

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO  
BIOQUÍMICAS

I.I.F.B.



TESIS DE MAESTRÍA

---

PRODUCCIÓN DE ESTRUVITA A PARTIR DE  
ORINA MEDIANTE EL USO DE BACTERIAS  
DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE  
MURCIÉLAGOS.

Postulante: Lic. Adalid Vicente Alfaro Flores

LA PAZ-BOLIVIA

2018

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO  
BIOQUÍMICAS  
I.I.F.B.



TESIS DE MAESTRÍA

---

PRODUCCIÓN DE ESTRUVITA A PARTIR DE  
ORINA MEDIANTE EL USO DE BACTERIAS  
DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE  
MURCIÉLAGOS.

Postulante: Lic. Adalid Vicente Alfaro Flores

Tutora: María Teresa Álvarez Aliaga Ph.D.

Co-Tutora: Carla Crespo Melgar Ph.D.

LA PAZ-BOLIVIA

2018

### *Agradecimientos....*

Quiero agradecer sinceramente a todas aquellas personas e instituciones que colaboraron para hacer posible la conclusión de esta tesis, en especial a mis padres por el apoyo brindado, a mi tutora María Teresa Álvarez Aliaga y Co-Tutora Carla Crespo Melgar por las observaciones, correcciones y consejos, a mis docentes de la Maestría por todos los conocimientos que compartieron conmigo, a Oscar Cárdenas y Danitza Romero por su ayuda en el trabajo de laboratorio, al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas y la Agencia Sueca de Cooperación para el Desarrollo Internacional por el soporte técnico y financiero para la realización de este trabajo.

## Resumen

El fósforo es un elemento químico esencial para los ecosistemas terrestres. La mayor parte de este elemento es obtenida a partir de fosfatos minerales. Sin embargo, las reservas mundiales de este recurso están disminuyendo de forma alarmante. Por otra parte, los desechos líquidos que confluyen a los cuerpos de agua, contienen altas concentraciones de fosforo estableciéndose así las condiciones propicias para la eutrofización. De esta manera, la precipitación de fosforo en forma de estruvita constituye una alternativa de recuperación del fosforo con dos ventajas, la remediación de aguas residuales y la obtención de un fertilizante que restituya este nutriente en el suelo. La producción de estruvita se establece mayoritariamente a través de procesos fisicoquímicos, sin embargo, los altos costos de este proceso no permiten competir con los precios de los fertilizantes sintéticos. El proceso biotecnológico de la obtención de estruvita disminuye los costos de producción.

En Bolivia, agencias de cooperación han establecido programas de instalación de inodoros ecológicos secos con separación de la orina (IESSO), con la finalidad de dar un valor agregado al residuo fecal mediante la elaboración de compost. Sin embargo, estos programas de saneamiento no contemplan el tratamiento o uso específico de la orina. De esta manera, este tipo de saneamiento ofrece la disponibilidad de la orina como sustrato ideal para la producción biotecnológica de estruvita.

Las bacterias que se encuentran en la microbiota intestinal y los depósitos de guano de los murciélagos, se desarrollan en condiciones alcalinas con concentraciones elevadas de urea, lo que puede determinar la selección de cepas bacterianas especialmente adaptadas a inducir la precipitación de estruvita a partir de orina.

En este contexto en el presente estudio, se aisló de manera selectiva bacterias de la microbiota intestinal de murciélagos que fueron evaluadas en su capacidad de inducir la formación de estruvita a partir de orina y se identificó a nivel de especie la cepa que tuvo el mejor rendimiento en la producción de estruvita. Adicionalmente se determinó el pH, temperatura y relación de concentración Mg:P que maximizan la producción de estruvita bajo estas condiciones. Los cristales obtenidos fueron caracterizados mediante difracción de rayos X (DRX) y Espectrometría por dispersión de energías de rayos X acoplada a Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS). Cuatro cepas bacterianas fueron capaces de mineralizar estruvita a partir de orina. La cantidad de los cristales obtenidos (2,3 gL<sup>-1</sup> de orina) es similar a las concentraciones reportadas cuando se produce este mineral por métodos fisicoquímicos y la cepa que alcanzó estos niveles de producción fue *Alcaligenes faecalis* (GMD 13). A una relación de concentración 1:1 de Mg:P y una temperatura de 25°C se incrementó la cantidad de estruvita producida. Estos resultados demuestran que la mineralización de estruvita a partir de orina usando microorganismos, es un proceso factible, económicamente ventajoso y amigable con el medio ambiente con potencial aplicación en el tratamiento de colectas urinarias.

*Palabras clave; Bacterias, Murciélagos, Estruvita, Biorremediación, fertilizante, orina.*

## Abstract

Phosphorus is an essential element for terrestrial ecosystems. Most of this element is obtained from phosphate rock. However, the world reserves of this resource are decreasing alarmingly. On the other hand, wastewater that converge to the bodies of water, contain high concentrations of phosphorus thus establishing the conditions for eutrophication. In this way, the precipitation of phosphorus in the form of struvite constitutes an alternative for phosphorus recovery with two advantages, wastewater remediation and fertilizer production that restores this nutrient in the soil. Struvite production is mostly established through physicochemical processes. However, the high costs of this process do not allow to compete with the prices of synthetic fertilizers. The biotechnological process of obtaining struvite reduces the production costs.

In Bolivia, cooperation agencies have established programs for the installation of NoMix Toilets, in order to add value to fecal waste through the production of compost. However, these sanitation programs do not contemplate the specific treatment or use of urine. In this way, this type of sanitation offers the availability of urine as an ideal substrate for the biotechnological production of struvite.

Bacteria found in the gut microbiota and guano deposits of bats are able to growth under alkaline conditions with high concentrations of urea, which can determine the selection of bacterial strains specially adapted to induce struvite precipitation from urine.

In this context, in the present study, bacteria from the intestinal microbiota of bats were selectively isolated and evaluated in their ability to induce the formation of struvite from urine. The bacterial strain showing optimal struvite production was identified at the species level. Additionally, the pH, temperature and Mg: P concentration ratio, which maximize the production of struvite under these conditions were determined. The crystals obtained were characterized by X-ray diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscopy / Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDS). Four bacterial strains were able to mineralize struvite from urine. The amount of crystals obtained (2,3g L<sup>-1</sup> of urine) is similar to the reported concentrations when this mineral is produced by physicochemical methods. The bacterial strain showing this struvite production was identified as *Alcaligenes faecalis* (GMD 13). At a concentration ratio of Mg:P 1:1 and a temperature of 25 ° C , the concentration of produced struvite was increased. These results demonstrate that struvite mineralization from urine using microorganisms is a feasible, economically advantageous and environmentally friendly process with potential application in the treatment of urinary collections.

*Keywords; Bacteria, Bats, Struvite, Bioremediation, fertilizer, urine.*

## Índice

Resumen .....	4
Abstract.....	5
1. Introducción.....	7
2. Alcance de la Tesis. ....	10
3. Bio-estruvita.....	18
3.1 Características fisicoquímicas de la estruvita.....	10
3.2 Aplicaciones de los cristales de estruvita.....	11
3.3 Métodos fisicoquímicos para la producción de estruvita .....	13
3.3.1 Mecanismo para la formación de los cristales de estruvita .....	13
3.3.2 Producción fisicoquímica de estruvita .....	13
3.3.3. Procesos asociados .....	15
3.4 Factores que afectan la producción de estruvita.....	15
3.5.1 Microorganismos productores de estruvita.....	21
3.6 Mecanismo para la formación de Bio-estruvita .....	24
3.7 Factores que afectan la producción de Bio-estruvita.....	26
4. Antecedentes.....	27
5. Justificación.....	28
6. Objetivos .....	30
6.1. Objetivo General.....	30
6.2. Objetivos Específicos.....	30
7. Metodología.....	30
7.1 Toma de muestras y condiciones de aislamiento selectivo de cepas bacterianas con potencial formador de estruvita .....	30
7.2 Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de las cepas bacterianas formadoras de estruvitas .....	31
7.3 Evaluación de la capacidad de formación de Bio-estruvitas. ....	33
7.3.1 Medios y condiciones de cultivo. ....	33
7.3.2 Tratamientos.....	34
7.4 Identificación molecular de cepas bacterianas formadoras de estruvita.....	34
7.5 Optimización del proceso de producción de Bio-estruvita .....	35
7.5.1 pH inicial.....	35
7.5.2 Temperatura y Relación de concentración Mg:P .....	35
7.6 Evaluación de los cristales de Bio-estruvita .....	36
7.6.1 Separación de los cristales .....	36
7.6.2 Caracterización de los cristales .....	37
7.7 Análisis estadístico .....	37
8. Resultados y Discusión.....	38
8.1 Aislamiento selectivo de cepas bacterianas con potencial formador de estruvita a partir de heces demurciélagos. ....	38
8.2 Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de cepas bacterianas formadoras de estruvitas .....	39
8.3 Capacidad bacteriana formadora de estruvita.....	40
8.4 Identificación molecular de la cepa bacteriana formadora de Bio-estruvita. ....	44
8.5 Optimización de la producción de Bio-estruvita. ....	45
8.5.1 Efecto del pH inicial.....	45
8.5.2 Efecto de la Temperatura y Relación Mg/P.....	47
8.6 Caracterización de los cristales de Bio-estruvita.....	50
8.6.1 Separación de los cristales y morfología .....	50
8.6.2 Caracterización de los cristales .....	51
9. Conclusiones .....	52
10. Recomendaciones.....	53
11. Referencias.....	54

12. ANEXOS .....	73
12.1 REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	73
12.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS y FISIOLÓGICAS DE LAS CEPAS AISLADAS.....	74
12.3 OPCIONES DISEÑO CENTRAL COMPUESTO PARA OPTIMIZAR EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIO-ESTRUVITA .....	76
12.4 MODELO DE PRIMER ORDEN USANDO $MgCl_2$ COMO FUENTE DE .....	76
12.5 MODELO DE SEGUNDO ORDEN USANDO $MgCl_2$ COMO FUENTE DE MAGNESIO.....	77
12.6 PATRONES DE DIFRACCIÓN XRD .....	77
12.7 RESULTADOS DEL ANÁLISIS SEM-EDS .....	81

## 1. Introducción

Debido al crecimiento descontrolado de la población humana en el último siglo, el vertido de desechos en lagos, ríos y mares ha aumentado de forma exponencial y se estima que apenas el 20% de los residuos líquidos son tratados antes de que desemboquen en algún cuerpo de agua (de Vries y López, 2013).

La falta de tratamiento de aguas residuales trae serias consecuencias al medio ambiente (Glazer y Nikaido, 2007). Los principales contaminantes presentes en desechos líquidos son compuestos inorgánicos de fósforo y nitrógeno, que destacan no solo por su abundancia sino también por su peligrosidad, ya que estos nutrientes son la principal causa de eutrofización de los cuerpos de agua (de-Bashan, y Bashan, 2002).

La eutrofización afecta a los ecosistemas acuáticos interfiriendo con el ciclo de nutrientes y reduciendo drásticamente la biodiversidad (Nelson *et al.* 2006). Debido a esto, remover fósforo y nitrógeno de aguas residuales antes de que desemboquen en cuerpos de agua se ha convertido en una prioridad para las plantas de tratamiento de agua residual (de-Bashan y Bashan, 2004).

El nitrógeno presente en aguas residuales puede ser removido mediante procesos microbiológicos como; Nitrificación parcial, Anammox (Anaerobic ammonia oxidation), CANON (completely autotrophic nitrogen removal over nitrite) y Procesos NOx. Estas metodologías están basadas en la actividad metabólica de microorganismos que obtienen energía a través de la oxidación de compuestos orgánicos (Schmidt,*et al.*, 2003). La oxidación de compuestos nitrogenados realizada por microorganismos puede tener como producto final la emisión de gases de efecto invernadero CO<sub>2</sub>, NO y N<sub>2</sub>O, y este es la principal desventaja de los procesos de remoción de nitrógeno porque si bien reducen la carga de nutrientes en aguas residuales empeoran el problema del calentamiento global (Rahman *et al.*, 2014).

Por otra parte, el contenido de fósforo en aguas residuales también es alto (Le Corre et al., 2009) y para disminuir la concentración de este nutriente en desechos líquidos se cuenta con métodos químicos, que precipitan el fósforo en forma de sales minerales (Driver et al., 1999), y métodos biológicos como la construcción de humedales, remoción biológica del fosforo BPR mediante el cultivo de microorganismos en aguas residuales (cianobacterias o microalgas) (Le Corre et al., 2009), y el uso de organismos



acumuladores de polifosfato PAOs en tecnologías relacionadas a Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) (de-Bashan y Bashan, 2002; 2004).

Adicionalmente existe un proceso que permite recuperar ambos nutrientes a la vez, esta metodología precipita el fósforo y nitrógeno presente en aguas residuales en forma de cristales de estruvita (Battistoni *et al.*, 2000; Çelen *et al.*, 2007; Sánchez-Román *et al.*, 2007; Hjorth *et al.*, 2011; Rodríguez-García *et al.*, 2014; Soares *et al.* 2014; You *et al.*, 2015).

Tratar aguas residuales precipitando cristales de estruvita, tiene varias ventajas; es más eficiente que otras tecnologías (hasta un 90% del P y 50% del N puede ser recuperado), genera una mínima cantidad de subproductos no deseados (Antonini *et al.*, 2011; Rahman *et al.* 2014; Rodríguez-García *et al.*, 2014) y reduce los costos de mantenimiento en las plantas de tratamiento de aguas (Williams, 1999; Kim *et al.* 2007; Le Corre *et al.*, 2009). Además, los cristales de estruvita pueden ser usados como fertilizante (Prabhu y Mutnuri, 2014; Cerrillo *et al.*, 2015), para fabricar materiales resistentes al fuego y microestructuras que alberguen catalizadores químicos (Chen *et al.*, 2010).

Las propiedades de los cristales de estruvita como fertilizante son ampliamente conocidas (Uysal *et al.*, 2015; Vogel *et al.*, 2015; You *et al.*, 2015), además de tener un alto contenido de nutrientes y propiedades similares a los fertilizantes químicos, liberan el fósforo y nitrógeno de manera lenta (Cerrillo *et al.*, 2015), lo que permite a la planta asimilar mejor los nutrientes y a la vez reduce la emisión de gases de efecto invernadero como el NO<sub>2</sub> (Fukumoto *et al.* 2012; Rahman *et al.*, 2014).

La producción de fertilizante a partir de cristales de estruvita es objeto de una activa investigación (Uysal *et al.*, 2015; Vogel *et al.*, 2015; You *et al.*, 2015), ya que el fósforo es un nutriente esencial para las plantas y las reservas minerales de este elemento se están agotando a un ritmo alarmante (Gilbert, 2009; Sinha *et al.* 2014), por lo que la producción de estruvita a partir de aguas residuales es una opción promisoriosa (Cordell *et al.* 2009). Sin embargo, los costos de operación para la obtención de estruvita son altos, y los fertilizantes a base de este mineral aún no pueden competir con los fertilizantes químicos presentes en el mercado (Shu *et al.*, 2006; Fukumoto *et al.*, 2012).

Los elevados costos de producción de los fertilizantes basados en estruvita, se deben a que, en la actualidad la obtención de la estruvita se realiza por métodos fisicoquímicos, que involucran el uso de reactivos y procesos complejos (Kofina y Koutsoukos 2005; Çelen *et al.*, 2007; Hjorth *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2012). Para solucionar estos inconvenientes se ha comenzado a estudiar la producción biológica de estruvita a partir de aguas residuales, orina y otros desechos líquidos (Udert *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014).

La producción biológica de estruvita (o Bio-estruvita, nombre del mineral cuando es producido por microorganismos), aprovecha las características metabólicas y estructurales de algunas bacterias que favorecen la biomineralización de los cristales de estruvita, de forma que no se tiene que recurrir al uso de reactivos y procedimientos adicionales para generar el mineral (Ben Omar *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 1991; Sánchez-Román *et al.*, 2007; Haferburg *et al.*, 2008; Rivadeneyra *et al.*, 2010).

La mayoría de las bacterias capaces de inducir la formación de estruvita son Gram negativas y pertenecen a la clase *Alphaproteobacteria* (Rivadeneyra *et al.*, 1992; Sánchez-Román *et al.*, 2007). Independientemente de su origen filogenético, todas las bacterias formadoras de estruvita comparten ciertas características metabólicas y estructurales entre las que destacan; presencia de superficies cargadas eléctricamente (en la membrana externa o pared celular) (Beavon y Heatley 1962; Rivadeneyra *et al.*, 1992a; Ben Omar *et al.*, 1994; Sánchez-Román *et al.*, 2007; 2011; Le Corre *et al.*, 2009; Sadowski *et al.*, 2010; Eisner *et al.*, 2014), capacidad de desarrollarse a pH alcalino (pH en el que se forma la estruvita) (Ben Omar *et al.* 1994; Barbosa *et al.* 2016) y actividad enzimática proteolítica y/o ureasa (Downey *et al.*, 1992; Ben Omar *et al.*, 1994; Dumanski *et al.*, 1994; Rivadeneyra *et al.*, 1999; González-Muñoz *et al.*, 2008; Tauch *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010).

Los reducidos costos de la producción biológica de estruvita han alentado varias investigaciones con el objetivo de optimizar los procesos y mejorar la producción (Udert *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014), sin embargo, aún quedan muchos vacíos de información sobre los factores que determinan la biomineralización de la estruvita y los mecanismos metabólicos subyacentes (Soares *et al.*, 2014).

El presente trabajo tuvo el objetivo de aislar de manera selectiva cepas bacterianas capaces de inducir la formación de estruvita, a partir de la microbiota intestinal de

murciélagos, y usar estos microorganismos para optimizar las condiciones de cultivo que maximicen la producción de este mineral.

## **2. Alcance de la Tesis.**

La presente investigación comenzó con una extensa revisión bibliográfica que permitió identificar hábitats que favorecen el desarrollo de bacterias capaces de inducir la formación de estruvita. De todos los ambientes identificados, se eligió la microbiota intestinal de murciélagos para la toma de muestras y el aislamiento selectivo de cepas bacterianas productoras de estruvita a partir de orina.

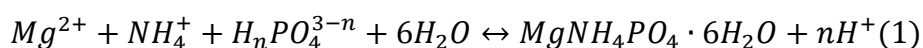
Las bacterias productoras de estruvita aisladas de la microbiota intestinal de murciélagos fueron caracterizadas a nivel morfológico, fisiológico y molecular, además de evaluar su rendimiento en la producción del mineral. La cepa bacteriana con el mejor rendimiento en la producción de estruvita fue utilizada para optimizar las condiciones de cultivo (pH, temperatura y concentración de magnesio) para maximizar la producción del mineral.

Sin embargo, es preciso resaltar que la optimización de las condiciones de cultivo se realizó en ensayos de laboratorio usando un solo tipo de orina y en condiciones ambientales propias de la ciudad de La Paz, por lo que las conclusiones obtenidas no necesariamente representan los parámetros de cultivo ideales para cualquier tipo de orina y todos los ambientes.

### **3.1 Características fisicoquímicas de la estruvita**

La estruvita es un mineral fosfato de nombre químico: fosfato de magnesio y amonio hexahidratado, y fórmula química  $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ , tiene forma cristalina y un color blanco brillante (Le Corre *et al.*, 2009) con 12% de contenido de fósforo y 6% de nitrógeno (Yuan *et al.*, 2012).

Los cristales de estruvita se forman a partir de los siguientes compuestos;



La estruvita tiene un peso molecular de  $245.43 \text{ g.mol}^{-1}$ , una gravedad específica de  $\rho = 1.711 \text{ g.cm}^{-3}$  (Le Corre *et al.*, 2009), y una densidad de  $1,7 \text{ g.ml}^{-1}$  (Yuan *et al.*, 2012).

Los cristales de estruvita son poco solubles en agua ( $0.018 \text{ g } 100 \text{ ml}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ ), pero se disuelven con facilidad en ácidos diluidos y durante la dilución no existe evolución de gas (e.g.  $0.178 \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  en  $0.01 \text{ N HCl}$ ) (Beavon & Heatley 1962; Uludag-Demirer *et al.*, 2008; Le Corre *et al.*, 2009). Su constante de solubilidad es cercana a  $\text{pK}_{\text{so}}=13.26$  (Ohlinger *et al.*, 1998), pero puede variar con la temperatura ( $13.00$ ,  $12.82$ ,  $12.63$  y  $13.20$  a  $14.5$ ,  $20$ ,  $25$  y  $35^\circ\text{C}$  respectivamente) (Moussa *et al.*, 2011).

Los cristales de estruvita no son inflamables (Uludag-Demirer *et al.*, 2008), pero comienzan a descomponerse a  $55^\circ\text{C}$  (Ramlogan y Rouff, 2015) y se desestructuran totalmente en temperaturas superiores a los  $80^\circ\text{C}$  (Frost *et al.*, 2004).

La estructura interna de los cristales de estruvita está conformada por pequeñas subunidades tridimensionales (Prywer *et al.*, 2012) de entre  $1$  y  $3 \mu\text{m}$  (Prywer & Torzewska, 2010). Son cristales birrefringentes con propiedades polares y poseen una simetría ortorrómbica (Whitaker y Jeffery, 1970; Le Corre *et al.*, 2009), las dimensiones aproximadas para cada unidad de celda son  $6,9 \times 11,1 \times 6,1 \text{ \AA}$ , el patrón XRD de referencia es PDF 01-077-2303 (Beavon & Heatley, 1962; Prywer & Torzewska, 2010).

La estructura interna del cristal de estruvita está formada principalmente por puentes de hidrogeno lo que la hace altamente susceptible a cambios en la forma por efecto del pH o presencia de impurezas como níquel y potasio (Ben Omar *et al.*, 1996; Haferburg *et al.*, 2008).

A nivel macroscópico los cristales de estruvita presentan variedad de formas (Sánchez-Román *et al.*, 2011) poliédrica, pseudo-poliédrica, ramas dendríticas o en forma de barra (González-Muñoz *et al.*, 2008), este hemimorfismo lo define como un mesocristal, puesto que la agregación de unidades de celda puede darse por las diferencias de polaridad a lo largo de los ejes del cristal (Prywer & Torzewska, 2010).

La forma que adquiera el cristal dependerá de varios factores como ser el pH, la velocidad a la que se agregan las unidades de celda, e incluso el tipo de microorganismo involucrado en el proceso de biomineralización (Prywer *et al.*, 2012).

### **3.2 Aplicaciones de los cristales de estruvita**

La producción de estruvita se lleva a cabo con varios fines, sin embargo, su principal aplicación es la remoción del fósforo y nitrógeno durante el tratamiento de aguas residuales, con el fin de disminuir la concentración de estos nutrientes en las descargas de las plantas de tratamiento de aguas (Chen *et al.*, 2010).

Diversos desechos pueden ser tratados mediante la precipitación de cristales de estruvita, entre los principales están; aguas residuales domésticas, agropecuarias e industriales (Çelen *et al.*, 2007; Uludag-Demirer *et al.*, 2008; Kabdaşlı *et al.*, 2009; Hjorth *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013), lodos producidos por digestión anaeróbica (Rodríguez-García *et al.*, 2014), subproductos de compostaje (Jeong *et al.*, 2005; Fukumoto *et al.*, 2012), lodos de digestores EBPR (Enhanced Biological Phosphorus Removal) (Yuan *et al.*, 2012), lixiviado proveniente del riego de campos agrícolas (Huang *et al.*, 2014), y orina humana o de otro animal (Maurer *et al.*, 2008; Ronteltap *et al.*, 2010; Etter *et al.*, 2011).

La remoción del fósforo y nitrógeno presente en desechos líquidos mediante la precipitación de cristales de estruvita trae grandes beneficios para el medio ambiente puesto que, reduce significativamente la emisión de NO<sub>2</sub> y otros gases nitrogenados a la atmósfera, reduciendo el calentamiento global (Jeong *et al.*, 2005; Zhang y Lau, 2007; Hjorth *et al.* 2011; Fukumoto *et al.*, 2012; Rahman *et al.*, 2014), mejora el rendimiento de los digestores anaeróbicos al disminuir la concentración de amonio (Uludag-Demirer *et al.*, 2008; Hjorth *et al.*, 2011), aumenta la eficiencia y disminuye los costos de operación de las plantas de tratamiento de agua (Mohajit *et al.*, 1989) y reduce los problemas de eutrofización en cuerpos de agua (de-Bashan, y Bashan, 2002; Kabdaşlı *et al.* 2009; Chen *et al.*, 2010).

Adicionalmente, una vez obtenidos los cristales de estruvita estos pueden ser purificados y usados para fabricar partículas que alberguen catalizadores químicos (Chen *et al.*, 2010), paneles resistentes al fuego (Uludag-Demirer *et al.*, 2008), como materia prima para la producción de fósforo (Kofina y Koutsoukos, 2005), o ser empleados directamente como fertilizante (Singh *et al.*, 2017). Por todas estas aplicaciones se estima que una tonelada de estruvita podría llegar a comercializarse hasta en 240 euros (Cerrillo *et al.* 2015).

El uso de cristales de estruvita como fertilizante ha mostrado tener similares o mejores efectos que los fertilizantes químicos (Johnston y Richards, 2003; Kabdaşlı *et al.* 2009;

Cerrillo *et al.*, 2015; Uysal *et al.*, 2015), puesto que libera fósforo y nitrógeno de forma paulatina (Fukumoto *et al.*, 2012; Prabhu y Mutnuri, 2014; Vogel *et al.*, 2015) permitiendo que la planta aproveche este mineral casi en su totalidad (Jeong *et al.*, 2005; Karak *et al.* 2015).

### **3.3 Métodos fisicoquímicos para la producción de estruvita**

#### **3.3.1 Mecanismo para la formación de los cristales de estruvita**

La formación del cristal de estruvita es un proceso complejo que depende de la temperatura (Le Corre *et al.* 2005, 2009) y el pH del medio (Clapham *et al.*, 1990; Doyle *et al.* 2000; Le Corre *et al.*, 2005), así como de la concentración y nivel de supersaturación de los iones que componen al mineral (Ohlinger *et al.*, 1999; Le Corre *et al.*, 2005: 2009; Rahman *et al.*, 2014). Cuando se dan las condiciones propicias, el producto de la actividad iónica en equilibrio de todas las moléculas que participan en la reacción permite alcanzar la constante de formación de la estruvita y da comienzo el crecimiento del cristal (Hjorth *et al.*, 2011).

El proceso de formación del cristal de estruvita comienza con la nucleación primaria, que se da de manera espontánea en medios altamente puros o debe ser inducida por partículas “semilla” (e.g. arena) cuando el medio contiene impurezas (Le Corre *et al.*, 2009), una vez formados los primeros cristales estos exponen su superficie permitiendo que ocurra la nucleación secundaria (Shimamura *et al.*, 2003), bajo el mismo mecanismo que la nucleación primaria dando paso a la formación de más cristales y el crecimiento de la partícula (Wang *et al.*, 2013).

