.
- Consejo Nacional de Política Económica y Social. Documento Conpes 3577. Política nacional para la racionalización del componente de costos de producción asociado a los fertilizantes en el sector agropecuario. Bogotá, Colombia: 2009.
- Cordell D, Drangert J, White S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *NATO ASI Ser., Ser. I.* 2009; 19:292-305.
- Correl DL. The role of phosphorus in the eutrophication of receive waters: A review. *J. Environ. Qual.*. 1998; 27(2):261-266.
- Diaz M. Ingeniería de bioprocesos. España: Ediciones Paraninfo; 2012.
- Doran P. Bioprocess Engineering Principles. London: Academic Press Limited; 1995.
- Gilbert N. Environment: The disappearing nutrient. 2009; *Nature* 461(7265):716.
- Johnston AE. Soil and plant phosphate. París: International Fertilizer Industry Association; 2000.
- Goenadi DH, Sugiarto Y. Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus-solubilizing fungus. *Soil Sci. Soc. Am. J.*. 2000; 64:927-932.

- Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Dev. Plant Soil Sci.* 2002; 95:133-143.
- Hernández A. *Microbiología industrial*. Costa Rica: EUNED; 2003.
- Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 1995; 27(3):257-263.
- Jaramillo D. El recurso suelo y la competitividad del sector agrario colombiano. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: [www.unalmed.edu.co/~jjagudel/El suelo y el agro colombiano.pdf](http://www.unalmed.edu.co/~jjagudel/El_suelo_y_el_agro_colombiano.pdf). Acceso el 5 de Junio del 2014.
- Kelly S, Grimm LH, Hengstler J, Schultheis E, Krull R, Hempel DC. Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. *Bioprocess engineering*. 2004; 26(5), 315-323.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson-Prentice Hall; 2004.
- Murphy J, Riley JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. acta*. 1962; 27:31-36.
- Osorio NW. Strategies for Utilizing Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Phosphate-Solubilizing Microorganisms for Enhanced Phosphate Uptake and Growth of Plants in the Soils of the Tropics. En: *Microbial Strategies for Crop Improvement*. M.S. Khan *et al.* (editors). Berlin Heidelberg: Springer; 2009. p. 325-348p.
- Osorio NW, Habte M. Effectiveness of phosphate solubilizing microorganism in increasing plant phosphate uptake and growth in tropical soils. En: *Bacteria in agrobiología: plant nutrient management*. Maheshwari, editor. Berlin Heidelberg: Springer; 2011. p. 65-80.
- Osorio W. Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo en suelos de Hawaii. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2003.

- Osorno Bedoya L. Bio-acidulación de roca fosfórica bajo condiciones in vitro. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2014.
- Posch AE, Herwig C, Spadiut O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. Trends Biotechnol. 2013; 31(1): 37-44.
- Reddy S, Kumar S, Babita K. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubigensis* and *Aspergillus niger*. Bioresour. Technol.. 2001; 84:187-189.
- Richardson A, Simpson R. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. Plant Physiol. 2011; 156:989-996.
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. Plant Physiol. 1998; 116:447-453.
- Shigaki F, Sharpley A, Prochnow LI. Animal-based agriculture, phosphorus management and water quality in Brazil: options for the future. Sci. Agric. 2006; 63(2):194-209.
- Shuler M L. y Kargi F. Bioprocess engineering. Basic concepts. Upper Saddle River.: Prentice Hall; 2009.
- Singh H, Reddy MS. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. Eur. J. Soil Biol.. 2011; 47(1):30-34.
- Suárez Montoya A. Colombia, campeón mundial en precios de fertilizantes. El Espectador. Disponible en: <http://www.elespectador.com/noticias/nacional/colombia-campeon-mundial-precio-de-fertilizantes-articulo-440962>. Acceso el 20 Octubre 2013.
- Syers K, Bekunda M, Cordell D, Corman J, Johnston J, Rosemarin A, Salcedo I. Phosphorus and food production. UNEP Year Book 2011:34-45.
- Tomlinson I. A rock and a hard place. Peak phosphorus and the threat to our food security. Soil Association. Disponible en: <http://www.soilassociation.org/LinkClick.aspx?fileticket=eeGPQJORrkW%3D>. Acceso el 30 mayo 2014.

- Varsha N, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 2000; 32(4):559-565.
- Vassilev N, Vassileva M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 2003; 61(5-6):435-440.
- Vassilev N, Vassileva M, Azcon, R. Solubilization of rock phosphate by immobilized *Aspergillus Niger*. *Bioresour. Technol.* 1997; 59(1): 1-4.
- Walpola B, Yoon M. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultura soils: A review. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2012. 6(37): 6600-6605.
- World Bank Group. Phosphate Fertilizer Plants. Disponible en: [http://www.ifc.org/wps/wcm/connect/6c0bc90048855bda8a54da6a6515bb18/mxdfertilizer\\_PPAH.pdf?MOD=AJPERES](http://www.ifc.org/wps/wcm/connect/6c0bc90048855bda8a54da6a6515bb18/mxdfertilizer_PPAH.pdf?MOD=AJPERES). Acceso el 2 abril 2014.
- Xiao CQ, Chi RA, Huang XH, Zhang WX, Qiu G, Wang DZ. Optimization for phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecological Engineering.* 2008. 33(2): 187-193.
- Zaidi A, Khan MS, Ahemad M, Oves M, Wani PA. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. En: *Microbial Strategies for Crop Improvement*. M.S. Khan *et al.* (editors). Berlin Heidelberg: Springer; 2009. p. 325-348p.
- Zapata F. y Roy R.N. Utilización de las rocas fosfóricas para una agricultura sostenible. *Boletín FAO fertilizantes y nutrición vegetal* 13. 2007.