#### **3.3.2 Producción fisicoquímica de estruvita.**

El conocimiento acerca del mecanismo molecular para la cristalización de la estruvita ha permitido desarrollar procedimientos para obtener el mineral a partir de residuos líquidos (Battistoni *et al.*, 2000; Çelen *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2008; Kabdaşlı *et al.*, 2009; Ronteltap *et al.*, 2010; Hjorth *et al.* 2011).

El proceso de producción fisicoquímica de estruvita comprenden cuatro etapas: i) Se obtiene o modifica un medio para que exista una alta concentración de iones de amonio y fosfato, ii) Se eleva el pH a un valor superior a 8,5 iii) Se adiciona una fuente de magnesio de tal manera que se superen las cantidades equimolares presentes en la

estruvita 1:1:1 Mg/NH<sub>4</sub>/PO<sub>4</sub>, iv) A menos que se esté trabajando en condiciones de laboratorio es necesario colocar algún tipo de partícula que sirva de “semilla” para el crecimiento de los cristales (Le Corre *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2014).

Las variantes en cada una de las etapas, son descritas a continuación:

i) *Medio:*

Básicamente cualquier medio líquido con alto contenido de materia orgánica puede ser usado para la producción de estruvita, entre los sustratos más frecuentes se encuentran; a) Aguas residuales de origen doméstico o industrial, algunas veces no contienen la cantidad necesaria de nutrientes por lo que es necesario concentrarlas (Kabdaşlı *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2012) b) Orina, de origen humano o de otro animal (Maurer *et al.*, 2008; Ronteltap *et al.*, 2010; Antonini *et al.*, 2011; Etter *et al.*, 2011; You *et al.*, 2015), este residuo líquido contiene una alta concentración de nutrientes, sin embargo casi el 80% del nitrógeno de la orina se encuentra en forma de urea que no es directamente aprovechable para la formación de estruvita (Basakçilardan-Kabakci, *et al.*, 2007), debido a esto es preciso tratar previamente a la orina con ureasa o congelarla y descongelarla repetidamente para degradar la urea y liberar iones de amonio al medio (Ganrot *et al.*, 2007; Ronteltap *et al.*, 2010) c) Estiércol líquido (Nelson *et al.*, 2006; Çelen *et al.*, 2007; Hjorth *et al.*, 2011) d) Sobrenadantes de digestores anaeróbicos (Battistoniet *al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2012) e) Lixiviados de riego de campos de cultivo (Huang *et al.*, 2014).

ii) *pH:*

Dos metodologías son empleadas para elevar el pH del medio a valores superiores de 8,5; a) Adicionar NaOH (Ueno y Fujii, 2001; Maurer *et al.*, 2008; Hjorth *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2012; Cusick *et al.* 2014) b) Mediante la aireación del medio que remueve el CO<sub>2</sub> lo que aumenta la alcalinidad (Ohlinger *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2002; Moussa *et al.*, 2011; Cerrillo *et al.* 2015).

iii) *Fuente de Magnesio:*

No existe una fuente de magnesio ideal para todos los medios y condiciones, se ha usado; MgCl<sub>2</sub>(Suzuki *et al.*, 2006; Uludag-Demirer *et al.*, 2008; Hjorth *et al.* 2011; Yuan *et al.*, 2012), MgO (Ganrot *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2018),

MgCO<sub>3</sub> (Gunay et al., 2008) o salmuera (proveniente de la extracción de sal a partir de agua de mar) (Etter *et al.*, 2011) con similares resultados.

iv) *Partícula semilla:*

Para favorecer la nucleación de los cristales generalmente se usa arena (Le Corre *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2014) o cristales de estruvita formados anteriormente (Shimamura *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2011b).

### 3.3.3. Procesos asociados

Es preciso mencionar que la producción de estruvita puede ser acoplada a otros procesos involucrados en el tratamiento de aguas residuales, con el fin de mejorar la eficiencia en la remoción de nutrientes, algunos de estos procesos asociados son; Microbial fuel cells (MFCs) (Ichihashi y Hirooka, 2012; Hirooka *et al.*, 2013; Cusick *et al.*, 2014; You *et al.*, 2015), producción de biogás (Hjorth *et al.*, 2011), digestión anaerobia (Munch y Barr, 2001; Marti *et al.*, 2008), producción de hidrógeno Chamber microbial electrolysis struvite-precipitation cell (MESC) (Cusick y Logan, 2012) y Digestores EBPR (Enhanced Biological Phosphorus Removal) (Yuan *et al.*, 2012).

### 3.4 Factores que afectan la producción de estruvita

Se ha realizado muchos estudios con el fin de optimizar el proceso de producción de estruvita usando métodos fisicoquímicos (Mamais *et al.*, 1994; Ohlinger *et al.*, 2000; Le Corre *et al.*, 2005; Hjorth *et al.*, 2011; Wu & Zhou, 2012; Wang *et al.*, 2013; Cerrillo *et al.* 2015). Estas investigaciones lograron identificar y cuantificar los factores que favorecen o inhiben la producción de estruvita, siendo las principales variables que afectan la precipitación:

a) *pH:*

El pH es un factor de primordial importancia para la formación de cristales de estruvita (Le Corre *et al.*, 2009; Wu & Zhou, 2012; Rahman *et al.*, 2014; Cerrillo *et al.* 2015), aunque no es la única variable que determina la eficiencia de la precipitación (Rivadeneira *et al.*, 1999).

Las condiciones para la formación de estruvita solo se dan a pH básico debido a que el ion Mg<sup>2+</sup> es insoluble en ambientes alcalinos (Clapham *et al.* 1990), lo que favorece a su vez la precipitación del amonio y el fosfato (Gadekar &



Pullammanappallil, 2010; Ronteltap *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2012); debido a este fenómeno, a mayor pH aumenta la rapidez y cantidad de cristales de estruvita formados (Ben Omar *et al.*, 1994; Wu & Zhou, 2012).

El rango de pH en el que se puede formar cristales de estruvita va de 7.5 a 10, a pH superiores a 10 no se aprecia un aumento significativo en la eficiencia de precipitación (Ben Omar *et al.*, 1994; Da Silva *et al.*, 2000; Doyle *et al.*, 2000; Stratful *et al.* 2001; Sadowski *et al.* 2010).

Cada autor, dependiendo de las condiciones experimentales y la interacción con otras variables, ha determinado un pH óptimo que maximiza la producción de estruvita y la remoción de fosfatos del medio, algunos ejemplos son; pH 8 (Nelson *et al.*, 1991), pH 8,5 (Ueno y Fujii, 2001; Suzuki *et al.*, 2002), pH 9 (Nelson *et al.*, 2006; Gunay *et al.*, 2008; Cerrillo *et al.*, 2015; Wang *et al.* 2016), pH 9,5 (Lee, *et al.* 2003; Gadekar & Pullammanappallil, 2010; Ronteltap *et al.*, 2010; Sadowski *et al.* 2010), pH 9.7 (Ye *et al.*, 2010; Wu & Zhou, 2012), pH 9.9 (Wu & Zhou, 2012), pH 10.0 (Zhang *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2015), estos resultados ponen de manifiesto que el pH óptimo debe ser establecido experimentalmente para cada proceso de producción en particular.

#### b) *Concentración de iones:*

El segundo factor en importancia que determina la cantidad de estruvita formada, es la concentración de sus componentes: magnesio, amonio, fosfato y agua (Le Corre *et al.* 2005). Amonio, fosfato y agua son abundantes en la mayoría de los medios que se emplean en la producción de estruvita (Wilsenach *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2008; Capdevielle *et al.*, 2013; Jeong *et al.*, 2014).

Al contrario, el magnesio siempre está presente en baja concentración en el medio (e.g. 70 ppm en la orina) (Grases *et al.*, 1996), además de esto el ion  $Mg^{2+}$  pueden asociarse a otras moléculas (Hjorth *et al.*, 2011) o formar  $Mg_3(PO_4)_2$  (Wu & Zhou, 2012), lo que provoca que no todo el Magnesio presente esté disponible para la formación de estruvita (Hjorth *et al.*, 2011).

Por estas razones, la adición de magnesio al medio es indispensable para la producción de estruvita (Rahman *et al.*, 2014), y una mayor concentración de este ion genera cristales más grandes y numerosos (Beavon & Heatley 1962; Jaffer *et al.*, 2002)

Algunas de las relaciones molares óptimas determinadas experimentalmente entre el Mg/P/N son detalladas a continuación (considerando que el agua siempre está en exceso en el medio); 1:1:1 (Jaffer et al. 2002; Zhang *et al.*, 2012), 1.1:1:1 (Etter *et al.* 2011; Wu & Zhou, 2012), 1.2:1:1 Mg/P (Nelson *et al.*, 2006; Liu et al. 2011a; Wu & Zhou, 2012; Wang et al. 2016), 1,3:1;1 (Jaffer *et al.*, 2002), 1.5:1 (Basakcildan-Kabakci, *et al.*, 2007; Prabhu y Mutnuri, 2014; Uysal *et al.*, 2015), 2:1:1 (Doyle *et al.*, 2002), 3:1:1 (Huang *et al.*, 2014). Al igual que el caso del pH, la relación molar Mg/P/N óptima debe ser establecida experimentalmente para cada condición en particular.

En algunos medios, como lixiviados de tierra de compostaje o subproductos de la producción agrícola, existe una excesiva concentración de amonio, en estos casos la relación P/N se convierte en un factor limitante y no solo debe adicionarse magnesio al medio sino también fosfato (Maurer *et al.*, 2008; Wu & Zhou, 2012; Capdevielle *et al.*, 2013; Jeong *et al.*, 2014).

a) *Calcio, Hierro y otros elementos:*

La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el sustrato disminuye la cantidad de cristales de estruvita formados, debido a que reduce la concentración de iones fosfato y magnesio en el medio, que precipitan en forma Hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) y Dolomita ( $\text{Ca Mg}(\text{CO}_3)_2$ ) respectivamente (Le Corre *et al.*, 2005; Gadekar & Pullammanappallil, 2010; Yuan *et al.*, 2012; Cerrillo *et al.*, 2015). Para revertir esta situación es preciso aumentar la concentración de magnesio a por lo menos el doble de la cantidad de calcio presente (Sánchez-Román et al. 2007; Capdevielle *et al.*, 2013).

El cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) también reduce la cantidad de estruvita formada, debido a que precipita el fosfato como sal (Mamais *et al.*, 1994), sin embargo, este compuesto rara vez se encuentra presente en los desechos líquidos usados para la producción de estruvita. Otros elementos como el sodio, potasio o níquel afectan la pureza más que la cantidad de estruvita formada (Cerrillo *et al.* 2015).

b) *Temperatura:*

La temperatura no parece afectar la cinética de nucleación de los cristales de estruvita (Moussa *et al.*, 2011), pero si disminuye su tasa de precipitación puesto

que la solubilidad de este mineral aumenta al subir la temperatura (Rivadeneira *et al.*, 1989; Le Corre *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010).

*c) Tipo de reactor:*

Una amplia variedad de reactores han sido ensayados para la producción de estruvita tanto a escala piloto como a nivel industrial (Rahman *et al.*, 2014), sin embargo, los reactores de lecho fluidizado son los que mejores resultados han mostrado (Ohlinger *et al.* 2000; Le Corre *et al.* 2009; Yuan *et al.* 2012).

*d) Agitación:*

La agitación del medio reduce el tiempo de inducción requerido para la precipitación de los cristales de estruvita, debido a que aumenta la tasa de nucleación primaria (Wang *et al.*, 2006; Le Corre *et al.*, 2009; Ronteltap *et al.*, 2010), y como ya se mencionó anteriormente, también eleva el pH del medio al remover el CO<sub>2</sub> (Cerrillo *et al.*, 2015). A pesar de este factor, una excesiva agitación disminuye el tamaño de los cristales lo que puede dificultar el proceso de separación y purificación del mineral (Ronteltap *et al.*, 2010).

*e) Semilla:*

Se ha establecido que para que la nucleación secundaria de los cristales de estruvita ocurra es necesario la presencia de partículas en el medio, ya sean cristales de estruvita formados durante la nucleación primaria (Liu *et al.*, 2011b; Wang *et al.*, 2013), o arena (Hjorth *et al.*, 2011). Estudios recientes muestran que una concentración óptima de estas partículas está alrededor de los 25 mg L<sup>-1</sup> (Ren *et al.*, 2015).

### **3. 5 Bio-estruvita**

La biomineralización, es el proceso en el cual la formación de un mineral es inducida por uno o varios organismos, sin que intervengan en este proceso macromoléculas específicas (Lowenstam y Weiner, 1989). Los procesos de biomineralización dependientes de actividad bacteriana ocurren en suelos, guano, sedimentos y materia orgánica en descomposición (Haferburg *et al.*, 2008). Más de 70 minerales son producto de la biomineralización mediada por microorganismos (Gebeshuber, 2015).

La biomineralización juega un rol importante en los ciclos biogeoquímicos dentro del ecosistema y los mecanismos que controlan este proceso parecen depender más de las condiciones ambientales que de la actividad de un microorganismo en particular (González-Muñoz *et al.*, 2010). Un ejemplo claro de este fenómeno es la formación de estruvita, por una parte, estudios en ecología microbiana muestran que más del 20% de las bacterias presentes en suelos y agua son capaces de inducir la formación de estruvita (Rivadeneira *et al.*, 1983; González-Martínez *et al.*, 2015), pese a esto, la estruvita no se encuentra con facilidad en la naturaleza (Sánchez-Román *et al.* 2007).

Existen dos explicaciones para esta aparente contradicción: 1) la capacidad de una bacteria de inducir la formación de estruvita es una condición necesaria pero no suficiente para que ocurra la precipitación de este mineral, es decir no solo debe estar presente la bacteria sino también deben existir condiciones ambientales específicas (pH elevado, alta concentración de nutrientes, materia orgánica en descomposición) (Nelson *et al.*, 1991, Albuquerque *et al.*, 2010), 2) la estruvita un mineral metaestable, y muchos de los cristales que se forman cuando se dan las condiciones apropiadas, no permanecen el tiempo suficiente para que se registre su presencia (Delgado *et al.*, 2013).

Se han descrito varios ambientes naturales donde los microorganismos inducen la formación de estruvita (en algunas ocasiones llamada Bio-estruvita para distinguirla de los cristales de estruvita producidos por medios fisicoquímicos) algunos ejemplos de estos ambientes son: alcantarillas medievales (Ben Omar *et al.*, 1996), heces de murciélago, la sclerotia de algunos hongos (Nelson *et al.*, 1991), filtros en plantas de tratamiento de agua (Rivadeneira *et al.* 2014), establos, suelos de cementerios, orillas de lagos ricos en materia orgánica (Sánchez-Román *et al.*, 2007), debajo de líquenes costrosos, biofilms bacterianos (Czichos *et al.*, 2006), conductos del sistema urinario de mamíferos (Eisner *et al.* 2014), y campos de concentración abandonados (Rajkowska *et al.* 2014).

Todos estos ambientes tienen características en común; presencia de sedimentos, materia orgánica en descomposición (Nelson *et al.*, 1991), alta concentración de nutrientes y pH elevado (Sánchez-Román *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2010), esta información resulta útil cuando se quiere identificar sitios adecuados para aislar bacterias con capacidad de inducir la formación de Bio-estruvita.

Existen dos ambientes especialmente favorables para aislar bacterias productoras de estruvita, el primero es el sistema urinario de los mamíferos (Clapham *et al.*, 1990; Downey *et al.*, 1992; McLean *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2010; Prywer & Torzewska, 2010). Cepas bacterianas de los géneros *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Mycoplasma*, *Corynebacterium*, y *Providencia*, junto con levaduras de los géneros *Candida*, y *Trichosporon* son considerados como los agentes causales de infecciones urinarias (Tauch *et al.* 2008; Eisner *et al.*, 2014). Durante la infección estos microorganismos degradan la urea, produciendo amonio y elevando el pH del medio lo que crea las condiciones propicias para la precipitación de los cristales de estruvita (Udert *et al.* 2003; Zhu *et al.*, 2012; Eisner *et al.*, 2014), y la acumulación de este mineral puede promover la formación de caculos renales (Griffith, 1978; Vaidyanathan *et al.*, 2006). Se estima que hasta un 15% de todos los cálculos renales encontrados en humanos están formados de estruvita (Abbona, y Boistelle 1979; Bichler *et al.*, 2002). El segundo ambiente, esta constituido por los depósitos de excremento (guano) de murciélago, que se encuentran en las cuevas y refugios que habitan estos animales. Estos acúmulos de guano están caracterizados por pH elevado, gran cantidad de materia orgánica en descomposición y una enorme biodiversidad (Ferreira *et al.*, 2006). Las bacterias aisladas en estos depósitos de guano provienen en su mayor parte de la microbiota intestinal de los murciélagos. Se ha identificado una amplia diversidad de bacterias en el intestino de las distintas especies de murciélagos pertenecientes a los géneros: *Aerococcus*, *Clostridium*, *Cedecea* (Mühldorfer *et al.*, 2011), *Campylobacter* (Hazeleger *et al.*, 2010), *Bartonella* (Kosoy *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2011), *Borrelia*, *Escherichia* (Di Bella *et al.*, 2003), *Leptospira*, *Pasteurella*, *Salmonella* (Adesiyun *et al.*, 2009; Reyes *et al.*, 2011), *Staphylococcus* (Akobiet *et al.*, 2012), *Yersinia* (Mühldorfer 2013), *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Serratia*, *Proteus* (Klite 1965) entre otros.

Los murciélagos tienen características que los distinguen del resto de mamíferos, son grupo rico en especies, abarcan un amplio rango de nichos ecológicos (Stahlschmidt y Brühl 2012), tienen gran variedad de hábitos alimenticios (Kuzmin *et al.*, 2011), pueden dispersarse grandes distancias ya que son capaces de volar (Hayman *et al.*, 2013) establecen relaciones sociales duraderas con grupos sociales altamente dinámicos y diversos (Kerth *et al.*, 2011), son longevos (Podlutzky *et al.*, 2005) y buscan refugio en una gran diversidad de ambientes (Aguirre 2007). Todos estos atributos permiten a los

murciélagos ser hospederos de una gran diversidad de microorganismos(Adesiyunet *al.*, 2009; Kuzmin *et al.*, 2011; Akobi *et al.*, 2012; Mühldorfer 2013).

### 3.5 Microorganismos productores de estruvita

Se ha reportado más de 60 especies y 31 géneros de bacterias que cuentan con cepas capaces de producir estruvita (Tabla 1), tanto en ambientes naturales como en condiciones de laboratorio.

**Tabla 1.**

***Bacterias capaces de inducir la formación de estruvita***

<b>Cepa</b>	<b>Gram</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>Actinobacteria</i></b>		
<i>Brevibacterium antiquum</i>	+	(Smirnov <i>et al.</i> , 2005; Soares <i>et al.</i> ,2014)
<i>Corynebacterium hofmanni</i>	+	(Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Corynebacterium ovis</i>	+	(Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Corynebacterium renale</i>	+	(Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	+	(Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	+	(Soriano <i>et al.</i> , 1986;Robinson <i>et al.</i> ,1995;Tauch <i>et al.</i> ,2008)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	+	(Arias <i>et al.</i> , 2016)
<b><i>Bacteria filamentosa</i></b>		
<i>Trichococcus flocculiformis</i>	+	(Gonzalez-Martinez <i>et al.</i> , 2010)
<b><i>Bacteroidetes</i></b>		
<i>Bacteroides corrodens</i>	-	(Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<b><i>Euryarchaeota</i></b>		
<i>Halobacterium salinarum</i>	-	(Soares <i>et al.</i> , 2014)
<b><i>Firmicutes</i></b>		
<i>Bacillus pumilus</i>	+	(Nelson <i>et al.</i> , 1991; Soares <i>et al.</i> , 2014; Gonzalez-

		Martinez <i>et al.</i> , 2015)
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	+	(Gonzalez-Martinez <i>et al.</i> , 2015)
<i>Salibacillus salexigens</i>	+	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2011)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	(Beavon y Heatley, 1962; Zhu <i>et al.</i> , 2012; Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<b><i>Proteobacteria</i></b>		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	(Rivadeneira <i>et al.</i> , 2014)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	-	(Rivadeneira <i>et al.</i> , 1985)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	-	(Rivadeneira <i>et al.</i> , 1985)
<i>Bordatella pertussis</i>	-	(Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Chromohalobacter marismortui</i>	-	(Sánchez-Navas <i>et al.</i> , 2009; Rivadeneira <i>et al.</i> , 2010; Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2011)
<i>Desulfotignum phosphitoxidans</i>	-	(Schink <i>et al.</i> , 2002)
<i>Escherichia coli</i>	-	(Beavon y Heatley, 1962; Rivadeneira <i>et al.</i> , 2014)
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	(Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Halomonas aquamarina</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas canadiensis</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas cupida</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas elongata</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas eurihalina</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas halmophila</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas halodenitrificans</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas halodurans</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas halophila</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas marina</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)

<i>Halomonas pacifica</i> ,	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas pantelleriensis</i> ,	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas salina</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas subglaciescola</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas variabilis</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Halomonas venusta</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Idiomarina abyssalis</i>	-	(González-Muñoz <i>et al.</i> , 2008)
<i>Idiomarina báltica</i>	-	(González-Muñoz <i>et al.</i> , 2008)
<i>Idiomarina loihiensis</i>	-	(González-Muñoz <i>et al.</i> , 2008)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	(Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	(Zhu <i>et al.</i> , 2012; Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Marinomonas communis</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007;2011)
<i>Marinomonas vaga</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2011)
<i>Myxococcus coralloides</i>	-	(Ben Omar <i>et al.</i> , 1996;1998)
<i>Myxococcus xanthus</i>	-	(Ben Omar <i>et al.</i> , 1994;1996;1998; González-Muñoz <i>et al.</i> , 1996; Da Silva <i>et al.</i> , 2000; Soares <i>et al.</i> , 2014)
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	(Rivadeneira <i>et al.</i> , 2014)
<i>Proteus mirabilis</i>	-	(Rottschaefer <i>et al.</i> , 1970; McLean <i>et al.</i> , 1990; Downey <i>et al.</i> , 1992; Stickler <i>et al.</i> , 1993; Torzewska <i>et al.</i> , 2003; Chen <i>et al.</i> , 2010; Prywer y Torzewska, 2010; Sadowski <i>et al.</i> , 2010; Sun <i>et al.</i> , 2012; Zhu <i>et al.</i> , 2012; Eisner <i>et al.</i> , 2014).
<i>Proteus morgani</i>	-	(Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Proteus penneri</i>	-	(Torzewska <i>et al.</i> , 2003)



<i>Proteus rettgeri</i>	-	(Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Proteus vulgaris</i>	-	(Torzewska <i>et al.</i> , 2003; Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Providencia stuartii</i>	-	(Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	(Zhu <i>et al.</i> , 2012)
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	-	(Beavon y Heatley, 1962)
<i>Salinivibrio costicola</i>	-	(Sánchez-Román <i>et al.</i> , 2007)
<i>Shewanella oneidensis</i>	-	(Luo <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sphingomonas adhesiva</i>	-	(Rivadeneira <i>et al.</i> , 2014)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	(Rivadeneira <i>et al.</i> , 1989; Eisner <i>et al.</i> , 2014)
<i>Yersinia intermedia</i>	-	(Rivadeneira <i>et al.</i> , 1989)
<i>Yersinia kristensenii</i>	-	(Rivadeneira <i>et al.</i> , 1989)

Algunas de las cepas que poseen la capacidad de inducir la formación de estruvita no han sido caracterizadas a nivel de especie y pertenecen a los siguientes géneros: *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* (Rivadeneira *et al.*, 1992a; 2014), *Agromyces* (Rivadeneira *et al.* 2014), *Arthrobacter* (Rivadeneira *et al.*, 1983; 1992a; Pérez-García *et al.*, 1990), *Enterobacter* (Sinha *et al.*, 2014), *Flavobacterium*, *Listeria* (Rivadeneira *et al.*, 1983), *Kurthia* (Rivadeneira *et al.*, 1992a), *Micrococcus* (Rivadeneira *et al.*, 1992a), *Paracoccus*, *Pseudoxanthobacter*, *Rhodobacter*, *Roseobacter* (Rivadeneira *et al.*, 2014), *Plesiomonas* (Rivadeneira *et al.*, 1992), *Rubrobacter* (Laiz *et al.*, 2009).

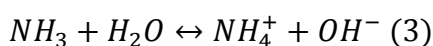
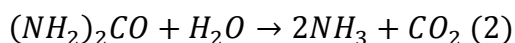
No existe una relación directa entre la capacidad de producir estruvita y la cercanía taxonómica (Rivadeneira *et al.*, 1992). Sin embargo, la mayoría de las bacterias que son capaces de inducir la formación de este mineral son Gram negativas y pertenecen a la clase *Alphaproteobacteria* (Rivadeneira *et al.*, 1992; Sánchez-Román *et al.*, 2007).

### 3.6 Mecanismo para la formación de Bio-estruvita

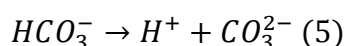
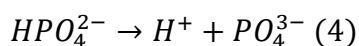
La biomineralización de estruvita sigue el mismo mecanismo e involucra a las mismas moléculas que participan en la formación de este mineral por métodos fisicoquímicos.

Los microorganismos no participan directamente de la precipitación de estruvitasin embargo, debido a su actividad metabólica producen parte de los iones necesarios y crean el microambiente que induce la formación del mineral (Ben Omar *et al.*, 1998; Da Silva *et al.*, 2000; Sánchez-Román *et al.*, 2007; Prywer y Torzewska, 2010; Rivadeneyra *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014).

El proceso de formación de Bio-estruvita comienza cuando las bacterias degradan proteínas o urea para obtener energía (2 y 3) (Downey *et al.*, 1992; Ben Omar *et al.*, 1994; Dumanski *et al.*, 1994; Rivadeneyra *et al.*, 1999; González-Muñoz *et al.*, 2008; Tauch *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010), fruto de esta actividad metabólica se libera amonio al medio circundante (Beavon y Heatley, 1962; Rivadeneyra *et al.*, 1992; Sánchez-Román *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2008);



Al aumentar la concentración de amonio, incrementa el pH del medio (Beavon y Heatley, 1962; Dumanski *et al.*, 1994; Da Silva *et al.*, 2000; Sánchez-Román *et al.*, 2007; Tauch *et al.*, 2008; González-Muñoz *et al.*, 2008) lo que determina la disminución de la solubilidad del magnesio (McLean *et al.*, 1990) junto con la generación de iones fosfato y carbonato (4 y 5);



Por otra parte la membrana externa, la capsula, el glicocalix y la pared celular de las bacterias poseen lipopolisacáridos y péptidoglicanos con grupos funcionales expuestos de carga negativa (McLean *et al.*, 1985; Clapham *et al.*, 1990; González-Muñoz *et al.*, 1996; Ben Omar *et al.*, 1998; Torzewska *et al.*, 2003; González-Muñoz *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010) que crean un microambiente que favorece la adsorción de iones con carga positiva como el amonio, fosfato o magnesio (Rivadeneyra *et al.*, 1992; Sánchez-Román *et al.*, 2007; 2011; Sadowski *et al.*, 2010; Eisner *et al.*, 2014) generando una supersaturación y concentración localizada de estas moléculas alrededor de la bacteria (Beavon y Heatley, 1962; McLean *et al.*, 1990; González-Muñoz *et al.*, 1996), lo que da paso al comienzo de la nucleación primaria (McLean *et al.*, 1990; Ben Omar *et al.*,

1998; Maurer *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010) y la formación del mineral de acuerdo a la ecuación (1) (Clapham *et al.*, 1990; Ben Omar *et al.*, 1998).

Todo este proceso da como resultado una disminución drástica del fósforo y nitrógeno del medio (Da Silva *et al.*, 2000), y la acumulación de estruvita en el exterior de la célula (Ben Omar *et al.*, 1994). Cuando las bacterias mueren, se establece la lisis celular y se libera amonio al medio, lo que nuevamente induce la formación de más Bio-estruvita, generándose un crecimiento del cristal en capas concéntricas (Nelson *et al.*, 1991; González-Muñoz *et al.*, 1996; Prywer y Torzewska 2010; Eisner *et al.*, 2014).

### **3.7 Factores que afectan la producción de Bio-estruvita**

El estudio de los factores que afectan la producción de Bio-estruvita ha recibido poca atención por parte de los investigadores (Da Silva *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014), sin embargo, parece ser que algunas características metabólicas y estructurales de las bacterias determinan la cantidad y calidad del mineral formado, siendo las principales:

#### *a) Actividad enzimática*

Como se mencionó anteriormente el primer paso para la formación de Bio-estruvita es la generación de amonio como producto de la degradación de proteínas y/o urea. De esto se deduce que las bacterias productoras de Bio-estruvita que presenten fuerte actividad proteasa y/o ureasa formaran mayor cantidad del mineral (Downey *et al.*, 1992; Rivadeneyra *et al.* 1992a; Rivadeneyra *et al.*, 1999; Udert *et al.* 2003b; Tauchet *et al.*, 2008). Al contrario, la presencia de compuestos que inhiban estas actividades enzimáticas disminuirá significativamente la formación de estruvita (Prywer y Torzewska, 2010).

#### *b) Superficie de la célula*

Las estructuras externas de la bacteria presentan cargas negativas que atraen iones de amonio, magnesio y fosfato (Beavon y Heatley 1962; Rivadeneyra *et al.*, 1992a; Ben Omar *et al.*, 1994; Sánchez-Román *et al.*, 2007; 2011; Le Corre *et al.*, 2009; Sadowski *et al.*, 2010; Eisner *et al.*, 2014; Huet *et al.*, 2018) lo que favorece la formación de estruvita. Sin embargo, a estas estructuras con carga negativa también se adsorben iones de calcio que pueden formar con el fosfato Hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ), y con el magnesio Dolomita ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ) o Huntita,  $\text{CaMg}_3(\text{CO}_3)_4$  disminuyendo la concentración de iones disponibles. Por

esta razón, la presencia de calcio en el medio muestra una correlación negativa con la cantidad de estruvita formada (Beavon y Heatley, 1962; Rivadeneyra *et al.*, 1983; Sánchez-Román *et al.* 2011).

c) *Muerte celular*

Los restos de células muertas sirven como sustrato para la producción de amonio y a su vez favorecen la nucleación primaria de los cristales de Bio-estruvita, por lo que parte del mineral llega a ser formado en la fase de muerte del cultivo (Ben Omar *et al.* 1995; Da Silva *et al.* 2000; Prywer y Torzewska, 2010).

d) *Metabolismo*

Algunos aspectos del metabolismo microbiano pueden disminuir la cantidad de estruvita formada, por ejemplo, cuando las bacterias degradan azúcares liberan CO<sub>2</sub> en el medio y esto disminuye el pH, lo que a su vez reduce la cantidad de estruvita precipitada (Sánchez-Román *et al.*, 2007). Adicionalmente la mayor parte de las bacterias captan magnesio del medio para utilizarlo en su metabolismo lo que también se traduce en un menor rendimiento en la producción de estruvita (Sánchez-Román *et al.*, 2007).

e) *Biofilm*

La formación de biofilms bacterianos favorece la precipitación de estruvita ya que esta matriz extracelular atrapa cationes lo que aumenta la concentración localizada de los iones requeridos, y el cristal puede precipitar a un pH menor del que requeriría si fuera formado por células libres (McLean *et al.* 1989; Clapham *et al.*, 1990; Stroup y Auge, 2011; Sinha *et al.*, 2014).

#### **4. Antecedentes**

Los primeros estudios acerca de la biomineralización de estruvita estuvieron enfocados en identificar las bacterias capaces de inducir la precipitación del mineral (Rivadeneyra *et al.*, 1983; 1992a; 2014; Pérez-García *et al.*, 1990; Sánchez-Román *et al.*, 2007; Laiz *et al.*, 2009; Sinha *et al.*, 2014), especialmente aquellos microorganismos relacionados con la formación de cálculos renales, compuestos en parte por estruvita (Clapham *et al.*, 1990; Downey *et al.*, 1992; McLean *et al.*, 1990; Udert *et al.* 2003; Tauch *et al.* 2008; Chen *et al.*, 2010; Prywer & Torzewska, 2010; Zhu *et al.*, 2012; Eisner *et al.*, 2014).

Posteriormente las investigaciones se avocaron a elucidar los mecanismos por los cuales las bacterias son capaces de inducir la formación de estruvita (Ben Omar *et al.*, 1998;

Da Silva *et al.*, 2000; Sánchez-Román *et al.*, 2007; Prywer y Torzewska, 2010; Rivadeneyra *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014), además de describir las características estructurales y metabólicas necesarias para que un microorganismo sea capaz de producir estruvita (Downey *et al.*, 1992; Ben Omar *et al.*, 1994; Dumanski *et al.*, 1994; Rivadeneyra *et al.*, 1999; González-Muñoz *et al.*, 2008; Tauch *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Eisner *et al.*, 2014).

Finalmente, muy pocos estudios han intentado establecer procesos biotecnológicos que permitan recuperar fósforo de aguas residuales mediante la precipitación de estruvita inducida por microorganismos (Huet *et al.*, 2018). Estas investigaciones han intentado optimizar el proceso de producción del mineral mediante la manipulación de parámetros como el pH, temperatura, o fuente de magnesio. Sin embargo, es preciso resaltar que aún existen vacíos de información que deben ser llenados antes que la producción de Bio-estruvita sea un proceso industrial y económicamente viable (Sinha *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014; Arias *et al.*, 2016).

Respecto a los microorganismos que habitan el tracto intestinal de los murciélagos, la mayor parte de los reportes describen bacterias patógenas relacionadas a este grupo de mamíferos (Adesiyunet *et al.*, 2009; Kuzmin *et al.*, 2011; Akobi *et al.*, 2012; Mühldorfer 2013), y solo algunos estudios han desarrollado aplicaciones biotecnológicas usando bacterias aisladas del intestino o heces de estos animales (Gadhikar *et al.*, 2007; Tanskulet *et al.*, 2009).

## **5. Justificación**

Uno de los principales problemas ambientales que afrontan los ecosistemas acuáticos en el planeta es la eutrofización, la cual es causada por un exceso de nutrientes que provienen de los desechos líquidos que desembocan en ríos, lagos y mares (AlexanNelson *et al.* 2006; de Vries y López, 2013). Para solucionar este problema es preciso que las plantas de tratamiento de agua reduzcan la concentración de fósforo y nitrógeno presente en aguas residuales hasta límites permitidos (de-Bashan y Bashan, 2004).

Existen varios métodos para remover el exceso de compuestos inorgánicos de nitrógeno (Schmidt, *et al.*, 2003) y fósforo (Booker *et al.*, 1999; Driver *et al.*, 1999; Le Corre *et al.*, 2009; de-Bashan y Bashan, 2004) presentes en los desechos líquidos. Una de las

metodologías más eficientes para disminuir la concentración de estos nutrientes en aguas residuales, es la precipitación de nitrógeno y fósforo en forma de estruvita (Doyle *et al.*, 2002; Yuan *et al.* 2012; Rahman *et al.*, 2014; You *et al.*, 2015). Este método permite remover hasta un 90% del fósforo y 50% del Nitrógeno presentes en desechos líquidos, generando una mínima cantidad de subproductos no deseados (Ronteltap *et al.* 2007; Antonini *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2014; Rodriguez-Garcia *et al.*, 2014) y el principal producto del proceso, los cristales de estruvita, puede ser usado para la fabricación de fertilizante (Cordellet *et al.*, 2009; Le Corre *et al.* 2009; Prabhu y Mutnuri, 2014; Cerrillo *et al.*, 2015), y materiales resistentes al fuego (Chen *et al.*, 2010).

Actualmente la recuperación de fósforo y nitrógeno mediante la precipitación de cristales de estruvita se realiza usando métodos fisicoquímicos, si bien esta aproximación presenta las ventajas anteriormente mencionadas su implementación es costosa, debido a que requiere el empleo de reactivos y equipos especializados (Suzuki *et al.*, 2002; Cerrillo *et al.*, 2015).

Una alternativa promisoría para reducir los costos de operación de la producción de estruvita es emplear una aproximación biotecnológica, la cual aprovecha características estructurales y metabólicas de ciertos microorganismos para inducir la precipitación de cristales de estruvita (Rahman *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014). Este método reduce significativamente el uso de reactivos y elimina la necesidad de contar con equipos especializados (Sinha *et al.*, 2014).

En Bolivia, la explotación de litio y otros recursos evaporíticos genera como subproducto grandes cantidades de cloruro de magnesio que no es comercializado. Por otra parte, en varias ciudades y comunidades del país se han instalado los llamados inodoros ecológicos secos con separación de la orina (IESSO) o “baños ecológicos”; estas instalaciones sanitarias recolectan la orina humana de forma separada al resto de los desechos. Bajo estas condiciones, en Bolivia, se pueden obtener dos de los sustratos para la producción de estruvita (orina y cloruro de magnesio) a un costo muy bajo.

Sin embargo, para que la producción biotecnológica de estruvita pueda ser implementada a nivel industrial, hace falta mayor investigación (Yuan *et al.* 2012; Rodriguez-Garcia *et al.*, 2014) que permita elucidar los procesos microbiológicos que inducen la formación de los cristales de estruvita (Soares *et al.*, 2014) y optimice las

condiciones de cultivo que maximicen su producción (Rivadeneira *et al.*, 1992; Rahman *et al.*, 2014).

En función de alcanzar esas metas, la presente investigación planteo los siguientes objetivos.

## **6. Objetivos**

### **6.1. Objetivo General**

Estudiar la producción bacteriana de estruvita a partir de orina, usando cepas aisladas de la microbiota intestinal de murciélagos.

### **6.2. Objetivos Específicos**

- Aislar y caracterizar cepas bacterianas de la microbiota intestinal de murciélagos con capacidad de inducir la formación de estruvita a partir de orina.
- Optimizar y evaluar los rendimientos de producción bacteriana de estruvita a partir de orina mediante la variación de parámetros fisicoquímicos de las condiciones de cultivo.

## **7. Metodología**

### **7.1 Toma de muestras y condiciones de aislamiento selectivo de cepas bacterianas con potencial formador de estruvita**

Se seleccionaron dos lugares para la toma de muestras:

- a) Refugio de murciélagos del género *Myotis*, ubicado en una construcción abandonada cercana a la localidad de Carmen Pampa (16°15'30"S 67°41'30"O), en la provincia Nor-Yungas del Departamento de La Paz, Bolivia.
- b) Refugio de murciélagos de la especie *Desmodus rotundus*, ubicado en una cueva cercana a la localidad de Tahuapalca (16°43'11"S 67°54'36"O), en la provincia Murillo del Departamento de La Paz.

De cada sitio de muestreo se obtuvieron muestras de heces de murciélago de dos potenciales nichos:

- a) Redes de niebla: Se desplegaron de dos a tres redes de niebla en corredores naturales cercanos a los refugios de murciélagos, las redes fueron revisadas cada

15 minutos removiendo los animales capturados extremando los cuidados para no causarles lesión alguna. Una vez que los murciélagos efectuaron sus deposiciones, se tomaron muestras de heces con la ayuda de un hisopo estéril, mismo que fue almacenado en un frasco plástico estéril de 15 ml de capacidad conteniendo 5 ml de solución salina estéril (0.9% NaCl) (Di Bella *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2006). Posteriormente se tomaron las medidas morfométricas del animal para identificarlo a nivel de especie (Díaz *et al.*, 2011).

- b) Depósitos de Heces: Se ingresó a los refugios en ambos sitios de muestreo y se colectó aproximadamente 10 g de las heces acumuladas en el suelo en un frasco plástico estéril de 50 ml de capacidad. Cada muestra de sedimento fue suspendida en 50 ml de una solución salina estéril (0.9% NaCl), y luego, en el laboratorio, el frasco conteniendo la muestra fue colocado en un agitador orbital a 150 rpm por una hora (Rivadeneira *et al.* 2014).

Matraces que contenían 50 ml de caldo nutritivo (CM0067, Nutrient Broth Oxoid Limited) fueron inoculados con 500 µl de la suspensión de cada muestra (hisopo estéril o muestras de heces colectadas del suelo de los refugios). Los medios fueron cultivados toda la noche a 30° C (Prywer y Torzewska, 2010), pasado ese tiempo muestras de cada cultivo fueron sembradas por estría en placas con Agar nutritivo (CM0003, Nutrient Agar Oxoid Limited) preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (cinco placas por matraz). Las colonias aisladas mediante este procedimiento fueron separadas por sus características morfológicas y repicadas en matraces con caldo nutritivo para obtener cultivos axénicos de cada morfotipo.

## **7.2 Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de cepas bacterianas formadoras de estruvitas**

### *a) Tinción Gram*

Brevemente, una muestra de cada colonia seleccionada fue usada para realizar un frotis en un portaobjeto, dejada secar al aire y tratada con: i) Solución cristal violeta (Anexos 9.1.1) por un minuto ii) Solución decolorante (Anexos 9.1.2) durante 7 segundos iii) Solución de Safranina (Anexos 9.1.3) por un minuto (entre cada aplicación de colorante la muestra fue enjuagada con agua destilada). Las placas fueron observadas usando el objetivo de inmersión (100X), con un microscopio Olympus CX21.



### *b) ITS-PCR*

Cada aislado bacteriano fue inoculado en matraces que contenían 30 ml de caldo nutritivo y fueron cultivados por 24 horas, pasado ese tiempo; 1) 3 ml del caldo de cultivo fueron centrifugados a 8500 rpm durante 5 min para precipitar las bacterias 2) Se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 500µl de Buffer TSE (Anexo 9.1.4), para luego centrifugar a 8500 rpm durante 5 min y desechar nuevamente el sobrenadante (esta operación se repitió 3 veces) 3) Se resuspendió el precipitado en 500µl de Buffer TSE y se adicionó 100µl de solución de lisozima (Anexo 9.1.5) para luego incubar por una hora a 37°C 4) Se adicionó 500µl de solución de lisis (Anexo 9.1.6) y se incubó la mezcla a 65°C por una hora 5) Posteriormente se adicionó 500µl de Buffer Tris-HCl (Anexo 9.1.7) y 150µl de solución salina (Anexo 9.1.8), mezclando gentilmente 6) La suspensión fue centrifugada a 10 000 rpm durante 10 min 7) Luego se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se adicionó 850 µl de etanol absoluto mezclando por inmersión y dejando reposar la mezcla a -20°C durante toda la noche 8) Pasado ese tiempo se centrifugó a 13 000 rpm durante 15 min 9) Se eliminó el sobrenadante, adicionando 100 µl de etanol al 70% para resuspender el precipitado y se llevó a centrifugación a 13 000 rpm por 3 min (esta operación se repitió 3 veces) 10) Se dejó secar el precipitado a 55°C hasta que se evaporó todo el etanol 11) Finalmente se resuspendió en 100 µl de agua tridestilada (Protocolo de la Unidad de Biología Molecular - Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas).

Para realizar el PCR 5 µl del extracto de DNA fueron mezclados con 15 µl de PCR mix que contenía: dNTPs 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1 µl de cada primer (S-D-Bact-1494-a-S-20 5' GTCGTAACAAGGTAGCCGTA 3' y L-D-Bact-0035-a-A-15 5' CAAGGCATCCACCGT 3'), y 1 U de taq DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C 1 min, 50 °C 2 min y 72°C 2 min, para terminar con un paso final de extensión a 72°C durante 7 min. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis (75 V por 20 min) en gel de agarosa al 1.5% (Mora, *et al.*, 2003; Daffonchio *et al.*, 2009; Audisio, *et al.*, 2011; Cihan, 2013).

### *c) Actividad Ureasa*

Para evaluar la actividad Ureasa, las cepas bacterianas aisladas fueron cultivadas en matraces que contenían 30 ml de Caldo Christensen (CM0071, Urea Broth Base, Oxoid), preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cultivos fueron observados cada ocho horas hasta detectar viraje de color en el medio (de amarillo pálido a violeta brillante) (Christensen, 1946; McLean *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1991, Downey *et al.*, 1992; Prywer y Torzewska, 2010; Ariaset *et al.*, 2016).

### **7.3 Evaluación de la capacidad de formación de Bio-estruvitas.**

#### **7.3.1 Medios y condiciones de cultivo.**

##### *a) Orina Artificial(OA):*

La orina artificial fue preparada con los siguientes componentes ( $\text{g L}^{-1}$ ): Caldo tripticasa de soja, 10,0; Urea, 25,0; Creatina, 1,1;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,651;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,651; NaCl, 4,6;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 2,3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,8; KCl, 1,6;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,0. El Caldo tripticasa de soja fue autoclavado, el resto de los componentes del medio fueron añadidos por filtración (membranas millipore 0.2  $\mu\text{m}$ ), finalmente el pH fue ajustado a 5,6 (Clapham, *et al.*, 1990; McLean, *et al.*, 1990; Downey, *et al.*, 1992; Torzewska *et al.*, 2003; Prywer & Torzewska, 2010). En matraces de 100 ml, 50 ml de medio orina artificial fueron inoculados con cultivo enriquecido axénico de cada cepa (4%) para luego ser incubados a 25 °C durante 14 días (Rivadeneira, *et al.*, 1993; Ben Omar, *et al.*, 1996), a partir del tercer día los medios fueron revisados cada 24 h para detectar la aparición de cristales (Rivadeneira, *et al.*, 1989; González-Martínez *et al.*, 2015).

##### *b) Orina(O):*

La orina fue obtenida de personal del laboratorio, verificándose previamente que las personas donantes no tenían historial de formación de cálculos renales. Se determinó el pH de las muestras de orina fresca para luego ser esterilizadas por filtración (membrana millipore 0.2  $\mu\text{m}$ ) (Soriano *et al.*, 1986). En matraces de 100 ml, 50 ml de orina fueron inoculados con cultivo enriquecido axénico de cada cepa (4%) para luego ser incubados a 25°C durante 14 días (Rivadeneira, *et al.*, 1993; Ben Omar, *et al.*, 1996), a partir del tercer día los medios fueron revisados cada 24 h para detectar la

aparición de cristales (Rivadeneira, *et al.*, 1989; González-Martínez *et al.*, 2015).

c) *Medio sintético (MS)*

El medio sintético fue preparado con los siguientes componentes ( $\text{g L}^{-1}$ ): Extracto de levadura, 10,0; Glucosa, 1,0; Peptona, 5,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 2,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2,5. Todos los componentes del medio fueron diluidos en agua destilada, el pH fue ajustado a 7,5 para luego ser esterilizado en autoclave (Rivadeneira, *et al.*, 1983;1992; Nelson, *et al.*, 1991; Rivadeneira, *et al.*, 2014; Sinha, *et al.*, 2014; Soares, *et al.*, 2014; González-Martínez, *et al.*, 2015). En matraces de 100 ml, 50 ml de medio sintético artificial fueron inoculados con cultivo enriquecido axénico de cada cepa (4%) para luego ser incubados a 25 °C durante 14 días (Rivadeneira, *et al.*, 1993; Ben Omar, *et al.*, 1996), a partir del tercer día los medios fueron revisados cada 24 h para detectar la aparición de cristales (Rivadeneira, *et al.*, 1989; González-Martínez *et al.*, 2015).

### 5.3.2 Tratamientos

Para cada cepa y medio de cultivo se establecieron los siguientes tratamientos: i) Medio de cultivo con inóculo (4% de cultivo axénico de cada cepa con actividad ureasa) (Rivadeneira, *et al.*, 2014) ii) Control positivo, medio inoculado con un cultivo axénico de *Proteus mirabilis* (4%) (Rottschaefer *et al.*, 1970; McLean *et al.*, 1990; Downey *et al.*, 1992; Stickler *et al.*, 1993; Torzewska *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010; Prywer y Torzewska, 2010; Sadowski *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Eisner *et al.*, 2014) iii) Control negativo, medio de cultivo sin inóculo bacteriano (Nelson, *et al.*, 1991; Ben Omar *et al.* 1994; 1996; 1998; Da Silva *et al.*, 2000; Rivadeneira, *et al.*, 2014) iv) Control con células muertas, el medio de cultivo es inoculado con una suspensión autoclavada de bacterias (4% de cultivo axénico) (Ben Omar *et al.* 1995; Da Silva *et al.* 2000; Prywer y Torzewska, 2010; Rivadeneira, *et al.*, 2014). Todas las pruebas contaron con cinco réplicas y se anotó el pH inicial y final de cada ensayo (Ben Omar, *et al.*, 1994; Prywer y Torzewska 2010).

### 7.4 Identificación molecular de cepas bacterianas formadoras de estruvita.

Una alícuota del extracto de DNA de la cepa bacteriana que produjo mayor cantidad de Bio-estruvita (GMD 13) fue amplificado para la región hipervariable (V6-V8) del gen 16S rDNA. Brevemente 5 µl del templado de DNA fueron añadidos a 20 µL de PCR mix que contenía: 3 U de taq DNA polimerasa, 1x de buffer, 0.8 µM de cada primer (F 968-gc 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GA AGA ACCTTAC-3' y R 1378 5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'), 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 92° C 30 s, 55° C 1 min y 72°C 45 s, para terminar con un paso final de extensión a 72°C durante 5 min (Valášková y Baldrian, 2009).

Para comprobar la pureza del producto de amplificación, se realizó una Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993). Brevemente, se prepararon geles de poliacrilamida al 8 % (v/v) con acrilamida bis acrilamida en una proporción 37.5:1 y diferentes concentraciones de agente desnaturalizante (urea-formamida) del 40 al 60%, (100% de desnaturalizante definido como: 7 M de urea y 40% de formamida). En cada pozo del gel se sembraron 10 µl del producto de amplificación y la electroforesis se realizó a 60 V durante 7 horas en buffer TAE 1x colocado en el tanque de electroforesis a 60 °C. finalmente, el revelado fue realizado con bromuro de etidio (Ascher *et al.*, 2004).

El producto de amplificación fue secuenciado con tecnología Sanger (3100 Genetic Analyzer-Applied Biosystems) y la comparación con secuencias similares fue establecida a través de la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## **7.5 Optimización del proceso de producción de Bio-estruvita**

### **7.5.1 pH inicial**

Con el objetivo de evaluar el efecto del pH inicial en la producción de Bio-estruvita, muestras de 50 ml de orina fresca fueron ajustadas a un pH de 5, 6, 7, 8 y 9 (Downey *et al.* 1992) usando una solución de NaOH 5 M (Anexo 9.1.8). Cada muestra fue inoculada con 2 ml de un cultivo axénico de la cepa GMD 13 (producido 24 horas antes) e incubada a 25°C durante 15 días (Rivadeneira, *et al.*, 1993; Ben Omar, *et al.*, 1996), pasado ese tiempo se determinó la cantidad de Bio-estruvita formada (Rivadeneira *et al.* 1983; McLean *et al.*, 1990; Nelson *et al.* 1991; Da Silva, *et al.*, 2000;

Chen, *et al.*, 2010; Rivadeneyra *et al.*, 2014). El ensayo conto con 10 réplicas por cada nivel de pH.

### **7.5.2 Temperatura y Relación de concentración Mg/P**

Para determinar los valores óptimos de la temperatura y relación de concentración entre Mg:P que maximicen la producción de Bio-estruvita a partir de orina, se empleó un análisis de Metodología de Superficie de Respuesta (Bezerra *et al.* 2008) con los siguientes pasos: i) Selección del diseño experimental (Ye *et al.*, 2010; Ren *et al.* 2015; Wang *et al.* 2016), ii) Ajuste del modelo (justificado con un modelo lineal general) y iii) estimación de los valores óptimos (Khuri y Mukhopadhyay, 2010; Ye *et al.*, 2010; Capdevielle *et al.* 2013; Ren *et al.* 2015; Barbosa *et al.*, 2016; Wang *et al.* 2016).

Cada factor fue evaluado en tres niveles (Wu y Zhou, 2012), para la relación molar Mg:P se consideró que la concentración promedio de fósforo en la orina humana es de 250 mg L<sup>-1</sup> (Udert *et al.* 2003b; Basakcildan-Kabakci, *et al.*, 2007; Maurer *et al.* 2008; Antonini *et al.*, 2011; Etter *et al.*, 2011; Prabhu y Mutnuri, 2014; Barbosa *et al.* 2016), de manera que se establecieron tratamientos con concentraciones en mg L<sup>-1</sup> de: 375, 500 y 625 que corresponde a relaciones molares Mg:P de 1,5:1, 2:1 y 2,5:1; respectivamente (Wang *et al.*, 2006b; Le Corre *et al.*, 2009; Fukumoto *et al.*, 2012; Wu y Zhou, 2012).

Respecto a la temperatura de incubación del medio de cultivo se establecieron tres niveles, 20, 25 y 30°C, considerando el rango óptimo para la formación de Bio-estruvita en medios sintéticos (Rivadeneyra *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2010). Nuevamente, muestras de 50 ml de orina fresca fueron ajustadas a la concentración de magnesio establecida en cada factor (Wang *et al.*, 2006b; Le Corre *et al.*, 2009; Wu y Zhou, 2012), para luego ser inoculadas con 2 ml de un cultivo axénico de la cepa GMD 13 (producido 24 horas antes) e incubadas a la temperatura correspondiente (Rivadeneyra *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2010) durante 15 días (Rivadeneyra, *et al.*, 1993; Ben Omar, *et al.*, 1996). Pasado ese tiempo se determinó la cantidad de Bio-estruvita formada (Rivadeneyra *et al.* 1983; McLean *et al.*, 1990; Nelson *et al.* 1991; Da Silva, *et al.*, 2000; Chen, *et al.*, 2010; Rivadeneyra *et al.*, 2014). El número de réplicas por cada combinación de factor fue establecido en el diseño experimental propuesto (Khuri y Mukhopadhyay, 2010; Ye *et al.*, 2010; Capdevielle *et al.* 2013; Ren *et al.* 2015; Barbosa *et al.*, 2016; Wang *et al.* 2016).

Para realizar el análisis de Metodología de Superficie de Respuesta se usó el programa de R “rsm”(Lenth, 2009) y los gráficos fueron efectuados usando el software de XLSTAT versión 19.5.

## **7.6 Evaluación de los cristales de Bio-estruvita**

### **7.6.1 Separación de los cristales**

Una vez concluido cada ensayo se procedió a separar los cristales formados, decantando el sobrenadante (Ben Omar, et al., 1994; 1996) y enjuagando los cristales precipitados con Buffer Tris-HCl 0,05M a pH 8,6 (Anexos 9.1.7) (Clapham et al. 1990), separándolos por centrifugación a 3500 rpm durante 5 min (Rivadeneira et al. 1983; McLean et al., 1990; Nelson et al. 1991; Da Silva, et al., 2000; Chen, et al., 2010; Rivadeneira et al., 2014) para finalmente dejarlos secar a 25°C durante una semana (Ben Omar, et al., 1996).

### **7.6.2 Caracterización de los cristales**

#### *a) Identificación*

La identificación de los cristales obtenidos en todos los ensayos se realizó mediante difracción de rayos X (XRD) (Ben Omar et al., 1994; 1996, Chen et al., 2010; Clapham et al., 1990; Downey et al., 1992). Brevemente, los cristales de cada muestra fueron pulverizados usando un mortero (Ben Omar et al., 1994), luego la muestra pulverizada fue sometida a radiación monocromática de Cu ( $1,5418\text{\AA}$ , voltaje 40kV y corriente 35 mA) (Nelson et al. 1991), con un tamaño de paso de  $0,02042^\circ$  y un escaneo de  $2$  a  $60^\circ$  para  $2\theta$ , la respuesta fue registrada con una velocidad  $2^\circ 2\theta$  por minuto (Bruker D8 Advance) (Rivadeneira et al., 1992; Ben Omar et al., 1994; Prywer & Torzewska 2010; Prabhu y Mutnuri, 2014; Rivadeneira et al. 2014).

#### *b) Morfología*

Las características morfológicas de los cristales producidos fueron estudiadas usando microscopía óptica (microscopio Olympus CX21) (Clapham et al., 1990; Ben Omar et al., 1994; 1996), para lo cual, 0,01 g de cristales limpios y secos fueron colocados en un portaobjetos y se observaron a un aumento de 40X (McLean et al., 1990).

#### *c) Composición*

La composición de los cristales fue evaluada mediante Espectrometría por dispersión de energías de rayos X acoplada a Microscopía electrónica de barrido SEM-EDS (Tescan, Vega3L, Detector de electrones secundarios). La presión de la cámara de vacío fue de  $2 \times 10^{-2}$  Pa, con un voltaje de aceleración 20kV a 30kV, el rango de energía del espectro fue de 0 a 10 keV (Cerrillo et al., 2015; Barbosa et al., 2016; Luo *et al.*, 2018).

## **7.7 Análisis estadístico**

Los parámetros establecidos para cada tratamiento (Cantidad de Bio-estruvita producida, pH final) fueron evaluados mediante ANOVA de una vía, sin embargo, en los casos en los que no se encontró normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas, se recurrió a una prueba deKruskal-Wallis.

En los casos en los que fué preciso contrastar algún parámetro contra un valor preestablecido se estableció una prueba de t-student para una sola muestra. Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa de R ISwR (Dalgaard, 2015; R Core Team, 2016), y los gráficos fueron realizados mediante el uso delsoftware SigmaPlot versión. 11.0 (SigmaPlot, 2008).

## **8. Resultados y Discusión**

### **8.1 Aislamiento selectivo de cepas bacterianas con potencial formador de estruvita a partir de heces de murciélagos.**

Los sitios de muestreo fueron elegidos debido a que contaban con las condiciones ambientales necesarias (presencia de sedimentos, materia orgánica en descomposición, alta concentración de nutrientes, pH elevado) para albergar bacterias con la capacidad de inducir la formación de Bio-estruvita (Nelson *et al.*, 1991; Ben Omar *et al.*, 1996; Sánchez-Román *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2010; Zammit *et al.*, 2011; Rivadeneyra *et al.*, 2014).

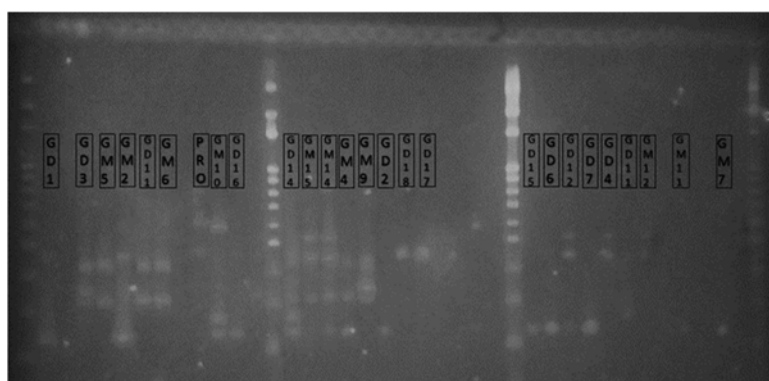
Se logró aislar 32 cepas bacterianas (Tabla 2.) con características morfológicas particulares (Anexo 9.2), la gran cantidad de morfotipos aislados está en concordancia a estudios previos que reportan una alta diversidad de microorganismos asociados a la microbiota intestinal de los murciélagos (Sridhar, *et al.*, 2006; Gadhikar, *et al.*, 2007; Mühlendorfer, 2013).

**Tabla 2. Diversidad y origen de las cepas aisladas usadas en el estudio**

Código de las cepas aisladas	Origen	Número de cepas aisladas
GM01, GM02, GM03, GM04, GM05, GM06, GM07, GM08, GM09, GM10, GM11, GM12, GM13 y GM14	Refugio de murciélagos del Género <i>Myotis sp.</i>	14
GD01, GD02, GD03, GD04, GD05, GD06, GD07, GD08, GD09, GD10, GD11, GD12, GD13, GD14, GD15, GD16, GD17 y GD18	Refugio murciélagos de la especie <i>Desmodus rotundus</i>	18

## 8.2 Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de cepas bacterianas formadoras de estruvitas

Mediante PCR fingerprinting se pudo agrupar las 32 cepas aisladas en nueve Unidades taxonómicas operativas (OTU), todas las cepas que conforman una OTU tiene un patrón de bandas similar cuando se realiza la corrida electroforética del material genético amplificado correspondiente a la región intergénica 16S-23S rRNA (ITS) (Figura 1). Las características de cada una de las OTUs identificadas, se hallan detalladas en la Tabla 3.



**Fig. 1.** Patrón de bandas correspondientes a los polimorfismos de ITS encontrados en las cepas aisladas. Se indica el código de la cepa en cada columna. Las columnas 1, 14 y 27 corresponden al marcador de peso molecular (p-GEM-T Vector Systems).

**Tabla 3. Composición y características de las OTUs identificadas en el estudio**



Código del OTU	Cepas que conforma el OTU	Forma	Tinción Gram	Actividad Ureasa
<b>GMD 13</b>	GM11-GD3-GD17	Bacilo	(-)	(+)
<b>GD 11</b>	GD11	Bacilo	(-)	(+)
<b>GM 28</b>	GM2-GM8	Bacilo	(+)	(+)
<b>GMD 15</b>	GM1-GD5-GD6	Bacilo	(+)	(+)
<b>GD 18</b>	GD1-GD7-GD8-GD10-GD15-GD18	Bacilo	(+)	(-)
<b>GM 9</b>	GM9	Bacilo	(+)	(-)
<b>GMD 16</b>	GM4-GM5-GM6-GD13-GD16	Coco	(+)	(-)
<b>GMD 27</b>	GM3-GM7-GD2	Bacilo	(+)	(-)
<b>GMD 14</b>	GM12-GD14-GD12	Coco	(-)	(-)

Para que una bacteria sea capaz de inducir la formación de estruvita a partir de orina, es imprescindible que cuente con actividad ureasa, que le permita degradar urea y liberar amonio al medio (Downey *et al.*, 1992; Dumanski *et al.*, 1994; Maurer *et al.*, 2008; Tauch *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). De manera tal, en el presente estudio, solo las OTUs que presentaban esta actividad enzimática (GMD13, GD11, GM28 y GMD15) fueron evaluadas en su capacidad de producir estruvita a partir de orina (Tabla 3.).

### 8.3 Capacidad bacteriana formadora de estruvita

Las cuatro OTUs seleccionadas (GMD13, GD11, GM28 y GMD15) fueron evaluadas en su capacidad de inducir la formación de estruvita en tres medios; i) Orina O, medio en el que se busca producir el mineral a escala industrial ii) Medio orina artificial OA, medio que asemeja el contenido de compuestos orgánicos y minerales encontrados en orina humana normal en un periodo de 24 h, sin la presencia de enzimas u otras moléculas que podrían inhibir la actividad metabólica de las bacterias (Prywer y Torzewska, 2010) y iii) Medio sintético MS, considerado como medio control ya que tiene un exceso de materia orgánica fosfato y magnesio para favorecer la formación de estruvita (Rivadeneira, *et al.*, 1983; 1992; Nelson, *et al.*, 1991; Rivadeneira, *et al.*, 2014; Sinha, *et al.*, 2014; Soares, *et al.*, 2014; González-Martínez, *et al.*, 2015).

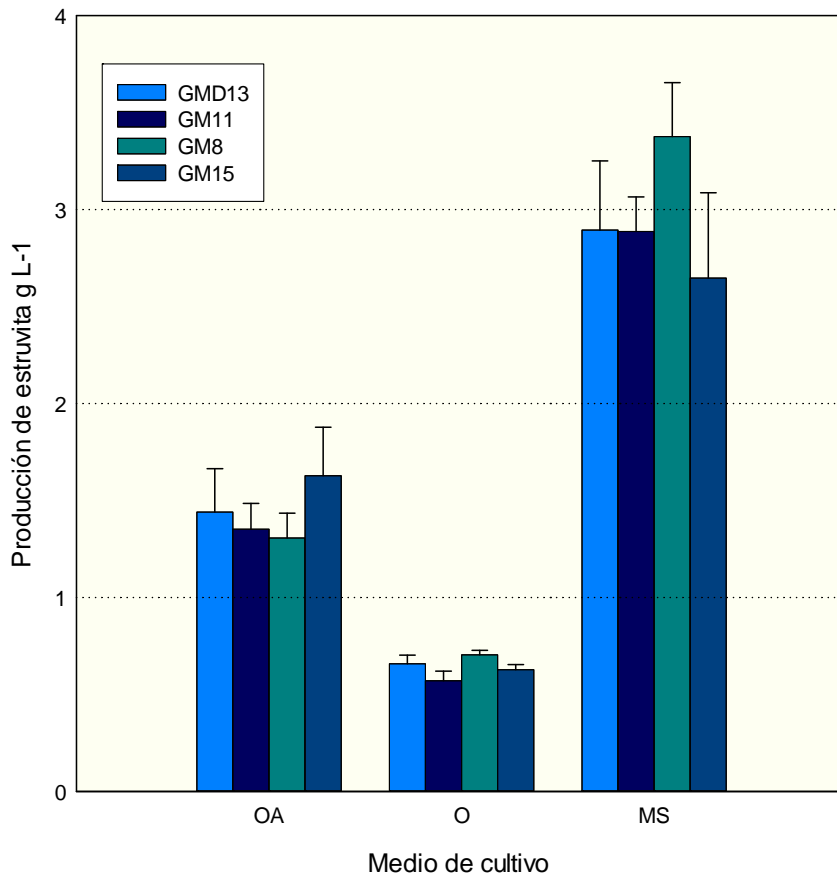
Todas las OTUs identificadas fueron capaces de inducir la formación de estruvita en los tres medios ensayados, estos resultados difieren de lo encontrado en otros estudios donde solo entre un 50 a 75% de los microorganismos aislados mostraron la capacidad de producir el mineral (González-Martínez *et al.*, 2010; Rivadeneyra *et al.*, 2014).

La concentración de estruvita formada en mediosintético ( $1,47 \text{ gL}^{-1}$ ), fue superior al rendimiento reportado en trabajos previos, en los que se emplearon medios de cultivo con características similares (Pérez-García *et al.*, 1990; Rivadeneyra *et al.*, 1992a; Ben Omar *et al.*, 1994; 1996; Da Silva *et al.*, 2000), lo que sugiere que las OTUs aisladas son especialmente aptas para inducir la formación de este mineral.

La concentración de estruvita formada en medio OA (orina artificial) fue significativamente mayor a la concentración obtenida en la orina ( $p > 0,001$ ),  $0,715$  y  $0,32 \text{ gL}^{-1}$ , respectivamente (Udert *et al.*, 2003b; Matsumoto y Funaba, 2008). Esta diferencia puede ser explicada por el hecho de que la orina humana, al contrario de la orina artificial, contiene compuestos que inhiben la actividad ureasa de las bacterias lo que disminuye significativamente la producción de amonio y la cantidad de cristales precipitados (Prywer y Torzewska, 2010). Pese a esto, nuestros resultados confirman que la orina es un medio adecuado para producir Bio-estruvita (Kemacheevakul *et al.*, 2011; Prabhu y Mutnuri, 2014).

Al igual que lo reportado en estudios previos, la producción de estruvita entre las distintas OTUs fue altamente variable y los ensayos establecidos con la misma cepa bacteriana no siempre produjeron una cantidad similar de estruvita (Nelson *et al.* 1991).

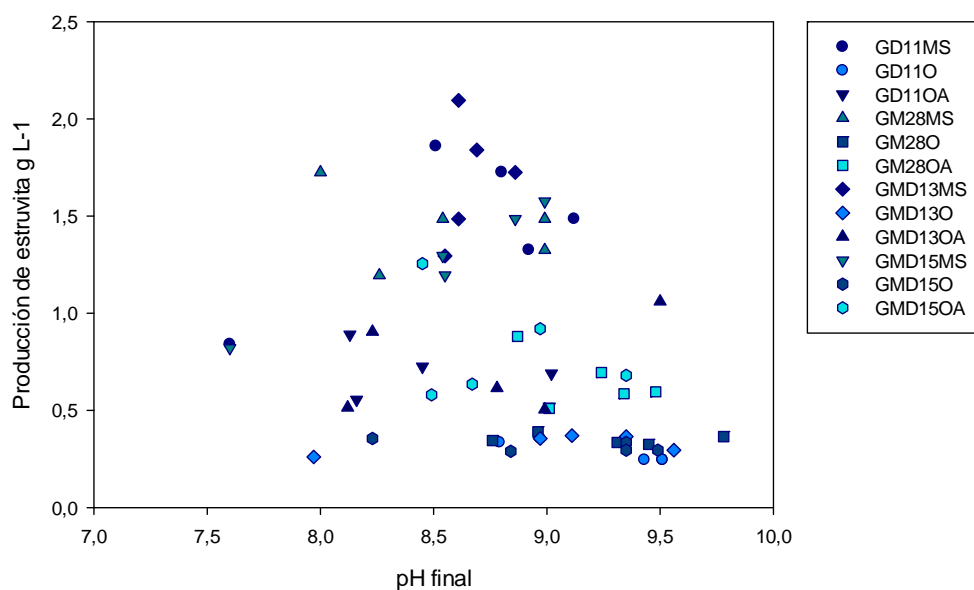
Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis muestran que no existe diferencia significativa entre la cantidad de Bio-estruvita formada por cada una de las OTUs ( $p = 0,89$ ) a partir de orina (Figura 2). Los controles positivos (inoculados con *Proteus mirabilis*), formaron cantidades similares de estruvita tanto en Orina Artificial ( $0,67 \text{ g L}^{-1}$ ,  $p = 0,333$ ) como en Orina ( $0,34 \text{ g L}^{-1}$ ,  $p = 0,065$ ) (Downey *et al.*, 1992; Torzewska *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010; Prywer y Torzewska, 2010).



**Fig. 2.** Valores promedio de la producción de estruvita (g de mineral por litro de medio de cultivo), de las cuatro OTUs (GMD13, GM11, GM8 y GM15) en tres medios de cultivo Orina Artificial (OA), Orina (O) y Medio sintético (MS). Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Se evidenció la formación de estruvitas en el control con células muertas en orina, sin embargo, la cantidad fue significativamente menor a lo precipitado en orina inoculada con microorganismos vivos ( $0,02 \text{ g L}^{-1}$ ,  $p < 0,001$ ). La formación de Bio-estruvita en presencia de células muertas, se produce debido a que parte del fosfato presente en la orina puede precipitar de forma espontánea (Etter *et al.*, 2011) en los restos celulares que sirven como superficies para la nucleación heterogénea, aspecto que favorece la formación del mineral (Ben Omar *et al.*, 1995). La poca cantidad de mineral formado, muestra una vez más que la actividad metabólica de los microorganismos participa de manera activa en la formación de estruvita (Rivadeneira *et al.* 2014).

El pH final de los de los medios de cultivo presentó variaciones entre 7.6 y 9.78, existiendo una correlación significativa ( $r=0,295$ ,  $p < 0,001$ ) entre el pH final del medio y el peso de los cristales de estruvita formados en una semana (Figura 3).



**Fig. 3.** Diagrama de dispersión que muestra la correlación positiva entre el pH final del medio y la producción de estruvita (gramos por litro), de las cuatro OTUs (GMD13, GM11, GM8 y GM15) en tres medios de cultivo Orina Artificial (OA), Orina (O) y Medio sintético (MS). Los puntos corresponden a los resultados de 60 ensayos.

El pH final en todos los medios de cultivo es similar al reportado en estudios previos (Ben Omar *et al.* 1994; Barbosa *et al.* 2016) y los valores se encuentran en el rango en el cual los cristales de estruvita precipitan (Udert *et al.*, 2003b; Ronteltap *et al.*, 2010). Los datos obtenidos también confirman que a medida que el pH incrementa, aumenta la cantidad y el tamaño de los cristales formados (Ben Omar *et al.* 1994).

En los cultivos de Orina Artificial el pH final del control positivo (*Proteus mirabilis*) fue significativamente superior al promedio de los demás ensayos (9,37,  $p < 0,001$ ). Por el contrario, en Orina el control positivo alcanzó un pH final similar al resto de las pruebas (9,24,  $p = 0,315$ ). Esta observación nuevamente sugiere que la orina contiene compuestos capaces de inhibir la actividad ureasa de las bacterias (Downey *et al.*, 1992; Torzewska *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010; Prywer y Torzewska, 2010).

El pH final del medio de cultivo con células muertas fue significativamente menor que el promedio del resto de los ensayos (7,09,  $t_{19} = 20,007$ ,  $p < 0,001$ ), debido a que en ausencia de actividad metabólica bacteriana la cantidad de amonio disuelto en el medio fue mínima, siendo que esta molécula es la principal responsable del incremento en las unidades de pH (Jafferet *et al.*, 2002; Shuet *et al.*, 2006).

En general, todos los medios de cultivo mostraron el mismo comportamiento respecto al tiempo requerido para la formación de estruvita: i) A las 24 horas, el medio presentaba turbidez, lo que evidencia que las cepas aisladas son de rápido crecimiento, ii) Pasadas las 48 horas, el medio de cultivo contenía un precipitado amorfo de color blanquecino (McLean *et al.*, 1990), iii) Entre tres a cinco días de incubación la presencia de cristales fue evidente (Ben Omar *et al.*, 1994; 1996; Da Silva *et al.*, 2000) y finalmente iv) Con el paso del tiempo aumento la cantidad de cristales producidos (Sánchez-Román *et al.*, 2007; Sadowski *et al.*, 2010). Estas observaciones concuerdan con lo reportado en estudios anteriores (Beavon & Heatley 1962; Rivadeneyra *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1991; Rivadeneyra *et al.*, 2014; González-Martínez *et al.*, 2015), presentando evidencia a favor de los modelos que plantean que la formación de cristales de estruvita comienza luego de superar la fase de crecimiento (Ben Omar *et al.*, 1994; Schink *et al.*, 2002) y que los primeros cristales precipitados sirven para promover la nucleación e incrementar el tamaño y la cantidad de mineral formado (Battistoni *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011b).

#### **8.4 Identificación molecular de cepa bacteriana formadora de Bio-estruvita.**

El resultado obtenido luego del análisis mediante BLAST de la secuenciación del producto de amplificación del 16S rDNA de la cepa GMD 13, determinó 100% de homología con *Alcaligenes faecalis*.

*Alcaligenes faecalis* es una Beta Proteobacteria, gram negativa de forma bacilar, que puede habitar el suelo y cuerpos de agua en su forma de vida libre, pero también coloniza el tracto intestinal de insectos, aves, nematodos y mamíferos (Di Bella *et al.*, 2003; Hernández-Mendoza *et al.*, 2014; Quiroz *et al.*, 2014; Filipe *et al.*, 2017).

A pesar de ser considerado un patógeno oportunista, por lo general *Alcaligenes faecalis* no representa un peligro para la salud humana (Di Bella *et al.*, 2003; Tena *et al.*, 2015; Filipe *et al.*, 2017).

Existen reportes previos de la presencia de *Alcaligenes faecalis* en la microbiota intestinal de especies de murciélagos de los géneros *Tadarida sp.*, *Myotis sp.* y *Desmodus rotundus* (Di Bella *et al.*, 2003; Chaverri 2006; Vandžurová *et al.*, 2012; Galicia *et al.*, 2014). La cepa GMD 13 de *Alcaligenes faecalis* fue aislada de depósitos de guano en una cueva donde habitaba una colonia de murciélagos del género *Desmodus rotundus*.

*Alcaligenes faecalis* es capaz de degradar compuestos aromáticos, fenólicos, quitina, indol, antibióticos y otras moléculas complejas (Jianget *al.*, 2007; Annamalai *et al.*, 2011; Regaret *al.*, 2016; Zhanget *al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2017; Singha *et al.*, 2017). Debido a esta versatilidad metabólica y a la capacidad de sobrevivir en ambientes alcalinos, este microorganismo es empleado en una gran variedad de procesos biotecnológicos (Nishimura *et al.*, 2000; Thangam y Rajkumar, 2002; Annamalai *et al.*, 2011).

Respecto al tratamiento de aguas residuales, *Alcaligenes faecalis* diferencia de la mayoría de las bacterias, tiene la capacidad de realizar nitrificación heterótrofa y desnitrificación aerobia (Joo *et al.*, 2005; Kesik *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2012), por lo que se la usa para la remoción del  $\text{NH}_4^+$ -N de desechos líquidos (Wanget *al.*, 2015; Neerackal *et al.*, 2016).

Aunque cepas del género *Alcaligenes* han sido relacionadas con la formación de cálculos renales (Durlach *et al.*, 1994), hasta donde llega nuestro conocimiento, no existen reportes del uso de *Alcaligenes faecalis* en la producción de estruvita, por lo que este estudio aporta una nueva aplicación biotecnológica con este microorganismo.

La producción biotecnológica de estruvita no es estable a lo largo del tiempo, y este problema se debe a que las cepas bacterianas comúnmente empleadas en este proceso tienen un metabolismo inestable y una pobre adaptabilidad a las condiciones del medio (Huet *al.*, 2018). En este sentido el uso de *Alcaligenes faecalis* para la producción de estruvita puede ser una opción prometedora, ya que este microorganismo soporta condiciones ambientales adversas y es capaz de colonizar diversos nichos ecológicos (Di Bella *et al.*, 2003; Jianget *al.*, 2007; Annamalai *et al.*, 2011; Hernández-Mendoza *et al.*, 2014; Quiroz *et al.*, 2014; Regaret *al.*, 2016; Zhanget *al.*, 2016; Filipe *et al.*, 2017; Qiu *et al.*, 2017; Singha *et al.*, 2017).

## **8.5 Optimización de la producción de Bio-estruvita.**

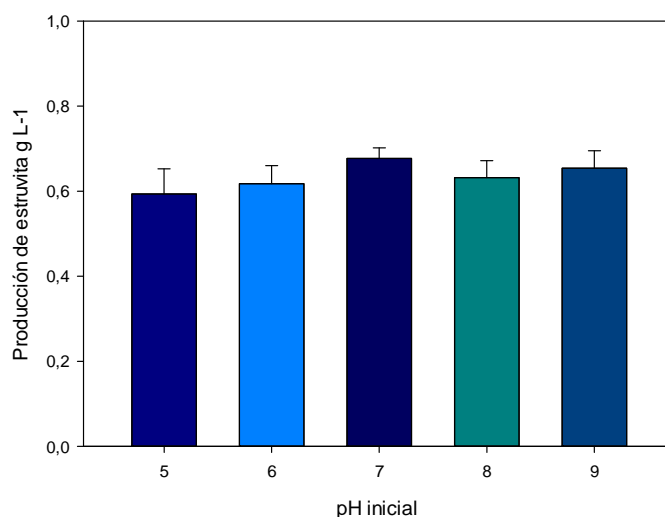
### **8.5.1 Efecto del pH inicial.**

Uno de los aspectos claves de la producción de estruvita por métodos fisicoquímicos es disminuir la solubilidad del ion  $\text{Mg}^{2+}$  incrementando el pH de medio (Clapham *et al.*, 1990), ya sea adicionando NaOH (Ueno y Fujii, 2001; Maurer *et al.*, 2008; Hjorth *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2012; Cusick *et al.*, 2014) o agitando el sustrato para remover el  $\text{CO}_2$  presente (Ohlinger *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2002; Moussa *et al.*, 2011; Cerrillo *et al.*

2015). Ambas metodologías elevan los costos de producción (Suzuki *et al.*, 2002; Cerrillo *et al.*, 2015), y es en esta parte del proceso, donde la producción biológica de estruvita tiene su principal ventaja, ya que la actividad metabólica de los microorganismos eleva el pH del medio sin necesidad de reactivos ni procesos adicionales (Beavon y Heatley, 1962; Dumanski *et al.*, 1994; Da Silva *et al.*, 2000; Sánchez-Román *et al.*, 2007; Tauch *et al.*, 2008; González-Muñoz *et al.*, 2008).

Los resultados del ensayo sugieren que el pH inicial del medio de cultivo (orina) no afecta de manera significativa la cantidad de estruvita producida ( $p=0,536$ ) (Figura 4), determinando que *Alcaligenes faecalis* GMD 13 tiene la capacidad de incrementar el pH de la orina hasta alcanzar valores óptimos (entre 8,5 y 9) para la formación de estruvita independientemente del pH inicial del medio (Stratful *et al.* 2001; Jaffer *et al.* 2002; Lee, *et al.* 2003; Gunay *et al.* 2008; Gadekar & Pullammanappallil 2010; Ye *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011a; Renet *et al.* 2015; Wang *et al.* 2016). Este hecho pone en evidencia una vez más que en la producción biológica de estruvita no es necesario adicionar álcalis o establecer la agitación del medio para lograr precipitar el mineral (Prywer y Torzewska, 2010; Ronteltap *et al.* 2010; Prabhu y Mutnuri, 2014).

Se conoce que *Alcaligenes faecalis* realiza nitrificación heterótrofa y desnitrificación aerobia en condiciones neutras o ácidas (Joo *et al.*, 2005; Kesik *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2012), por lo que se podría pensar que esta pérdida de nitrógeno en forma de  $N_2O$  y  $N_2$  debería haber afectado la cantidad de estruvita formada en los tratamientos con pH inicial de 5, 6 y 7. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que con el crecimiento de la bacteria en el medio el pH se eleva de manera brusca dando poco tiempo para que realicen procesos de nitrificación/desnitrificación dependientes de condiciones ácidas. Adicionalmente se debe tomar en cuenta que el  $NH_4^+-N$  se encuentra en exceso respecto al fósforo y magnesio.



**Fig. 4.** Valores promedio de la producción de estruvita (g de mineral por litro de orina), de la cepa *Alcaligenes faecalis* GMD 13, partiendo de cinco valores de pH inicial. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

### 8.5.2 Efecto de la Temperatura y Relación Mg:

La temperatura no parece afectar de manera significativa la cantidad de estruvita producida mediante métodos fisicoquímicos (Moussa *et al.*, 2011), sin embargo, es importante estudiar este factor en la producción biológica de estruvita, puesto que la temperatura afecta el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos (Rivadeneira *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2010).

Por otra parte, la cantidad de magnesio presente en la orina no es suficiente para precipitar todo el amonio y fosfato del medio (Grases *et al.*, 1996), por lo que es necesario adicionar magnesio a la orina para mejorar la producción de estruvita (Rahman *et al.*, 2014). Las relaciones molares entre Mg:P que maximizan la producción de estruvita han sido objeto de numerosos estudios (Battistoni *et al.* 2000; Jaffer *et al.* 2002; Nelson *et al.*, 2006; Basakcilardan-Kabakci, *et al.*, 2007; Uludag-Demirer *et al.* 2008; Etter *et al.* 2011; Yuan *et al.* 2012; Zhang *et al.*, 2012; Jeong *et al.* 2014; Uysal *et al.*, 2015; Wang *et al.* 2016) y en general varían de 1:1 a 3:1 Mg:P, aunque en todos los casos la relación óptima debe ser determinada experimentalmente.

Otro aspecto importante que puede ayudar a reducir los costos de producción de estruvita, es identificar fuentes de magnesio disponibles en grandes cantidades y de bajo costo (Lee, *et al.* 2003; Gunay *et al.* 2008), en nuestro estudio optamos por el Cloruro de Magnesio (Ronteltap *et al.* 2010), debido a que este compuesto es un subproducto de



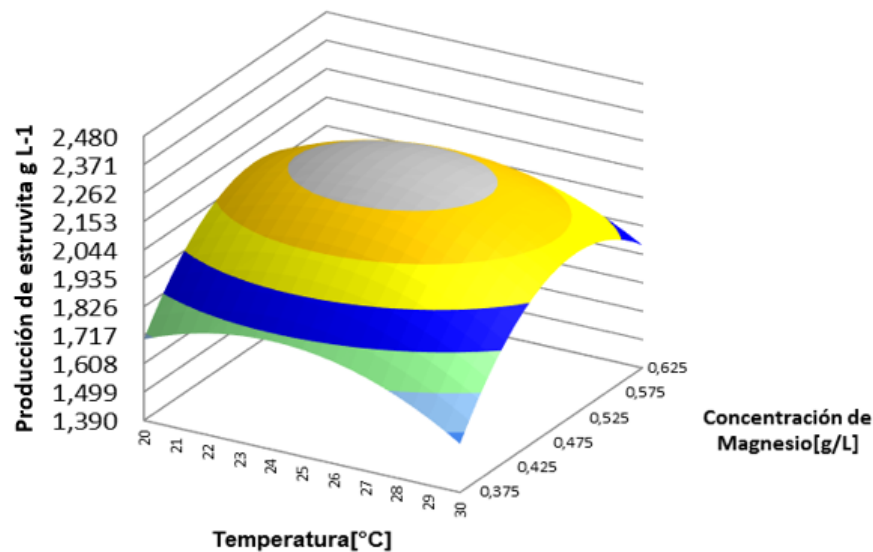
la explotación de litio llevada a cabo en el Salar de Uyuni por la compañía Yacimientos Liticos Bolivianos (YLB), y puede ser una fuente idónea de magnesio para la producción de Bio-estruvita en Bolivia.

Para el análisis mediante Metodología de Superficie de Respuesta se optó por un Diseño Central Compuesto (Ye *et al.*, 2010; Ren *et al.* 2015; Wang *et al.* 2016), y con la finalidad de planificar los experimentos se generó opciones en base a este diseño usando la función *ccd.pick* del programa “rms” (Lenth, 2009). De las 10 mejores opciones (Anexo 9.3), se eligió un diseño con 4 puntos factoriales, 6 puntos centrales y 4 puntos axiales, el valor de  $\alpha$  (distancia entre el centro y los puntos axiales) fue establecido en  $\pm 1,41$  para obtener suficiente rotabilidad y ortogonalidad en el diseño.

Para analizar los resultados obtenidos se usó un modelo de primer orden (Anexo 9.4), el cual mostró una falta de ajuste significativa ( $p=0.01251$ ), y un coeficiente de regresión de  $R^2=0.1363$ , lo que sugiere que existe curvatura dentro del espacio experimental por lo que se descartó realizar un escalamiento ascendente.

Cuando se usó un modelo de segundo orden (Anexo 9.5) aumento el ajuste del modelo (Significancia de falta de ajuste  $p=0.762$ ) y el coeficiente de regresión ajustado alcanzo un valor de  $R^2=0.8366$ . Según el análisis de este modelo y el gráfico de contorno (Figura 5.) los valores de concentración de magnesio y temperatura que optimizan la producción de Bio-estruvita son;  $0,521 \text{ mg L}^{-1}$  y  $23,9^\circ\text{C}$ , respectivamente.

El promedio de la producción de estruvita inducida por la cepa *Alcaligenes faecalis* (GMD 13) (2,3 gramos por litro de orina), fue similar o superior a lo producido mediante métodos fisicoquímicos (Jaffer *et al.* 2002; Jeong *et al.* 2005; Suzuki *et al.* 2006; Uludag-Demirer *et al.* 2008; Gadekar & Pullammanappallil 2010; Ye *et al.*, 2010; Antonini *et al.*, 2011; Wu y Zhou 2012; Barbosa *et al.*, 2016; Wang *et al.* 2016; Jeong *et al.*, 2014; Latifian *et al.*, 2014; Uysal *et al.* 2015; Ren *et al.* 2015).



**Fig. 5** Gráfico de Contorno de los efectos combinados de la relación de concentración de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>):Fósforo y temperatura del medio de cultivo, en la cantidad de estruvita formada por la cepa *Alcaligenes faecalis* GMD 13 (g de mineral por litro de orina).

Estos resultados deben ser considerados con precaución, tomando en cuenta que durante el experimento se trabajó con orina fresca de una sola fuente la cual fue esterilizada mediante filtración y el ensayo fue a corto plazo (Downey *et al.*, 1992; Torzewska *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010; Prywer y Torzewska, 2010). Muchos factores pueden afectar el rendimiento en la producción de estruvita cuando se realice a gran escala, durante largos periodos de tiempo y se use orina no estéril proveniente de diversas fuentes.

Los resultados muestran que una relación de concentración 1:1 de Mg:P que corresponden a 0.5 g L<sup>-1</sup> es un valor óptimo para las condiciones experimentales del estudio. Este resultado es similar a los reportados en estudios de producción de estruvita por métodos fisicoquímicos (Basakcildan-Kabakci, *et al.* 2007; Barbosa *et al.* 2016). Concentraciones menores de magnesio parecen ser insuficientes para recuperar la mayor parte del fosfato y amonio presente en la orina (Nelson *et al.* 2006; Ye *et al.* 2010; Liu *et al.* 2011a; Zhang *et al.* 2012). El MgCl<sub>2</sub> mostró ser una buena fuente de magnesio para la producción de Bio-estruvita (Suzuki *et al.* 2006), produciendo similares resultados de producción de estruvita que cuando otras sales de magnesio son utilizadas (Wu *et al.*, 2004).

La temperatura óptima para la producción de estruvita por *Alcaligenes faecalis* (GMD 13) ronda los 25°C, al parecer esta temperatura es lo suficientemente alta para favorecer el crecimiento bacteriano (Rivadeneira *et al.*, 1993) pero no es demasiado elevada para aumentar la solubilidad de los cristales de estruvita (lo que disminuiría la eficacia de precipitación) (Rivadeneira *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2010; Ronteltap *et al.*, 2010; Moussa *et al.* 2011; Capdevielle *et al.*, 2013). Algo similar ocurre cuando esta bacteria es empleada en procesos de Nitrificación/ Desnitrificación con una temperatura optima cercana a los 28°C (Kesiket *et al.*, 2006).

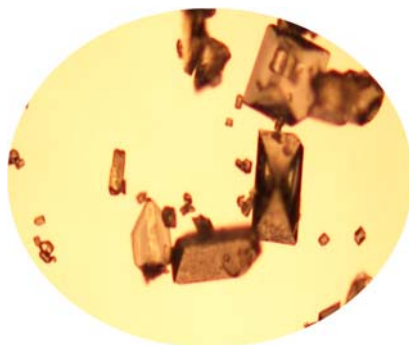
Considerando que la tonelada de estruvita puede comercializarse en aproximadamente 240 euros y que para producir una tonelada de este mineral se necesitaría aproximadamente 260 kg de MgCl<sub>2</sub> (que en Bolivia es un subproducto de la explotación de litio y puede ser adquirido a bajo precio), mas el costo de almacenamiento y transporte de la orina, se puede concluir que la producción de Bio-estruvita es factible desde el punto de vista económico (Münch *et al.*, 2001; Cerrillo *et al.* 2015).

## **8.6 Caracterización de los cristales de Bio-estruvita**

### **8.6.1 Separación de los cristales y morfología.**

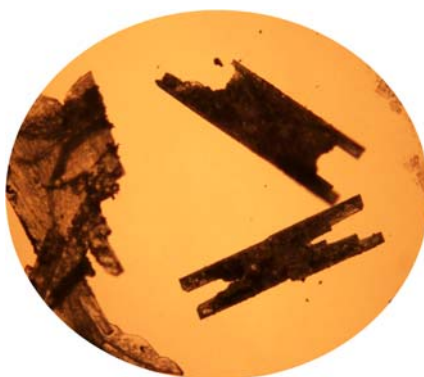
#### *Morfología*

Los cristales obtenidos fueron de color blanco, aspecto cristalino y ligeramente translucidos, (Beavon y Heatley, 1962). La forma de los cristales varió dependiendo del medio de cultivo (Abbona y Boistelle, 1979), aquellos formados en Medio sintético fueron poliédricos o pseudo-poliédricos, asemejando a una ataúd o prisma (Figura 6.) (Sánchez-Román *et al.*, 2007; González-Muñoz *et al.*, 2008; Rivadeneira *et al.* 2014; Sadowski *et al.*, 2014), lo que sugiere que el cristal se formó a través de un crecimiento lento y a valores de pH relativamente bajos (McLean *et al.*, 1990). Este tipo de cristales pueden ser purificados y tratados para construir partículas que porten catalizadores químicos o para elaborar estructuras resistentes al fuego (Chen *et al.*, 2010).

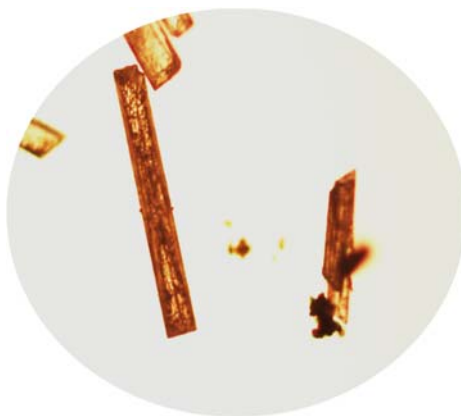


**Fig. 6.** Cristales de estruvita de forma poliédrica producidos por la cepa GD 11 en Medio sintético MS, observado en objetivo 40X (Olympus CX21).

Al contrario, la mayor parte de los cristales producidos en Orina Artificial y Orina, presentaron una apariencia de ramas dendríticas en forma de X (Figura 7.) (Downey *et al.*, 1992; Wesson y Ward 2007; Sadowski *et al.* 2010; Prywer *et al.*, 2012), y solo en algunos casos forma de barra o prisma (Chen *et al.* 2010)(Figura 8.). Ambas morfologías sugieren que la formación del cristal en estos medios se dio mediante un crecimiento rápido, con un cambio brusco de pH y supersaturación de iones en el medio (Clapham *et al.* 1990; McLean *et al.*, 1990). La estruvita formada por este tipo de cristales es usada casi exclusivamente como fertilizante (Uysal *et al.*, 2015; Vogel *et al.*, 2015; You *et al.*, 2015). En ningún caso se observó cristales amorfos, como los que se forman cuando existen impurezas en el mineral (Ben Omar *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2017).



**Fig. 7.** Cristales de estruvita de forma de X producidos por la cepa GMD 13 en Orina O, observados en objetivo 40X (Olympus CX21).

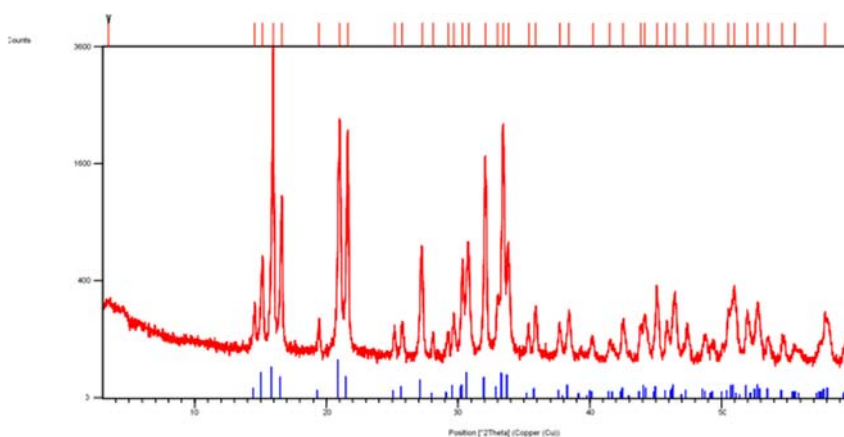


**Fig. 8.** Cristales de Bio-estruvita de forma de barra producidos por la cepa GM 28 en Orina Artificial OA, observados en objetivo 40X (Olympus CX21).

### 8.6.2 Caracterización de los cristales

#### *Identificación*

La identidad de los cristales obtenidos en todos los ensayos fue confirmada mediante difracción de rayos X (XRD) (Figura 9. y Anexos 9.6). En todos los casos los patrones presentaban picos de difracción a  $(2\theta)$  en  $15^\circ$ ,  $27^\circ$ , y  $30^\circ$  (Chen *et al.*, 2010) y coincidieron con el patrón de XRD referencia de la estruvita PDF 01-077-2303 (Beavon y Heatley, 1962; Chen *et al.* 2010; Prywer & Torzewska 2010). Nuestros resultados confirman que usar orina sin diluir favorece la formación de estruvita y no de Hidroxiapatita (Udert *et al.*, 2003b).



**Fig. 9.** Patrón de difracción de rayos X (XRD) correspondiente a cristales de estruvita formados por la Cepa GM 18 en Medio sintético MS.

El análisis SEM-EDS (Anexo 9.7) muestra que la Bio-estruvita obtenida presentó una pureza promedio de 97,59 %, siendo similar a la pureza de los cristales producidos por métodos fisicoquímicos (Britton *et al.*, 2005; Gadekar y Pullammanappallil, 2010; Zhang *et al.*, 2012). En todos los casos existió trazas de potasio en los cristales de Bio-estruvita en un promedio de 0,87%. Otros elementos también estuvieron presentes dependiendo del medio de cultivo donde se formó el mineral (Downey *et al.*, 1992; Cerrillo *et al.*, 2015). En orina artificial se detectaron trazas de Calcio (Delgado *et al.* 2013), que puede deberse a restos de endoesporas atrapadas en el mineral (Nelson *et al.*, 1991). Todas las muestras de orina presentan restos de Cloro algo para lo que no se encontró una explicación.

## 9. Conclusiones

Con base a los resultados obtenidos se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1. Las bacterias capaces de inducir la formación de estruvita presentan una alta diversidad.
2. Un asilamiento selectivo de bacterias (en lugares propicios para la formación natural de Bio-estruvita) aumenta la probabilidad de encontrar cepas capaces de inducir la formación de este mineral.
3. La formación de estruvita en orina, es producto de la actividad metabólica bacteriana, por lo que su presencia es necesaria para la producción del mineral.
4. El pH final del medio de cultivo estuvo positivamente correlacionado con la cantidad de estruvita producida.
5. La cantidad de Bio-estruvita producida usando microorganismos es similar o superior a lo generado usando métodos fisicoquímicos.
6. El pH inicial del medio no afecta significativamente la cantidad de estruvita formada en orina cuando se emplean microorganismos.
7. Una relación molar 1:1 de Mg:P y una temperatura de 25°C parecen ser los valores óptimos que maximizan la producción biológica de Bio-estruvita a partir de orina.
8. El MgCl<sub>2</sub> ha mostrado ser una adecuada fuente de magnesio para la producción biológica de estruvita en Bolivia.
9. La forma de los cristales de estruvita producidos varió dependiendo del medio empleado.

10. La pureza de los cristales de Bio-estruvita producidos por bacterias, fue similar o superior a la reportada cuando este mineral es producido por métodos fisicoquímicos.
11. *Alcaligenes faecalis* GDM 13 es capaz de inducir la formación de estruvita a partir de orina, siendo una opción promisoría para su empleo en procesos de bioremediación.

En general podemos concluir que una gran diversidad de bacterias es capaz de inducir la formación de cristales de estruvita, y que la producción biológica de este mineral a partir de orina, es un proceso factible, económicamente viable y amigable con el medio ambiente, siendo su rendimiento similar al obtenido mediante métodos fisicoquímicos.

## **10. Recomendaciones.**

Futuros estudios que tengan como objetivo llevar la producción de estruvita a escala piloto, deberían considerar aspectos que no fueron abordados durante esta investigación. Algunos ejemplos de estos aspectos faltantes son: i) el porcentaje de fósforo y nitrógeno recuperado en forma de estruvita a partir de orina ii) el rendimiento en la producción de estruvita a temperatura ambiente iii) la interacción de la cepa *Alcaligenes faecalis* GDM 13 con otros microorganismos presentes en orina no estéril iv) la posible presencia de microorganismos patógenos en la estruvita producida v) el tipo de bioreactor que maximice la producción de estruvita

## 11. Referencias

- Abbona, F., y Boistelle, R. (1979). Growth morphology and crystal habit of struvite crystals ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), *J. Cryst. Growth*, 46, 339-354 (1979).
- Adesiyun A.A., Stewart-Johnson A., y Thompson N.N. (2009). Isolation of enteric pathogens from bats in Trinidad. *J. Wildl. Dis.* 45, 952–961.
- Adnan, A., Mavinic, D.S., y Koch, F.A. (2003). Pilot-scale study of phosphorus recovery through struvite crystallization—examining the process feasibility. *J. Environ. Eng. Sci.*, 2: 315–324.
- Aguirre L.F. (2007). Generalidades. pp. 3-82, En: Aguirre, L. F. (ed.). Historia Natural, Distribución y Conservación de los Murciélagos de Bolivia. Centro de ecología y Difusión Simón I. Patiño, Santa Cruz, Bolivia. 416 pp.
- Akobi B., Aboderin O., Sasaki T., Shittu A. (2012). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from faecal samples of the Straw-Coloured Fruit Bat (*Eidolon helvum*) in Obafemi Awolowo University (OAU), Nigeria. *BMC Microbiology*. 12:279.
- Albuquerque M.G.E., Torres C.A.V., Reis M.A.M. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water Research*, 44: 3419-3433.
- Annamalai N., Rajeswari V.M., Vijayalakshmi S., Balasubramanian T. (2011). Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes faecalis* AU02 by utilizing marine wastes and its antioxidant activity. *Ann Microbiol*, 61:801–807. DOI 10.1007/s13213-011-0198-5.
- Antonini, A., Paris, S., Eichert, T., y Clemens, J. (2011). Nitrogen and Phosphorus Recovery from Human Urine by Struvite Precipitation and Air Stripping in Vietnam. *Clean – Soil, Air, Water*, 39 (12), 1099–1104.
- Arias D., Cisternas L.A., Rivas M. (2016). Biomineralization of calcium and magnesium crystals from seawater by halotolerant bacteria isolated from Atacama Salar (Chile). *Desalination* 405, 1–9.
- Ascher J., Ceccherini M.T., Chroňáková A., Jirout J., Borgogni F., Elhottová D., Šimek M., Pietramellara G. (2004). Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular ADN. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 859-868.
- Audisio M.C., Torresa, M.J., Sabaté, D.C., Ibareguren, C., y Apella, M.C. (2011). Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research*, 166; 1-13.



- Bai Y., Kosoy M., Recuenco S., Alvarez D., Moran D., Tumelle A., Ellison J., Gracia D.L., Estevez A., Lindblade K., y Rupprecht C.E. (2011). Bartonella spp. in bats, Guatemala. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1269–1272.
- Barbosa, S.G., Peixoto, L., Meulman, B., Alves, M.M., y Pereira, M.A. (2016). A design of experiments to assess phosphorous removal and crystal properties in struvite precipitation of source separated urine using different Mg sources. *Chemical Engineering Journal*, 298 (2016) 146–153
- Basakcildan-Kabakci, S., Ipekoglu, A.N., y Talinli, I. (2007). Precipitation of urinary phosphate. *Environ Eng Sci*, 24:1399–1408.
- Battistoni, P., Pavan, P., Prisciandaro, M., y Cecchi, F. (2000). Struvite crystallization: a feasible and reliable way to fix phosphorus in anaerobic supernatants. *Water Research*, 34 (11), 3033–3041.
- Battistoni, P., De Angelis, A., Pavan, P., Prisciandaro, M., y Cecchi, F. (2001). Phosphorus removal from a real anaerobic supernatant by struvite crystallization. *Water Res*, 35 (9), 2167e2178.
- Battistoni P., De Angelis, A., Prisciandaro, M., Boccadoro, R., y Bolzonella, D. (2002). P removal from anaerobic supernatants by struvite crystallization: long term validation and process modelling. *Water Res.* 36, 1927–1938.
- Beavon, J., y Heatley, N. G. (1962). The Occurrence of Struvite (Magnesium Ammonium Phosphate Hexahydrate) in Microbial Cultures. *J. gen. Microbiol*, 31: 167-169.
- Ben Omar, N., Entrena, M., González-Muñoz, M.T., Arias, J.M., y Huertas, F. (1994). Effects of pH and phosphate on the production of struvite by *Myxococcus xanthus*. *Geomicrobiol. J*, 12, 81-90.
- Ben Omar, N., Martínez-Cañamero, M., González Muñoz, M.T., Arias, J.M., y Huertas, F. (1995). *Myxococcus xanthus* killed cells as inducers of struvite crystallization. Its possible role in the biomineralization processes. *Chemosphere* 30, 2387-2396.
- Ben Omar, N., Entrena, M., González-Muñoz, M.T., Arias, J.M., Huertas, F., y Rodríguez-Gallego, M. (1996). Morphological diversity of struvite crystals produced by *Myxococcus coralloides* and *Myxococcus xanthus*. *Toxicol Environ Chem*, 53:209–17.
- Ben Omar, N., González-Muñoz, M.T., y Arias Peñalver, J.M. (1998). Struvite crystallization on *Myxococcus* Cells. *Chemosphere*, 36 (3): 475-481.
- Bichler, K.-H., Eipper, E., Naber, K., Braun, V., Zimmermann, R., Lahme, S. (2002). Urinary infection stones. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19; 488-498.

- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., y Escalera, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76: 965–977.
- Booker, N.A., Priestley, A.J., y Fraser, I.H. (1999). Struvite formation in wastewater treatment plants: Opportunities for nutrient recovery. *Environ. Technol*, 20, 777–782.
- Britton, A., Koch, F.A., Mavinic, D.S., Adnan, A., Oldham, W.K., y Udala, B. (2005). Pilot-scale struvite recovery from anaerobic digester supernatant at an enhanced biological phosphorus removal wastewater treatment plant. *J. Environ. Eng. Sci.*, 4: 265–277.
- Burns, R.T., Moody, L.B., Walker, F.R., y Raman, D.R. (2001). Laboratory and in-situ reductions of soluble phosphorus in swine waste slurries. *Environmental Technology*, 22 (11), 1273–1278.
- Capdevielle, A., Sýkorová, E., Biscans, B., Béline, F., y Daumer, M.-L. (2013). Optimization of struvite precipitation in synthetic biologically treated swine wastewater - Determination of the optimal process parameters. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 244-245 . pp. 357-369. ISSN 0304-3894.
- Chaverri G. (2006). Flora bacteriana aeróbica del tracto digestivo del vampiro común, *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Rev. Biol. Trop.* 54 (3): 717-724.
- Chen, L., Shen, Y., Xie, A., Huang, F., Zhang, W., y Liu, S. (2010). Seed-Mediated Synthesis of Unusual Struvite Hierarchical Superstructures Using Bacterium. *Crystal Growth e Desing.* 10: 2073-2082. DOI: 10.1021/cg900974n
- Christensen, W.B. (1946). Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and Paracolon Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *Journal of Bacteriology.* 52(4); 461–466.
- Cihan, A.C. (2013). Taxonomic Classification of Anoxybacillus Isolates from Geothermal Regions in Turkey by 16S rRNA Gene Sequences and ARDRA, ITS-PCR, Rep-PCR Analyses. *Polish Journal of Microbiology*, 62(2): 149–163.
- Clapham, L., McLean, R.J.C., Nickel, J.C., Downey, J., y Costerton, J.W. (1990). The influence of bacteria on struvite crystal habit and its importance in urinary stone formation. *J Crystal Growth*, 104: 475–84.
- Çelen, I., Buchanan, J.R., Burns, R.T., Bruce Robinson, R., y Raj Raman, D. (2007). Using a chemical equilibrium model to predict amendments required to precipitate phosphorus as struvite in liquid swine manure. *Water Res* 41:1689–1696.

- Cerrillo, M., Palatsi, J., Comas, J., Vicens, J., y Bonmatía, A. (2015). Struvite precipitation as a technology to be integrated in a manure anaerobic digestion treatment plant – removal efficiency, crystal characterization and agricultural assessment. *J Chem Technol Biotechnol.* 90: 1135–1143. DOI 10.1002/jctb.4459.
- Cordell, D., Drangert, J.O., y White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, doi:10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009.
- Cusick, R.D., y Logan, B.E. (2012). Phosphate recovery as struvite within a single chamber microbial electrolysis cell. *Bioresource Technology*, 107; 110–115.
- Cusick, R.D., Ullery, M.L., Dempsey, B.A., y Logan, B.E. (2014). Electrochemical struvite precipitation from digestate with a fluidized bed cathode microbial electrolysis cell. *Water Research*, 54: 297-306.
- Czichos, H., Saito, T., y Smith, L.R. (Eds.). (2006). *Springer Handbook of Materials Measurement Methods*. Springer Berlin Heidelberg.
- Da Silva S., Bernet, N., Delgenès, J.P., y Moletta, R. (2000). Effect of Culture Conditions on the Formation of Struvite by *Myxococcus xanthus*. *Chemosphere*, 40: 1289–1296.
- Daffonchio, D., Cherif, A., Brusetti, L., Rizzi, A., Mora, D., Boudabous, A., y Borin, S. (2003). Nature of Polymorphisms in 16S-23S rRNA Gene Intergenic Transcribed Spacer Fingerprinting of *Bacillus* and Related Genera. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(9): 5128–5137.
- Dalgaard P. (2015). ISwR: Introductory Statistics with R. R package version 2.0-7. <https://CRAN.R-project.org/package=ISwR>
- de-Bashan, L.E., y Bashan, Y. (2002). Fertilizer potential of phosphorus recovered from wastewater treatments. En: Velázquez, E., y Rodríguez-Barrueco. C. (Eds.), *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, 179–184.
- de-Bashan, L.E., y Bashan, Y. (2004). Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). *Water Res*, 38 (19), 4222–4246.
- de Vries, G.E., y López, A. (2013). Wastewaters Are Not Wastes. En Pechan P. & G.E. de Vries (Eds.). *Living with Water* (pp 101-141). Springer, New York.
- Decrey, L., Udert, K.M., Tilley, E., Pecson, B.M., y Kohn, T. (2011). Fate of the pathogen indicators phage FX174 and *Ascaris suum* eggs during the production of struvite fertilizer from source-separated urine. *Water Research*, 45: 4960-4972.

- Delgado, G., Párraga, J., Martín-García, J.M., Rivadeneyra, M.A., Sánchez-Marañón, M., Delgado, R. (2013). Carbonate and phosphate precipitation by saline soil bacteria in a monitored culture medium. *Geomicrobiol. J.*, 30, 199–208.
- Di Bella C., Piraino C., Caracappa S., Fornasari L., Violani C., y Zava B. (2003). Enteric microflora in Italian Chiroptera. *J. Mt. Ecol.* 7, 221–224.
- Díaz M., Aguirre L.F. y Barquez R. M. (2011). Clave de identificación de los murciélagos del cono sur de Sudamérica. Centro de Estudios en Biología Teórica y Aplicada. Cochabamba, Bolivia. 94pp
- Downey, J.A., Nickel, J.C., Clapham, L., y Mclean, R.J.C. (1992). In vitro Inhibition of Struvite Crystal Growth by Acetohydroxamic Acid. *British Journal of Urology*, 70; 355-359.
- Doyle, J.D., Phillip, R., Churchley, J., y Parsons, S.A. (2000). Analysis of struvite precipitation in real and synthetic liquors. *Trans. Inst. Chem. Eng., Part B*, 78: 480–488.
- Doyle, J.D., y Parsons, S.A. (2002). Struvite formation, control and recovery. *Water Res*, 36 (16), 3925e3940.
- Driver, J., Lijmbach, D., y Steen, I. (1999). Why recover phosphorus for recycling and how? *Environ. Technol*, 20: 651–662.
- Dumanski A.J., Hedelin, H., Edin-Liljegren, A., Beauchemin, D., y McLean, R.J. (1994). Unique ability of the *Proteus mirabilis* capsule to enhance mineral growth in infectious urinary calculi. *Infect Immun* 62(7): 2998–3003.
- Durlach R.A., Toblli J.E., Gigler C., Domecq P., Vázquez R., Cucci V., Ramas H., Ghirlanda J.M. (1994). Staghorn renal lithiasis treated with shock waves. Bacteriologic aspects. *Medicina (B Aires)*, 54(5):411-4.
- Eisner, B.H., Deshmukh, S.M., y Lange, D. (2014). Struvite Stones, En Grasso, M., y Goldfarb, D. S. (Eds.) *Urinary Stones: Medical and Surgical Management* (pp 48-56), John Wiley & Sons, Ltd, Oxford. doi: 10.1002/9781118405390.ch5.
- Etter, B., Tilley, E., Khadka, R., y Udert, K.M. (2011). Low-cost struvite production using source-separated urine in Nepal. *Water Research*, 45, 852e862.
- Ferreira R.L., Prous X. y Martins R.P. (2006). Structure of bat guano communities in a dry Brazilian cave. *Tropical Zoology* 20: 55-74.
- Filipe M., Reimer Å., Matuschek E., Paul M., Pelkonen T, Riesbeck K. (2017). Fluoroquinolone-Resistant *Alcaligenes faecalis* Related to Chronic Suppurative Otitis Media, Angola. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2310.170268>.

- Forrest, A., Fattah, K., Mavinic, D., y Koch, F. (2008). Optimizing struvite production for phosphate recovery in WWTP. *J. Environ. Eng.*, 134, 395.
- Frost, R.L., Weier, M.L., y Erickson, K.L. (2004). Thermal Decomposition of Struvite Implications for the decomposition of kidney stones. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 76; 1025–1033.
- Fukumoto, Y., Suzuki, K., Kuroda, K., Waki M., y Yasuda, T. (2011). Effects of struvite formation and nitrification promotion on nitrogenous emissions such as NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O and NO during swine manure composting. *Bioresource Technology*, 102: 1468–1474.
- Gadekar S., y Pullammanappallil, P. (2010). Validation and Applications of a Chemical Equilibrium Model for Struvite Precipitation. *Environ Model Assess.* 15:201–209. DOI 10.1007/s10666-009-9193-7.
- Gadhikar Y.A., Zade, V.S., y Khadse, T. (2007). Bioremediation of Industrial Waste by Using Bat Guano. *Journal of Environ. Science & Engg.* 49(2); 153 – 156.
- GaliciaM.M., Buenrostro A., García J.(2014). Diversidad específica bacteriana en murciélagos de distintos gremios alimenticios en la sierra sur de Oaxaca, México. *Rev. Biol. Trop.* 62 (4): 1673-1681.
- Ganrot, Z., Dave, G., y Nilsson, E., (2007). Recovery of N and P from human urine by freezing, struvite precipitation and adsorption to zeolite and active carbon. *Bioresource Technology*, 98 (16), 3112–3121.
- Ganrot, Z., Slivka, A., y Dave, G. (2008). Nutrient Recovery from Human Urine Using Pretreated Zeolite and Struvite Precipitation in Combination with Freezing-Thawing and Plant Availability Tests on Common Wheat. *Clean*, 36 (1), 45 – 52
- Gebeshuber, I.C. (2015). Biomineralization in Marine Organisms, En: Kim, S.-K. (Ed.) *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, (pp. 1279-1300). Springer Berlin Heidelberg.
- Gilbert N. (2009). The Disappearing Nutrient. *Nature*, 461, 716–718.
- Glazer, A.N., y Nikaido, H. (2007). *Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology*. 2da Ed. Cambridge University Press, UK. 554 p.
- González-Martínez, A., Leyva-Díaz, J.C., Rodríguez-Sánchez, A., Muñoz-Palazón, B., Rivadeneyra, A., Poyatos, J.M., Rivadeneyra, M.A., y Martínez-Toledo, M.V. (2015). Isolation and metagenomic characterization of bacteria associated with calcium carbonate and struvite precipitation in a pure moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor. *Biofouling*. 31(4): 333–348. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2015.1040006>.

- González-Muñoz, M.T., Ben Omar, N., Martínez-Cañamero, M., Rodríguez-Gallego, M., López Galindo, A., y Arias, J.M. (1996). Struvite and calcite crystallization induced by cellular membranes of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Crystal Growth* 163:434-439.
- González-Muñoz, M.T., De Linares, C., Martínez-Ruiz, F., Morcillo, F., Martín-Ramos, D., y Arias, J.M. (2008). Ca–Mg kutnahorite and struvite production by *Idiomarina* strains at modern seawater salinities. *Chemosphere*. 72: 465–472.
- González-Muñoz M.T., Rodríguez-Navarro, C., Martínez-Ruiz, F., Arias, J.M., Merroun, M.L., y & Rodríguez-Gallego, M. (2010). Bacterial biomineralization: new insights from *Myxococcus*-induced mineral precipitation. En: Pedley H.M. & M. Rogerson (Eds.) *Tufas and Speleothems; unravelling the microbial and physical controls*. Volume 336. Geological Society, London, Special Publications; 2010:31-50.
- Grases, F., Söhnel, O., Vilacampa, A.I., y March, J.G. (1996). Phosphates precipitating from artificial urine and fine structure of phosphate renal calculi. *Clinica ChimicaActa*, 244: 45-67.
- Griffith, D.P. (1978). Struvite stones. *Kidney Int*. 13:372-382.
- Gunay, A., Karadag, D., Tosun, I., y Ozturk, M. (2008). Use of magnesit as a magnesium source for ammonium removal from leachate. *Journal of Hazardous Materials*, 156 (2008) 619–623.
- Haferburg, G., Kloess, G., Schmitz, W., y Kothe, E. (2008). “Ni-struvite” – A new biomineral formed by a nickel resistant *Streptomyces acidiscabies*. *Chemosphere*, 72: 517–523.
- Hayman D.T.S., Bowen R.A., Cryan P.M., McCracken G.F., O’Shea T.J., Peel A.J., Gilbert A., Webb C.T., y Wood J.L.N. (2013). Ecology of Zoonotic Infectious Diseases in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Zoonoses and Public Health*. 60: 2–21. doi: 10.1111/zph.12000.
- Hazeleger W.C., Jacobs-Reitsma W.F., van Bergen M., Lina P.H., van den Bosch T., y Beumer R.R. (2010). Bats may be carriers of *Campylobacter*. En: 15th Bat Research Conference, Abstract book. Praga, Republica Checa. 72p.
- Hernández-Mendoza A., Lozano-Aguirre Beltrán L.F., Martínez-Ocampo F., Quiroz-Castañeda R.E., Dantán-González E. (2014). A newly sequenced *Alcaligenes faecalis* strain: implications for novel temporal symbiotic relationships. *Genome Announc*. 2(6):e01246-14. doi:10.1128/genomeA.01246-14.
- Hirooka, K., y Ichihashi, O. (2013). Phosphorus recovery from artificial wastewater by microbial fuel cell and its effect on power generation. *Bioresour. Technol*, 137 (0), 368e375.

- Hjorth, M., Christensen, K.V., Christensen, M.L., y Sommer, S.G. (2011). Solid–Liquid Separation of Animal Slurry in Theory and Practice. En Lichtfouse, E., Hamelin, M., Navarrete, M., y Debaeke, P. (Eds.) *Sustainable Agriculture*, (pp. 953-986). Volumen 2. Springer Science & Business Media.
- Hu M.F., Qiu L.P., Wang Y. (2018). Microbial Induced Crystallization Technology Ushering New Hope for Removing Phosphorus from Wastewater. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. doi:10.1088/1757-899X/392/3/032038
- Huang, H., Xiao, D., Zhang, Q., y Ding, L. (2014). Removal of ammonia from landfill leachate by struvite precipitation with the use of low-cost phosphate and magnesium sources. *Journal of Environmental Management*, 145; 191-198.
- Ichihashi, O., y Hirooka, K. (2012). Removal and recovery of phosphorus as struvite from swine wastewater using microbial fuel cell. *Bioresour. Technol*, 114 (0), 303e307.
- Jaffer, Y., Clark, T.A., Pearce, P., y Parsons, S.A. (2002). Potential phosphorus recovery by struvite formation. *Water Research*, 36 (7), 1834–1842.
- Jeong, Y.-K., y Hwang, S.-J. (2005). Optimum doses of Mg and P salts for precipitating ammonia into struvite crystals in aerobic composting. *Bioresource Technology* 96:1–6.
- Jiang Y., Wen J., Bai J., Jia X., Hu Z. (2007). Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Hazardous Materials* 147; 672–676. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.05.031.
- Johnston, A.E., y Richards, I.R. (2003). Effectiveness of different precipitated phosphates as phosphorus sources for plants. *Soil Use Manage.* 19 (1), 45–49.
- Joo H.S., Hirai M., Shoda M. (2005). Characteristics of Ammonium Removal by Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 100(2); 184–191. DOI: 10.1263/jbb.100.184.
- Kabdaşlı, I., Tünay, O., y Özcan, P. (2009). Application of struvite precipitation coupled with biological treatment to slaughterhouse wastewaters. *Environmental Technology*, 30 (10); 1095–1101.
- Karak, T., Sonar, I., Nath, J.R., Paul, R.K., Das, S., Boruah, R.K., Dutta, A.K., y Das, K. (2015). Struvite for composting of agricultural wastes with termite mound: Utilizing the unutilized. *Bioresource Technology*, 187; 49–59.
- Kemacheevakul, P., Polprasert, C., y Shimiz, Y. (2011). Phosphorus recovery from human urine and anaerobically treated wastewater through pH adjustment and chemical precipitation. *Environmental Technology*, 32(7); 693–698.

- Kerth G., Perony N., y Schweitzer F. (2011). Bats are able to maintain long-term social relationships despite the high fission–fusión dynamics of their groups. *Proc. R. Soc. B.* doi:10.1098/rspb.2010.2718.
- Kesik M., Blagodatsky S., Papen H., Butterbach-Bahl K. (2006). Effect of pH, temperature and substrate on N<sub>2</sub>O, NO and CO<sub>2</sub> production by *Alcaligenes faecalis* p. *Journal of Applied Microbiology*, doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02927.x.
- Khuri, A.I., y Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *WIREs Computational Statistics*, 2: 128-149.
- Kim, J., Lee, C.-H., y Choo, K.-H. (2007). Control of struvite precipitation by selective removal of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> with dialyzer/zeolite in an anaerobic membrane bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75:187–193. DOI 10.1007/s00253-006-0791-x
- Klite P.D. (1965). Intestinal bacterial flora and transit time of three neotropical bat species. *J. Bacteriol.* 90: 375–379.
- Kofina, A.N., y Koutsoukos, P.G. (2005). Spontaneous Precipitation of Struvite from Synthetic Wastewater Solutions. *Cryst. Growth Des.*, 5, 489.
- Kosoy M., Bai Y., Lynch T., Kuzmin I.V., Niezgoda M., Franka R., Agwanda B., Breiman R.F., y Rupprecht C.E. (2010). Bartonella spp. in bats, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1875–1881.
- Kuzmin I.V., Bozick B., Guagliardo S.A., Kunkel R., Shak J.R., Tong S., y Rupprecht C.E. (2011). Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. *Emerg Health Threats J* 4, 7159.
- Laiz, L., Miller, A.Z., Jurado, V., Akatova, E., Sánchez-Moral, S., González, J.M., Dionisio, A., Macedo, M.F., y Saiz-Jiménez, C. (2009). Isolation of five Rubrobacter strains from biodeteriorated monuments. *Naturwissenschaften.* 96:71–9.
- Latifian, M., Holst, O., y Liu, J. (2014). Nitrogen and Phosphorus Removal from Urine by Sequential Struvite Formation and Recycling Process. *Clean – Soil, Air, Water*, 42 (8), 1157–1161
- Le Corre, K.S., Valsami-Jones, E., Hobbs, P., y Parsons, S.A. (2005). Impact of calcium on struvite crystal size, shape and purity. *J. Cryst. Growth* 283 (3), 514e522.
- Le Corre, K.S., Valsami-Jones, E., Hobbs, P., y Parsons, S.A. (2009). Phosphorus recovery from wastewater by struvite crystallization: a review. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 39:433-477.
- Lee, S.I., Weon, S.Y., Lee, C.W., y Koopman, B. (2003). Removal of nitrogen and phosphate from wastewater by addition of bittern. *Chemosphere*, 51; 265–271.



- Lenth, R.V. (2009). Response-Surface Methods in R, Using rsm. *Journal of Statistical Software*, 32(7), 1-17. URL <http://www.jstatsoft.org/v32/i07/>.
- Lew, B., Phalah, S., Sheindorf, C., Kummel, M., Rebhun, M., y Lahav, O. (2010). Favorable Operating Conditions for Obtaining High-Value Struvite Product from Sludge Dewatering Filtrate. *Environmental Engineering Science*, DOI: 10.1089/ees.2009.0279.
- Li H., Yao Q.-Z., Yu S.-H, Huang Y.-R., Chen X.-D., Fu S.-Q., Zhou G.-T. (2017). Bacterially mediated morphogenesis of struvite and its implication for phosphorus recovery. *American Mineralogist*.102, 381–390.
- Liu, Y., Kwag, J.-H., Kim, J.-H., y Ra, C. (2011a). Recovery of nitrogen and phosphorus by struvite crystallization from swine wastewater. *Desalination* 277; 364–369.
- Liu, Z., Zhao, Q., Wei, L., Wua, D., y Ma, L. (2011b). Effect of struvite seed crystal on MAP crystallization. DOI 10.1002/jctb.2716.
- Lowenstam, H.A., y Weiner, S. (eds) (1989) *On Biomineralization*. Oxford University Press, Oxford.
- Luo Y., Li H., Huang Y.-R., Zhao T.-L., Yao Q.-Z., Fu S.-Q., Zhou G.-T. (2018). Bacterial mineralization of struvite using MgO as magnesium source and its potential for nutrient recovery. *Chemical Engineering Journal*. 351, 195–202.
- Mamais, D., Pitt, P.A., Cheng, Y.W., Loiacono, J., y Jenkins, D. (1994), Determination of ferric chloride dose to control struvite precipitation in anaerobic sludge digesters. *Water Environ. Res.*, 66, 912–918.
- Marti, N., Bouzas, A., Seco, A., y Ferrer, J. (2008). Struvite precipitation assessment in anaerobic digestion processes. *Chem Eng J*, 141:67–74.
- Matsumoto, K., y Funaba, M. (2008). Factors affecting struvite ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) crystallization in feline urine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1780, 233.
- Maurer, M., Pronk, W., y Larsen, T.A. (2006). Treatment processes for source-separated urine. *Water Research*, 40: 3151 – 3166.
- McLean, R.J.C., Nickel, J.C., Noakes, V.C., y Costerton, J.W. (1985) An in vitro study of infectious kidney stones genesis. *Infect Immun* 49:805.
- McLean, R.J.C., Nickel, J.C., Beveridge, T.J., y Costerton, J.W. (1989). Observations of the ultrastructure of infected kidney stones. *J. Med. Microbiol.*, 29:1-7.
- McLean, R.J.C., Downey, J., Clapham, L., y Nickel, J.C. (1990). A simple technique for studying struvite crystal growth in vitro. *Urol Res.*, 18:39-43.

- Moerman, W., Carballa, M., Vandekerckhove, A., Derycke, D., y Verstraete, W. (2009). Phosphate removal in agro-industry: pilot- and full-scale operational considerations of struvite crystallization. *Water Res.*, 43 (7), 1887e1892.
- Mohajit, K.K., Bhaattarai, E., Taiganides, P., y Yap, B.C. (1989). Struvite deposits in pipes and aerators. *Biol. Wastes*, 30, 133–147.
- Mora, D., Ricci, G., Guglielmetti, S., Daffonchio, D., y Fortina, M.G. (2003). 16S–23S rRNA intergenic spacer región sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. *Microbiology*. 149: 807–813. DOI 10.1099/mic.0.25925-0.
- Moussa, S.B., Tlili, M.M., Batis, N., y Ben Amor, M. (2011). Influence of temperature on struvite precipitation by CO<sub>2</sub>-deagassing method. *Cryst. Res. Technol.* 46(3); 255 – 260/ DOI 10.1002/crat.201000571.
- Moyes, R.B., Reynolds, J., y Breakwell, D.P. (2009). Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. En Gallagher, R. (Eds). *Current Protocols in Microbiology* (p.p: A.3C.1-A.3C.8), DOI: 10.1002/9780471729259.
- Mühldorfer K., Speck S., y Wibbelt G. (2011). Diseases in free-ranging bats from Germany. *BMC Vet. Res.* 7, 61.
- Mühldorfer K. (2013). Bats and Bacterial Pathogens: A Review. *Zoonoses and Public Health*. 60: 93–103. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01536.x.
- Münch, E.V., y Barr, K. (2001). Controlled struvite crystallization for removing phosphorus from anaerobic digester sidestreams. *Water Res.*, 35: 151–159.
- Münch E.V., Benesovsky-Scott A., Josey J., Barr K. (2001). Making a Business from Struvite Crystallisation for Wastewater Treatment: Turning Waste into Gold. Second International Conference on Phosphate Recovery for recycling from Sewage and Animal wastes. Noordwijkeout, The Netherlands. 12-13 March.
- Muyzer G., De Waal E.C., Uitierlinden A.G. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 59(3); 695-700.
- Neerackal G.M., Ndegwa P.M., Joo H.-S., Wang X., Frear C.S., Harrison J.H., Beutel M.W. (2016). Potential application of *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 in mitigating ammonia emissions from dairy wastewater. *Bioresource Technology* 206; 36–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.063>.
- Nelson, B., Struble, J., y Mccarthy, G. (1991). In vitro production of struvite by *Bacillus pumilus*. *Can. J. Microbiol.*, 37: 978-983.

- Nelson, N.O., Mikkelsen, R.L., y Hesterberg, D.L. (2003). Struvite precipitation in anaerobic swine lagoon liquid: effect of pH and Mg:P ratio and determination of rate constant. *Bioresource Technology*, 89; 229–236.
- Nishimura A., Oyama H., Hamada T., Nobuoka K., Shin T., Murao S., Oda K. (2000). Molecular Cloning, Sequencing, and Expression in *Escherichia coli* of the Gene Encoding a Novel 5-Oxoprolinase without ATP-Hydrolyzing Activity from *Alcaligenes faecalis* N-38A. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 66(8): 3201–3205.
- Ohlinger, K.N., Young, T.M., y Schroeder, E.D. (1998). Predicting struvite formation in digestion. *Water Res.*, 32 (12), 3607e3614.
- Ohlinger, K.N., Young, T.M., y Schroeder, E.D. (1999). Kinetics effects on preferential struvite accumulation in wastewater. *J. Environ. Eng.*, 125, 730.
- Ohlinger, K.N., Young, T.M., y Schroeder, E.D. (2000). Postdigestion struvite precipitation using a fluidized bed reactor. *J. Environ. Eng.* 126, 361.
- Pérez-García, I., Rivadeneyra, M. A., y Ramos-Cormenzana, A. (1989). The influence of pH on struvite formation by bacteria. *Chemosphere*, 18:1633-1638.
- Pérez-García, I., Rivadeneyra, M.A., Quevedo-Sarmiento, J., y Ramos-Cormenzana, A. (1990). Struvite formation by *Arthrobacter* sp. and *Pseudomonas* sp: The influence of agitation. *Chemosphere*, 20, 243-251.
- Podlutzky A.J., Khritankov A.M., Ovodov N.D., y Austad S.N. (2005). A New Field Record for Bat Longevity. *Journal of Gerontology*. 60(11): 1366–1368.
- Prabhu, M., y Mutnuri, S. (2014). Cow urine as a potential source for struvite production. *Int J Recycl Org Waste Agricult.* 3:49. DOI 10.1007/s40093-014-0049-z.
- Prywer J., y Torzewska, A. (2009). Bacterially Induced Struvite Growth from Synthetic Urine: Experimental and Theoretical Characterization of Crystal Morphology. *Crystal Growth & Design*. 9 (8); 3538–3543.
- Prywer, J., y Torzewska, A. (2010). Biomineralization of struvite crystals by *Proteus mirabilis* from artificial urine and their mesoscopic structure. *Cryst. Res. Technol.*, 45(12): 1283 – 1289. DOI 10.1002/crat.201000344.
- Prywer J., Torzewska, A., y Płocinski, T. (2012). Unique surface and internal structure of struvite crystals formed by *Proteus mirabilis*. *Urol Res.* 40:699–707. DOI 10.1007/s00240-012-0501-3.
- Qiu, G., Song, Y., Zeng, P., Xiao, S., Duan, L. (2011). Phosphorus recovery from fosfomycin pharmaceutical wastewater by wet air oxidation and phosphate crystallization. *Chemosphere*, 84: 241–246.

- Qiu J., Zhang J., Zhang Y., Wang Y., Tong L., Hong Q., He J. (2017). Biodegradation of Picolinic Acid by a Newly Isolated Bacterium *Alcaligenes faecalis* Strain JQ135. *Curr Microbiol*, DOI 10.1007/s00284-017-1205-2.
- Quiroz R.E., Mendoza A., Obregón V., Martínez F., Hernández A., Martínez F., Guillén G., Sánchez F., Peña G., Ortíz L., Gaytán P., Dantán E. (2014). Identification of a New *Alcaligenes faecalis* Strain MOR02 and Assessment of Its Toxicity and Pathogenicity to Insects. *BioMed Research International*, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/570243>.
- R Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rahman, M.M., Salleh, M.M.A., Rashid, U., Ahsan, A., Hossain, M.M., y Ra, C.S. (2014). Production of slow release crystal fertilizer from wastewaters through struvite crystallization – A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 7, 139–155.
- Rajkowska, K., Otlewska, A., Koziróg, A., Piotrowska, M., Paulina Nowicka-Krawczyk, P., Hachułka, M., Wolski, G.J., Kunicka-Styczyńska, A., Gutarowska, B., y Żydzik-Białek, A. (2014). Assessment of biological colonization of historic buildings in the former Auschwitz II-Birkenau concentration camp. *Ann Microbiol*, 64:799–808. DOI 10.1007/s13213-013-0716-8.
- Ramlogan, M.V., y Rouff, A.A. (2015). An investigation of the thermal behavior of magnesium ammonium phosphate hexahydrate. *J Therm Anal Calorim.*, DOI 10.1007/s10973-015-4860-1.
- Regar R.K., Gaur V.K., Mishra G., Jadhao S., Kamthan M., Manickam N. (2016). Draft Genome Sequence of *Alcaligenes faecalis* Strain IITR89, an Indole-Oxidizing Bacterium. *Genome Announc* 4(2):e00067-16. doi:10.1128/genomeA.00067-16.
- Ren, W., Zhou, Z., Wan, L., Hu, D., Jiang, L.-M., y Wang, L. (2015). Optimization of phosphorus removal from reject water of sludge thickening and dewatering process through struvite precipitation, *Desalination and Water Treatment*, DOI:10.1080/19443994.2015.1072059.
- Reyes A.W., Rovira H.G., Masangkay J.S., Ramirez T.J., Yoshikawa Y., y Baticados W.N. (2011). Polymerase chain reaction assay and conventional isolation of *Salmonella* spp. from Philippine bats. *Acta Sci. Vet.* 39, 947.
- Rivadeneira, M.A., Ramos-Cormenzana, A., y Garcia-Cervigon, A. (1983). Bacterial Formation of Struvite. *Geomicrobiol.* 3; 161–163.

- Rivadeneira, M.A., González-López, J., y Ramos-Cormenzana, A. (1985). Influence of ammonium ions on calcite and struvite formation by *Azobacter* in chemically defined media. *Folia Microbiol*, 30:55-57.
- Rivadeneira, M.A., Pérez-García, I., Calvo, C., Ramos-Cormenzana, A. (1989). Struvite crystal precipitation by different phenotypes of *Yersinia*. *Folia Microbiol*, 34:485-489.
- Rivadeneira, M.A., Pérez-García, I., y Ramos-Cormenzana, A. (1992a). Influence of Ammonium Ion on Bacterial Struvite Production. *Geomicrobiol. J.* 10; 125–137.
- Rivadeneira, M.A., Pérez-García, I., y Ramos-Cormenzana, A. (1992b). Struvite Precipitation by Soil and Fresh Water Bacteria. *Curr. Microbiol*, 24: 343–347.
- Rivadeneira M.A., Pérez-García, I., Calvo, C., Ramos-Cormenzana, A. (1993). The Effect of Incubation Temperature on Struvite Formation by Bacteria. *Folia Microbiol* 38(1): 5-9.
- Rivadeneira, M.A., Gutiérrez-Calderón, A., Rivadeneira, A.M., y Ramos-Cormenzana, A. (1999). A study of struvite precipitation and urease activity in bacteria isolated from patients with urinary infections and their possible involvement in the formation of renal calculi. *Urol Inter.* 63:188–192.
- Rivadeneira, M.A., Delgado, R., Parraga, J., Ramos-Cormenzana, A., y Delgado, G. (2006). Precipitation of minerals by 22 species of moderately halophilic bacteria in artificial marine salts media: influence of salt concentration. *Folia Microbiol.* 51:445–453.
- Rivadeneira. M.A., Martín-Algarra, A., Sánchez-Román, M., Sánchez-Navas, A., y Martín-Ramos, J.D. (2010). Amorphous Ca-phosphate precursors for Ca-carbonate biominerals mediated by *Chromohalobacter marismortui*. *The ISME Journal.* 4: 922–932.
- Rivadeneira, A., González-Martínez, A., González-López, J., Martín-Ramos, D., Martínez-Toledo, M.V., y Rivadeneira, M.A. (2014). Precipitation of phosphate minerals by microorganisms isolated from a fixed-biofilm reactor used for the treatment of domestic wastewater. *Int J Environ Res Public Health*, 11:3689–3704.
- Robinson, R.G., Dickie, A.S., Rose, T.F., y Stapleton, A.M.F. (1995). Struvite Renal Calculi Caused by *Corynebacterium* Group 02. *Ausr. N.Z. J. Surg.* 65; 294-295.
- Rodríguez-García, G., Frison, N., Vázquez-Padín, J.R., Hospido, A., Garrido, J.M., Fatone, F., Bolzonella, D., Moreira, M.T., y Feijoo, G. (2014). Life cycle assessment of nutrient removal technologies for the treatment of anaerobic digestion supernatant and its integration in a wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment.* 490: 871–879.

- Ronteltap, M., Maurer, M., y Gujer, W. (2007). The behaviour of pharmaceuticals and heavy metals during struvite precipitation in urine. *Water Research*, 41 (9), 1859–1868.
- Ronteltap, M., Maurer, M., Hausherr, R., y Gujer, W. (2010). Struvite precipitation from urine – Influencing factors on particle size. *Water Research*, 44: 2038 – 2046.
- Rottschaefer, B.L., Sax, M., Pletcher, J., y Braude, A.I. (1970). Transition of Amorphous Magnesium Ammonium Phosphate to a Crystalline State in Rat Urinary Calculi Induced by L-Forms of *Proteus mirabilis*. *Calc. Tiss. Res.*, 5: 80-84.
- Sadowski, R.R., Prywer, J., y Torzewska, A. (2014). Morphology of struvite crystals as an evidence of bacteria mediated growth. *Cryst. Res. Technol.* 49(7): 478–489.
- Sánchez-Navas A., Martín-Algarra, A., Rivadeneyra, M.A., Melchor, S., y Martín-Ramos, J.D. (2009). Crystal-growth behaviour in Ca-Mg carbonate bacterial spherulites. *Cryst Growth Des.* 9:2690–2699.
- Sánchez-Roman, M., Rivadeneyra, M.A., Vasconcelos, C., y McKenzie J.A. (2007). Biomineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 61:273–84.
- Sánchez-Román, M., Romanek, C.S., Fernández-Remolar, D.C., Sánchez-Navas, A., McKenzie, J.A., Pibernat, R.A., y Vasconcelos, C. (2011). Aerobic biomineralization of Mg-rich carbonates: Implications for natural environments. *Chemical Geology*, 281: 143–150.
- Schink B., Thiemann, V., Laue, H., y Friedrich M.W. (2002). *Desulfotignum phosphitoxidans* sp. nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes phosphite to phosphate. *Arch Microbiol*, 177: 381–391. DOI 10.1007/s00203-002-0402-x.
- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., y Strous, M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 481-492.
- Shimamura, K., Tanaka, T., Miura, Y., Ishikawa, H., (2003). Development of a high efficiency phosphorus recovery method using a fluidised-bed crystallized phosphorus removal system. *Water Science and Technology*, 48, 163–170.
- Shu, L., Schneider, P., Jegatheesan, V., y Johnson, J. (2006). An economic evaluation of phosphorus recovery as struvite from digester supernatant. *Bioresource Technology*, 97, 2211–2216.
- Singh Meena V., Kumari Meena S., Prakash Verma J., Kumar A., Aeron A., Kumar Mishra P., Kumar Bisht J., Pattanayak A., Naveed M., Dotaniyah M.L. (2017).

Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. *Ecological Engineering* 107, 8–32.

- Singha L.P., Kotoky R., Pandey P. (2017). Draft Genome Sequence of *Alcaligenes faecalis* BDB4, a Polyaromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium Isolated from Crude Oil-Contaminated Soil. *Genome Announc* 5:e01346-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01346-17>.
- Sinha, A., Singh, A., Kumar, S., Kumar Khare, S., y Ramanan, A. (2014). Microbial mineralization of struvite: A promising process to overcome phosphate sequestering crisis. *Water Research*. 54: 33-43.
- Smirnov A., Suzina, N., Chudinova, N., Kulakovskaya, T., y Kulaev, I. (2005). Formation of Insoluble Magnesium Phosphates during Growth of the Archaea *Halorubrum distributum* and *Halobacterium salinarum* and the Bacterium *Brevibacterium antiquum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52: 129–137.
- Soares, A., Veeram, M., Simoes, F., Wood, E., Parsons, S.A., y Stephenson, T. (2014). Bio-Struvite: A New Route to Recover Phosphorus from Wastewater. *Clean – Soil, Air, Water*. 42 (7): 994–997. DOI: 10.1002/clen.201300287.
- Soriano F., Ponte, C., Santamaria, M., Castilla, C., y Fernández Roblas, R. (1986). In Vitro and In Vivo Study of Stone Formation by *Corynebacterium* Group D2 (*Corynebacterium urealyticum*). *Journal of Clinical Microbiology*. 23(4): 691-694.
- Sridhar K.R., Ashwini, K.M., Seena, S., y Sreepada, K.S. (2006). Manure Qualities of Guano of Insectivorous Cave Bat *Hipposideros speoris*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* (6); 103-110.
- Stahlschmidt P., y Brühl C.A. (2012). Bats as bioindicators – the need of a standardized method for acoustic bat activity surveys. *Methods in Ecology and Evolution*. doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00188.x.
- Stickler D., Ganderton, L., King, J., Nettleton, J., y Winters, C. (1993). *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Urol Res*. 21:407-411.
- Stratful, I., Scrimshaw, M.D., y Lester, J.N. (2001). Conditions influencing the precipitation of magnesium ammonium phosphate. *Water Res*, 35:4191–4199
- Stroup, S.P., y Auge, B.K. (2011). Urinary Infection and Struvite Stones. En Rao, N.P., Preminger, G.M., y Kavanagh, J.P. (Eds.) *Urinary Tract Stone Disease* (pp. 217-224). Springer-Verlag London. DOI: 10.1007/978-1-84800-362-0.
- Sun J., Chen, L., Wang, X., Cao, S., Fu, W., y Zheng, W. (2012). Synthesis of Struvite Crystals by Using Bacteria *Proteus mirabilis*. *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.* 42, 445–448.

- Suzuki, K., Tanaka, Y., Osada, T., y Waki, M. (2002). Removal of phosphate, magnesium and calcium from swine wastewater through crystallization enhanced by aeration. *Water Res.*, 36 (12), 2991–2998.
- Suzuki, K., Tanaka, Y., Kuroda, K., Hanajima, D., Fukumoto, Y., Yasuda, T., y Waki, M. (2006). Removal and recovery of phosphorous from swine wastewater by demonstration crystallization reactor and struvite accumulation device. *Bioresource Technology.*, 98; 1573–1578.
- Tanskul S., Hiraga K., Takada K., Rungratchote S., Suntainalert P., y Oda K. (2009). An Alkaline Serine-Proteinase from a Bacterium Isolated From Bat Feces: Purification and Characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(11); 2393-2398.
- Tauch, A., Trost, E., Tilker, A., Ludewig, U., Schneiker, S., Goesmann, A., Arnold, W., Bekel, T., Brinkrolf, K., Brune, I., Götter, S., Kalinowski, J., Kamp, P.-B., Pereira Lobo, F., Viehoveer, P., Weisshaar, B., Soriano, F., Dröge, M., y Pühler, A. (2008). The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing. *Journal of Biotechnology*, 136: 11–21.
- Thangam E.B., Rajkumar G.S. (2002). Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35; 149–154.
- Tena D., Fernández C., Lago M.R. (2015). *Alcaligenes faecalis*: an Unusual Cause of Skin and Soft Tissue Infection. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 68; 128–130.
- Torzewska A., Staczek, P., y Rozalski, A. (2003). Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of Proteus endotoxin polysaccharides. *J Med Microbiol.* 52: 471–477.
- Udert, K.M., Larsen, T.A., Gujer, W., (2003)a. Biologically induced precipitation in urine-collecting systems. *Water Sci. Technol.: Water Supply* 3, 71–78.
- Udert, K.M., Larsen, T.A., y Gujer, W. (2003)b. Estimating the precipitation potential in urine-collecting systems. *Water Research.*, 37 (11), 2667–2677.
- Ueno, Y., y Fujii, M. (2001). Three years experience of operating and selling recovered struvite from full-scale plant. *Environ. Technol.*, 22: 1373–1381.
- Uludag-Demirer S., Demirer, G.N., Frear, C., y Chen, S. (2008). Anaerobic digestion of dairy manure with enhanced ammonia removal. *Journal of Environmental Management*, 86: 193–200.
- Uysal, A., Demir, S., Sayilgan, E., Eraslan, F., y Kucukyumuk, Z. (2014). Optimization of struvite fertilizer formation from baker's yeast wastewater: growth and nutrition of maize and tomato plants. *Environ Sci Pollut Res* (2014) 21:3264–3274. DOI 10.1007/s11356-013-2285-6.



- Vaidyanathan S., von Unruh, G.E., Watson, I.D., Laube, N., Willetts, S., y Soni, B.M. (2006). Hyperoxaluria, Hypocitraturia, Hypomagnesiuria, and Lack of Intestinal Colonization by *Oxalobacter formigenes* in a Cervical Spinal Cord Injury Patient with Suprapubic Cystostomy, Short Bowel, and Nephrolithiasis. *The Scientific World JOURNAL*, 6: 2403–2410. DOI 10.1100/tsw.2006.373.
- Valášková P., Baldrian P. (2009). Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. *PLANT SOIL ENVIRON*, 55 (10): 413–423.
- Vandžurová A., Piliš V., Bačkor P., Júdová J., Javorský P., Faix Š., Pristaš P. (2012). Microflora of the Bat Guano. *FOLIA VETERINARIA*. 56, 68—69.
- Vargas A., Galarza M. I., Aguirre L. F. (2006). Protocolo para el estudio de comunidades de murciélagos (Phyllostomidae). En Galarza M. I., L. F. Aguirre (eds). *Métodos Estandarizados para el Estudio de Murciélagos en Bosques Montanos*. Centro de Estudios en Biología Teórica y Aplicada. Cochabamba, Bolivia. 64pp
- Vogel T., Nelles, M., y Eichler-Löbermann, B. (2015). Phosphorus application with recycled products from municipal waste water to different crop species. *Ecological Engineering*, 83: 466–475.
- Wang, J., Burken, J.G., y Zhang, X. (2006a). Effect of seeding materials and mixing strength on struvite precipitation. *Water Environment Research*, 78 (2), 125–132.
- Wang, J.S., Song, Y.H., Yuan, P., Peng, J.F., y Fan, M.H. (2006b). Modeling the crystallization of magnesium ammonium phosphate for phosphorus recovery. *Chemosphere*, 65:1182–1187
- Wang, G., Wang, D., Xu, X., y Yang, F. (2013). Partial nitrifying granule stimulated by struvite carrier in treating pharmaceutical wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97:8757–8765. DOI 10.1007/s00253-012-4546-6.
- Wang X., Yu P., Zeng C., Ding H., Li Y., Wang C., Lu A. (2015). Enhanced *Alcaligenes faecalis* denitrification rate with electrodes as the electron donor. *Appl Environ Microbiol* 81:5387–5394. doi:10.1128/AEM.00683-15.
- Wang, H., Wang, X.-J., Wang, W.-S., Yan, X.-B., Xia, P., Chen, J., y Zhao, J.-F. (2016). Modeling and optimization of struvite recovery from wastewater and reusing for heavy metals immobilization in contaminated soil. DOI 10.1002/jctb.4931.
- Wesson J.A., y Ward M.D. (2007). Pathological Biomineralization of Kidney Stones. *Elements*. 3, 415–421.

- Whitaker, A., y Jeffery, J.W. (1970). The Crystal Structure of Struvite,  $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ . *Acta Cryst*, B26, 1429
- Williams, S. (1999). Struvite precipitation in sludge stream at Slough wastewater treatment plant and opportunities for phosphorus recovery. *Environ. Technol.*, 20, 743–747.
- Wilsenach, J.A., Schuurbiens, C.A.H., y van Loosdrecht, M.C.M. (2007) Phosphate and potassium recovery from source separated urine through struvite precipitation. *Water Res.*, 41: 458–466.
- Wu, Q.Z., y Bishop, P.L. (2004). Enhancing struvite crystallization from anaerobic supernatant. *J. Environ. Eng. Sci.* 3 (1), 21–29.
- Wu, Y., y Zhou, S. (2012). Improving the prediction of ammonium nitrogen removal through struvite precipitation. *Environ Sci Pollut Res.* 19:347–360. DOI 10.1007/s11356-011-0520-6.
- Ye, Z.L., Chen S.H., Wang, S.M., Lin, L.F., Yan, Y.J., Zhang, Z.J., y Chen, J.-S. (2010). Phosphorus recovery from synthetic swine wastewater by chemical precipitation using response surface methodology. *J Hazard Mater*, 176:1083–1088
- You, J., Greenman, J., Melhuisha, C., y Ieropoulos, I. (2015). Electricity generation and struvite recovery from human urine using microbial fuel cells. *J Chem Technol Biotechnol*. DOI 10.1002/jctb.4617.
- Yuan Z., Pratt, S., y Batstone, D.J. (2012). Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 23:878–883.
- Zammit, G., Sánchez-Moral, S., y Albertano, P. (2011). Bacterially mediated mineralisation processes lead to biodeterioration of artworks in Maltese catacombs. *Science of the Total Environment* 409: 2773–2782.
- Zhang, W., y Lau, A. (2007). Reducing ammonia emission from poultry manure composting via struvite formation. *J Chem Technol Biotechnol*, 82:598–602.
- Zhang, D.-M., Chen, Y.-X., Jilani, G., Wua, W.-X., Liu, W.-L., y Han, Z.-Y. (2012). Optimization of struvite crystallization protocol for pretreating the swine wastewater and its impact on subsequent anaerobic biodegradation of pollutants. *Bioresource Technology*, 116; 386–395.
- Zhang Y.-B., Zhou J., Xu Q.-M., Cheng J.-S., Luo Y.-L., Yuan Y.-J. (2016). Exogenous cofactors for the improvement of bioremoval and biotransformation of sulfamethoxazole by *Alcaligenes faecalis*. *Science of the Total Environment* 565; 547–556.

Zhao B., An Q., He Y.H., Guo J.S. (2012). N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR. *Bioresource Technology* 116; 379–385.

Zhu, H., Sun, X., Lu, J., Wang, M., Fang, Y., y Ge, W. (2012). The effect of plum juice on the prevention of struvite calculus formation in vitro. *BJU International*. 110; 362–367 doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11090.x.

## **12. ANEXOS**

### **12.1 REACTIVOS Y SOLUCIONES**

#### **12.1.1 Solución cristal violeta**

*a) Solución stock (A);*

Se disolvió 10g de cristal violeta (85%) en 100 ml de etanol (95%) y se almaceno a temperatura ambiente por dos semanas.

*b) Solución de oxalato (B);*

Se disolvió 1g de oxalato de amonio 100 ml de agua destilada y se almaceno a temperatura ambiente por dos semanas.

*c) Solución de trabajo;*

Se combinaron las soluciones A y B en iguales proporciones y se almaceno la mezcla protegida de la luz por dos semanas.

#### **12.1.2 Solución Decolorante**

Se mezclaron proporciones iguales de etanol al 95% y acetona, almacenándose en un frasco de vidrio a temperatura ambiente.

#### **12.1.3 Solución de Safranina**

Se mezclaron 0,25 g de Safranina (90%) en 100 ml de etanol al 95%, almacenándose en un frasco de vidrio a temperatura ambiente.

#### 12.1.4 Buffer TSE

Tris base 25 mM, EDTA 2,5 mM y Sucrosa 0,3 M

#### 12.1.5 Solución de Lisozima

20 mg de Lisozima (Lysozyme from chicken egg white, EC: 3.2.1.17, SIGMA-ALDRICH), fueron disueltos en 1 ml de agua tridestilada.

#### 12.1.6 Solución de Lisis

Tris base 50 mM, EDTA 5 mM y SDS 3%

#### 12.1.7 Solución Tris-HCl

A una solución Tris base 2 M se le agregó HCl hasta ajustar el pH a 7

#### 12.1.8 Solución salina

NaCl 5 M

#### 12.1.9 Buffer Tris-HCl

A una solución Tris base 0,05 M se le agregó HCl hasta ajustar el pH a 8,5

#### 12.1.10 NaOH 5 M

20 g de NaOH fueron diluidos en 40 ml de agua destilada para luego aforar a 100 ml.

### 12.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS y FISIOLÓGICAS DE LAS CEPAS AISLADAS

N°	Cepa	Forma	Borde	Color	Aspecto	Act. Ureasa	h/Act. Ureasa*
1	GM01	Redondeada	Liso	Amarillo	Opaco	Positiva	18
2	GM02	Redondeada	Liso	Sin Color	Transparente	Positiva	3
3	GM03	Irregular	Dentado	Marron	Opaco	Negativa	
4	GM04	Redondeada	Liso	Sin Color	Transparente	Negativa	
5	GM05	Redondeada	Liso	Blanca	Opaco	Negativa	
6	GM06	Irregular	Digitado	Marron	Opaco	Negativa	

7	GM07	Redondeada	Liso	Sin Color	Transparente	Negativa	
8	GM08	Redondeada	Liso	Amarillo	Opaco	Positiva	3
9	GM09	Redondeada	Irregular	Marron	Opaco	Negativa	
10	GM10	Redondeada	Liso	Marron	Opaco	Positiva	48
11	GM11	Redondeada	Irregular	Sin Color	Transparente	Positiva	18
12	GM12	Irregular	Liso	Amarillo	Opaco	Negativa	
13	GM13	Redondeada	Irregular	Rosada	Opaco	Positiva	18
14	GM14	Ramificada	Irregular	Sin Color	Transparente	Positiva	18
15	GD01	Irregular	Liso	Blanca	Opaco	Negativa	
16	GD02	Irregular	Irregular	Sin Color	Transparente	Negativa	
17	GD03	Irregular	Liso	Marron	Opaco	Positiva	24
18	GD04	Redondeada	Irregular	Amarillo	Opaco	Positiva	18
19	GD05	Irregular	Irregular	Rosada	Opaco	Positiva	24
20	GD06	Redondeada	Liso	Blanca	Opaco	Positiva	24
21	GD07	Irregular	Liso	Rosada	Opaco	Negativa	
22	GD08	Redondeada	Liso	Blanca	Opaco	Negativa	
23	GD09	Ramificada	Irregular	Blanca	Opaco	Positiva	24
24	GD10	Irregular	Liso	Rosada	Opaco	Negativa	
25	GD11	Irregular	Irregular	Sin Color	Transparente	Positiva	24
26	GD12	Redondeada	Irregular	Amarillo	Opaco	Negativa	
27	GD13	Redondeada	Irregular	Amarillo	Opaco	Negativa	
28	GD14	Redondeada	Liso	Blanca	Opaco	Negativa	
29	GD15	Irregular	Dentado	Amarillo	Opaco	Negativa	
30	GD16	Irregular	Liso	Blanca	Opaco	Negativa	
31	GD17	Redondeada	Liso	Blanca	Opaco	Positiva	24

32	GD18	Irregular	Irregular	Sin Color	Transparente	Negativa
----	------	-----------	-----------	-----------	--------------	----------

\*tiempo en horas al que se detectó Actividad enzimática

### 12.3 OPCIONES DISEÑO CENTRAL COMPUESTO PARA OPTIMIZAR EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIO-ESTRUVITA.

>ccd.pick(2, n.c = c(4, 8), blks.c = c(1, 2), wbr.s = 1:2, restrict = "N<=60")

	n.c	n0.c	blks.c	n.s	n0.s	bbr.c	wbr.s	bbr.s	N	alpha.rot	alpha.orth
1	4	1	1	4	1	1	1	1	10	1.414214	1.414214
2	4	2	1	4	2	1	1	1	12	1.414214	1.414214
3	4	3	1	4	3	1	1	1	14	1.414214	1.414214
4	4	4	1	4	4	1	1	1	16	1.414214	1.414214
5	4	5	1	4	5	1	1	1	18	1.414214	1.414214
6	8	1	1	8	1	1	2	1	18	1.414214	1.414214
7	4	6	1	4	6	1	1	1	20	1.414214	1.414214
8	8	2	1	8	2	1	2	1	20	1.414214	1.414214
9	4	1	2	8	2	1	2	1	20	1.414214	1.414214
10	4	7	1	4	7	1	1	1	22	1.414214	1.414214

### 12.4 MODELO DE PRIMER ORDEN USANDO MgCl<sub>2</sub> COMO FUENTE DE MAGNESIO

Call:

rsm(formula = Bio.est.g.L ~ F0(x1, x2), data = BS)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	1.832286	0.051479	35.5926	1.035e-12 ***
x1	0.066010	0.068444	0.9644	0.3555
x2	-0.061439	0.068444	-0.8977	0.3886

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.1363, Adjusted R-squared: -0.02073

F-statistic: 0.868 on 2 and 11 DF, p-value: 0.4467

Analysis of Variance Table

Response: Bio.est.g.L

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
F0(x1, x2)	2	0.06441	0.032203	0.8680	0.44667
Residuals	11	0.40812	0.037102		
Lack of fit	6	0.37565	0.062609	9.6418	0.01251
Pure error	5	0.03247	0.006493		

Direction of steepest ascent (at radius 1):

x1 x2  
0.7319951 -0.6813099

Corresponding increment in original units:

Mg Temperatura  
0.09149939 -3.40654949

### 12.5 MODELO DE SEGUNDO ORDEN USANDO MgCl<sub>2</sub> COMO FUENTE DE MAGNESIO

Call:

rsm(formula = Bio.est.g.L ~ Block + S0(x1, x2), data = BS)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	2.005516	0.037755	53.1188	2.196e-10 ***
BlockB2	0.020013	0.041196	0.4858	0.6419503
x1	0.066010	0.027384	2.4106	0.0467355 *
x2	-0.061439	0.027384	-2.2436	0.0597555 .
x1:x2	0.014750	0.038532	0.3828	0.7132297
x1^2	-0.188864	0.028780	-6.5624	0.0003152 ***
x2^2	-0.135038	0.028780	-4.6921	0.0022291 **

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Multiple R-squared: 0.912, Adjusted R-squared: 0.8366

F-statistic: 12.09 on 6 and 7 DF, p-value: 0.00217

Analysis of Variance Table

Response: Bio.est.g.L

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Block	1	0.00197	0.001968	0.3314	0.5828498
F0(x1, x2)	2	0.06441	0.032203	5.4224	0.0378056
TWI(x1, x2)	1	0.00087	0.000870	0.1465	0.7132297
PQ(x1, x2)	2	0.36371	0.181855	30.6206	0.0003457
Residuals	7	0.04157	0.005939		
Lack of fit	3	0.00956	0.003185	0.3980	0.7624847
Pure error	4	0.03202	0.008004		

Stationary point of response surface:

x1	x2
0.1662264	-0.2184110

Stationary point in original units:

Mg Temperatura
0.5207783 23.9079449

Eigenanalysis:

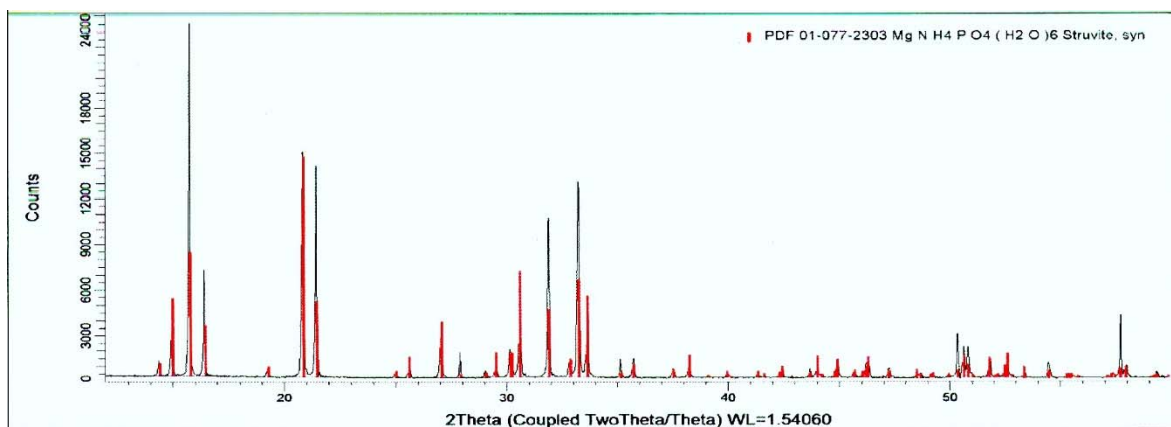
\$values  
[1] -0.1340458 -0.1898567

\$vectors

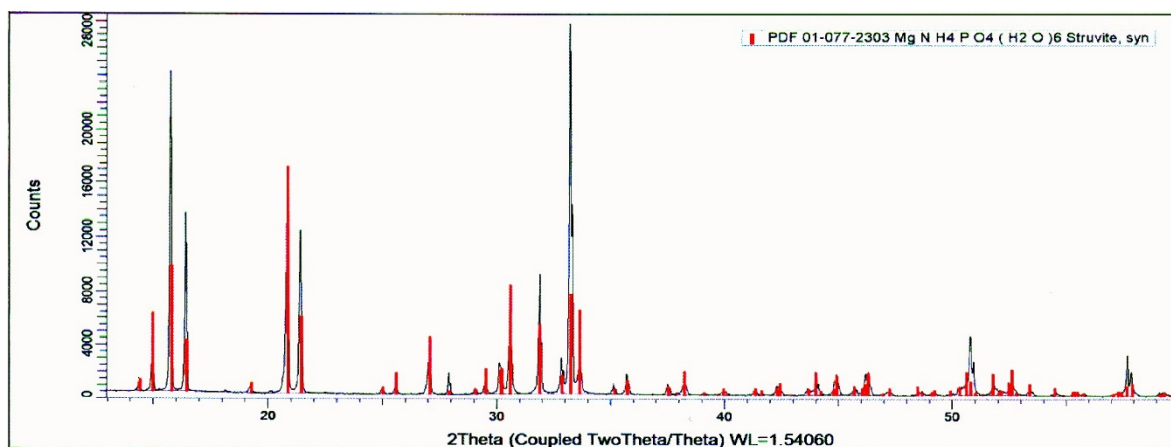
	[, 1]	[, 2]
x1	-0.1333331	-0.9910713
x2	-0.9910713	0.1333331

## 12.6 PATRONES DE DIFRACCIÓN XRD

### 12.6.1 Patrón de difracción de XRD de los cristales de Bio-estruvita producidos por la OTU GM 9 en Medio sintético.

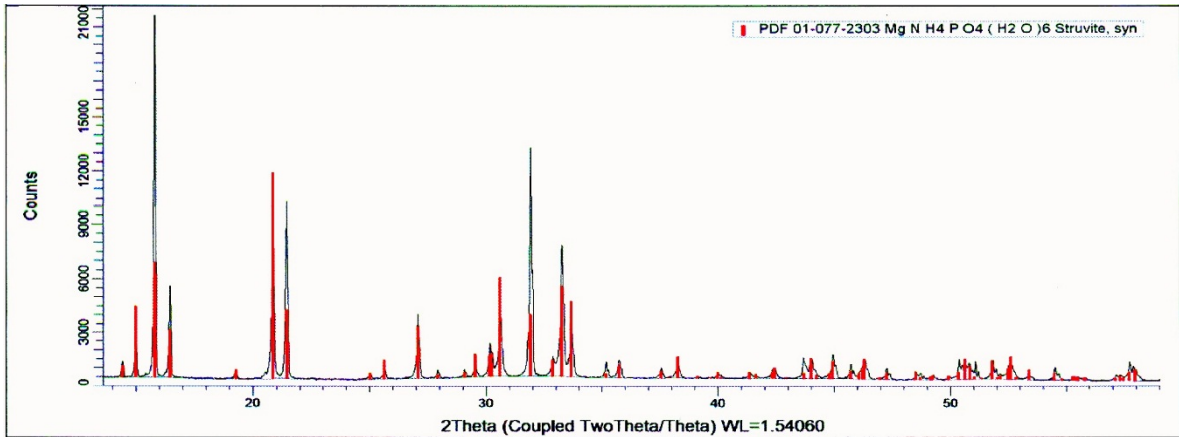


**12.6.2 Patrón de difracción de XRD de los cristales de Bio-estruvita producidos por la OTU GMD 27 en Medio sintético.**

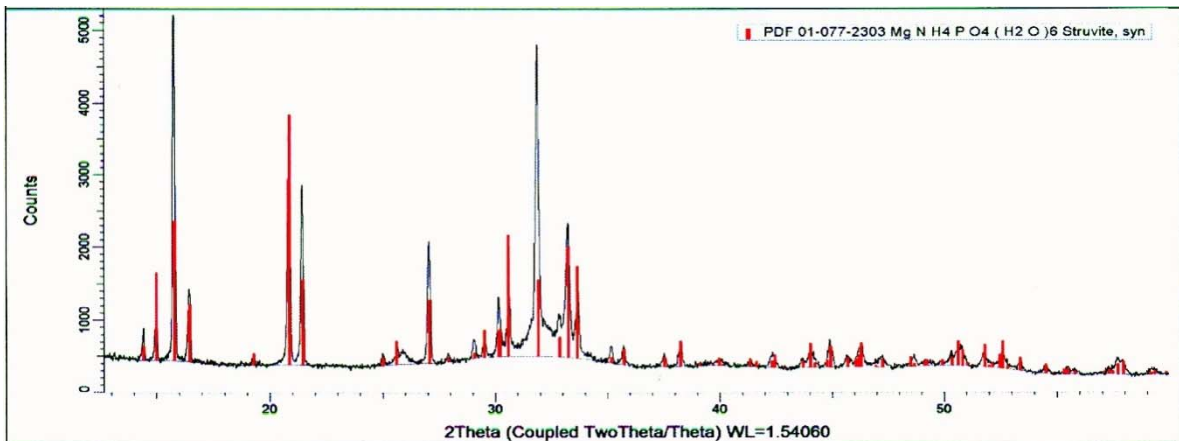


**12.6.3 Patrón de difracción de XRD de los cristales de Bio-estruvita producidos por la OTU GMD 16 en Medio sintético.**

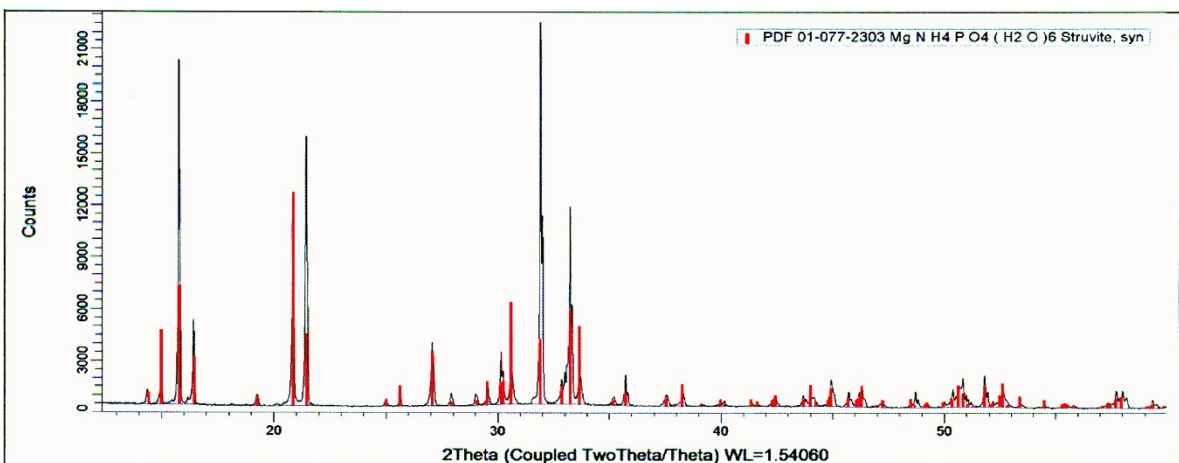




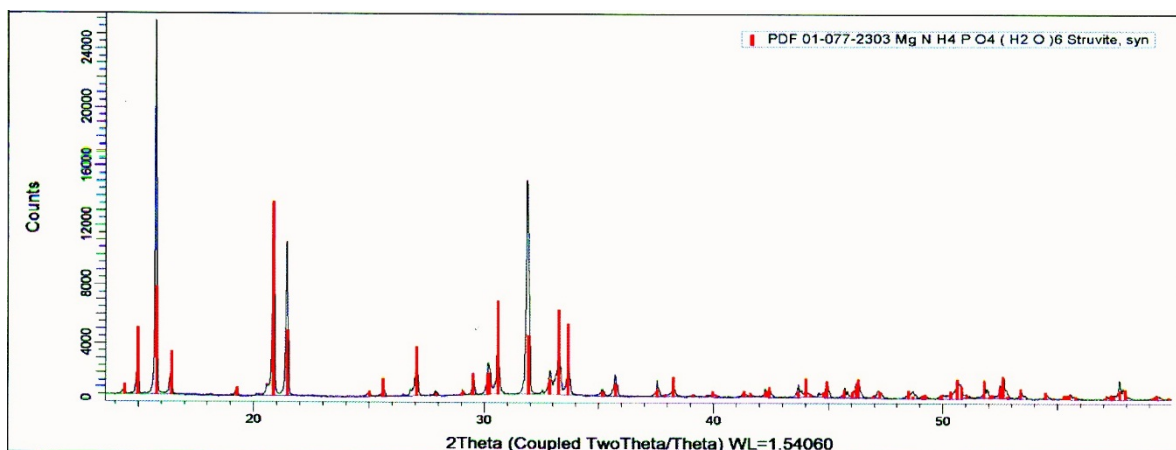
**12.6.4 Patrón de difracción de XRD de los cristales de Bio-estruvita producidos por la OTU GMD 13 en Orina Artificial.**



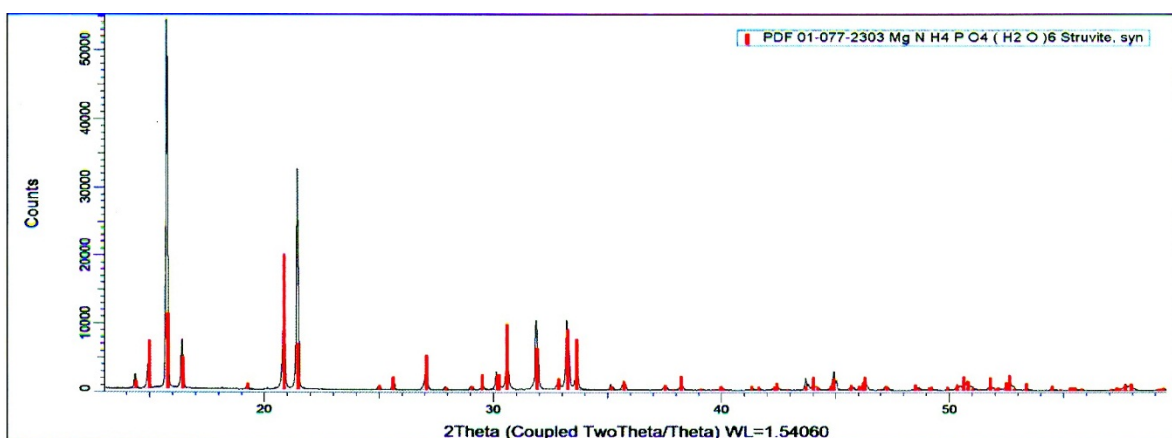
**12.6.5 Patrón de difracción de XRD de los cristales de Bio-estruvita producidos por la OTU GD 11 en Orina.**



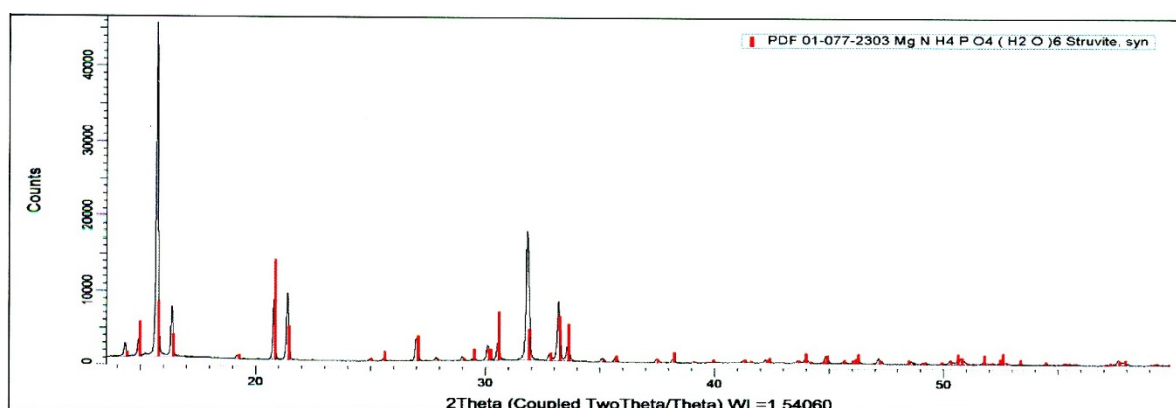
**12.6.6 Patrón de difracción de XRD de los cristales de Bio-estruvita producidos por la OTU GMD 14 en Medio Sintético.**



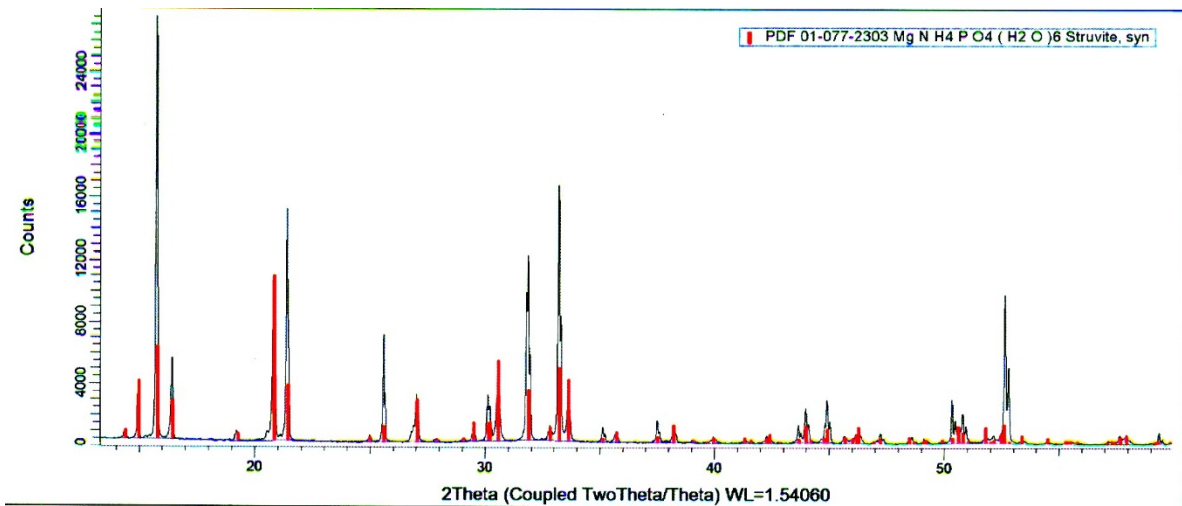
**12.6.7 Patrón de difracción de XRD de los cristales de Bio-estruvita producidos por la OTU GMD 15 en Orina.**



**12.6.8 Patrón de difracción de XRD de los cristales de Bio-estruvita producidos por la OTU GM 18 en Orina.**

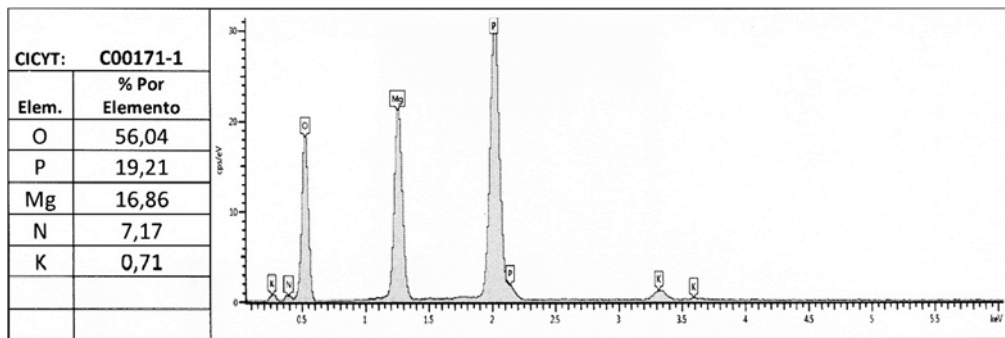


**12.6.9 Patrón de difracción de XRD de los cristales de Bio-estruvita producidos por la OTU GMD 13 en Orina.**

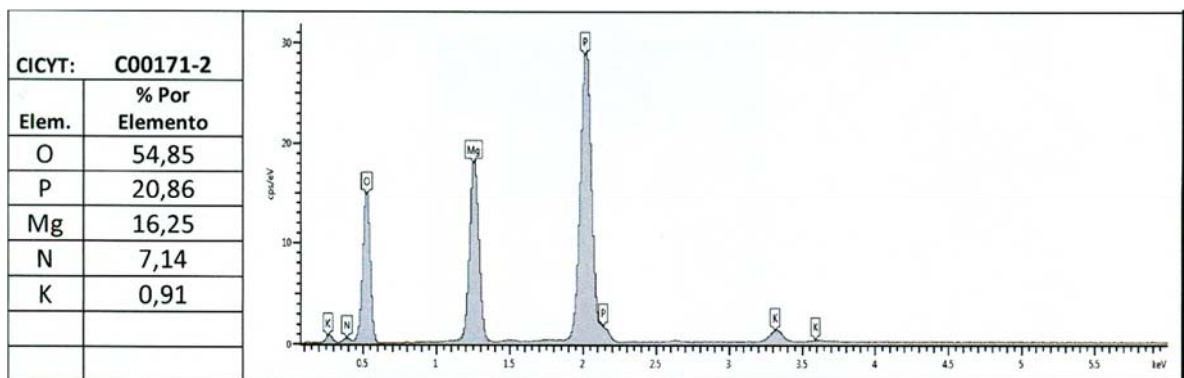


## 12.7 RESULTADOS DEL ANÁLISIS SEM-EDS

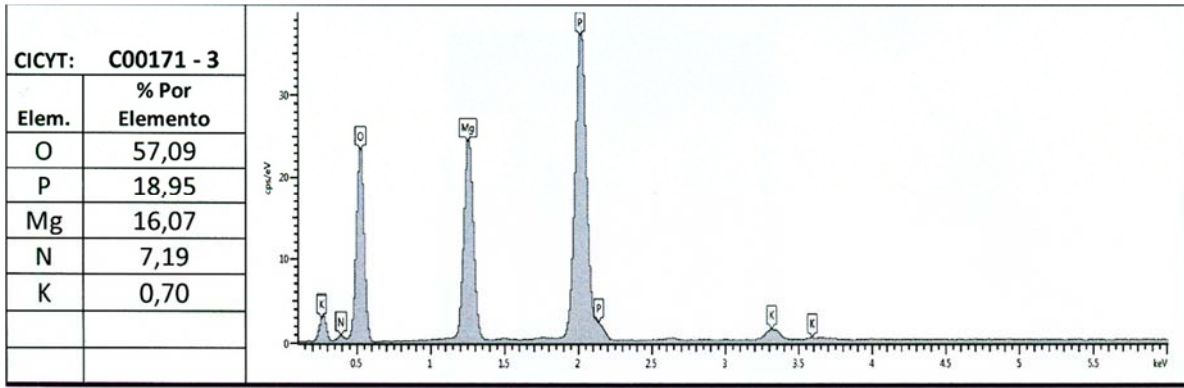
### 12.7.1 Composición de los cristales de Bio-estruvita formado por la OTU GM 9 en Medio Sintético.



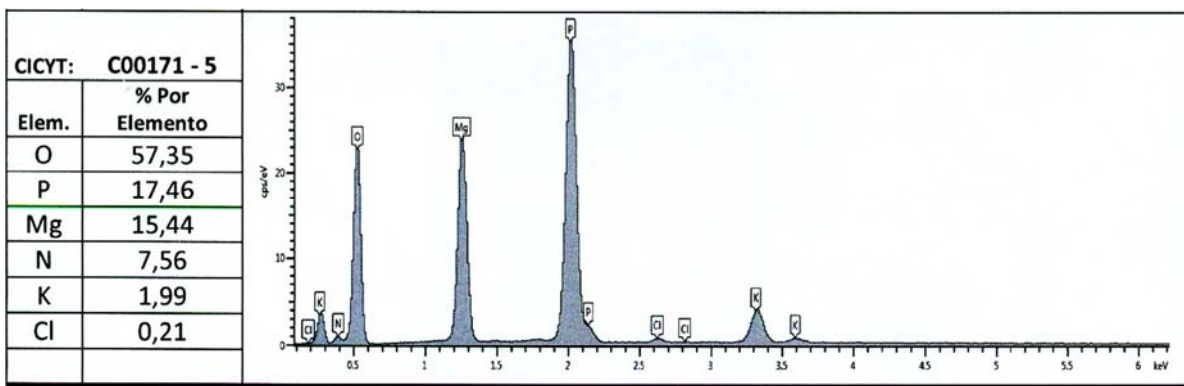
### 12.7.2 Composición de los cristales de Bio-estruvita formado por la OTU GMD 27 en Medio Sintético.



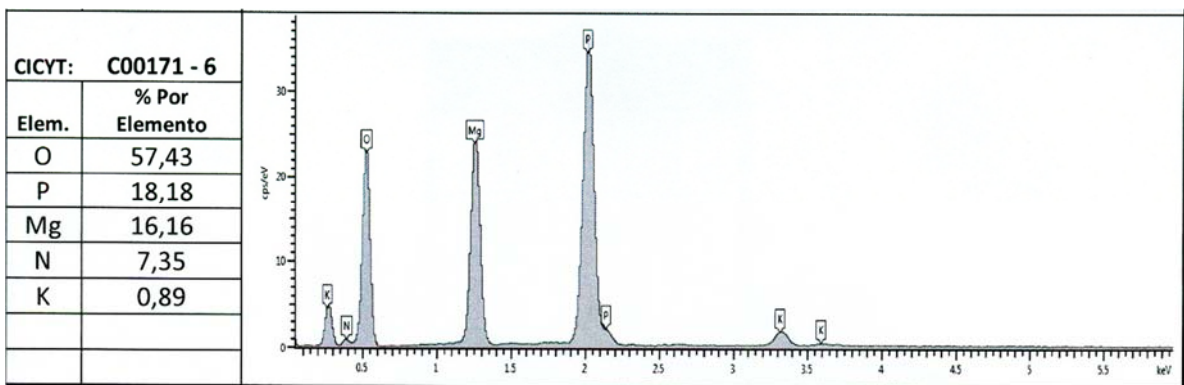
### 12.7.3 Composición de los cristales de Bio-estruvita formado por la OTU GMD 16 en Medio Sintético.



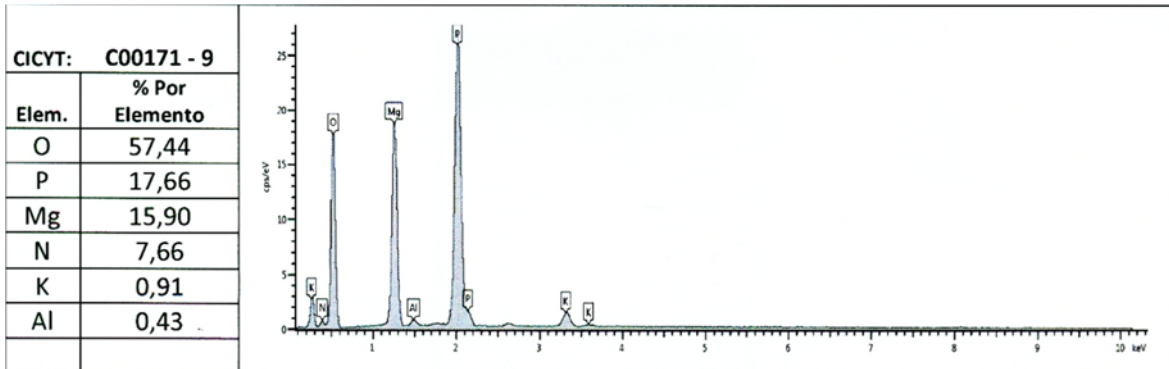
**12.7.4 Composición de los cristales de Bio-estruvita formado por la OTU GD 11 en Orina.**



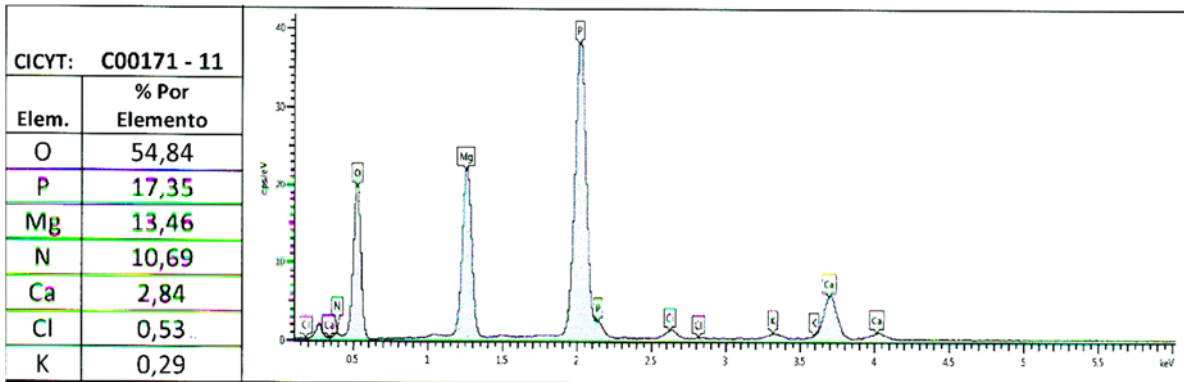
**12.7.5 Composición de los cristales de Bio-estruvita formado por la OTU GMD 14 en Medio Sintético.**



**12.7.6 Composición de los cristales de Bio-estruvita formado por la OTU GMD 15 en Medio Sintético.**



**12.7.7 Composición de los cristales de Bio-estruvita formado por la OTU GMD 18 en Orina.**



**12.7.8 Composición de los cristales de Bio-estruvita formado por la OTU GMD 13 en Orina.**