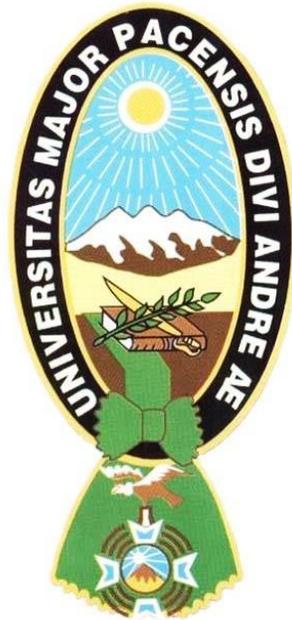


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS
“LUIS ENRIQUE TERRAZAS SILES”



**PRODUCCIÓN DE ESTRUVITA MEDIANTE UN PROCESO
BIOLÓGICO BASADO EN LA RECUPERACIÓN DE
FÓSFORO Y NITRÓGENO DEL SUERO LÁCTEO Y
MAGNESIO DE BISCHOFITA**

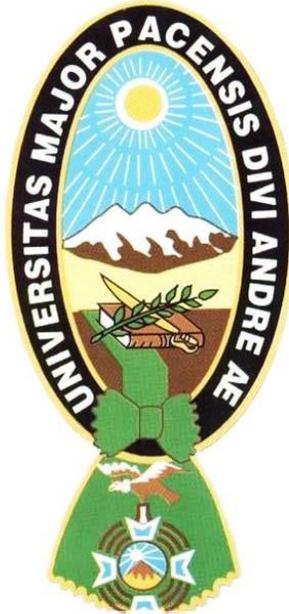
(Tesis presentada para obtener el grado de *Magister Scientiarum* en Ciencias Biológicas
y Biomédicas, Mención Biotecnología)

Elaborado por: Lic. Virginia Rigoberta Gonzales Mamani

LA PAZ - BOLIVIA

2021

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS
“LUIS ENRIQUE TERRAZAS SILES”



**PRODUCCIÓN DE ESTRUVITA MEDIANTE UN PROCESO
BIOLÓGICO BASADO EN LA RECUPERACIÓN DE
FÓSFORO Y NITRÓGENO DEL SUERO LÁCTEO Y
MAGNESIO DE BISCHOFITA**

(Tesis presentada para obtener el grado de *Magister Scientiarum* en Ciencias Biológicas
y Biomédicas, Mención Biotecnología)

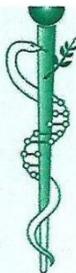
Elaborado por: Lic. Virginia Rigoberta Gonzales Mamani

Tutor(es): María Teresa Álvarez Aliaga PhD.

Carla Fabiana Crespo Melgar PhD.

LA PAZ - BOLIVIA

2021



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS

MENCIÓN: BIOTECNOLOGÍA

UNIDADES ACADÉMICAS PARTICIPANTES:

INSTITUTO DE GENÉTICA
Facultad de Medicina

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA PARASITARIA
Departamento de Patología
Facultad de Medicina

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUÍMICAS
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
Facultad de Ciencias Exactas

UNIDADES DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT IRD - FRANCIA

Fecha: Argentina, ...14 de mayo de 2021
Institución: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
Título del Tema: Producción de Estruvita Mediante un proceso Biológico Basado en la Recuperación de Fósforo y Nitrógeno del Suero Lácteo y Magnesio de Bischofita
Postulante: Lic. Virginia Rigoberta Gonzales Mamani
Tutor: María Teresa Álvarez Aliaga Ph. D.
Carla Fabiana Crespo Melgar Ph. D.
Revisor: Paulina Laura Páez Ph. D.
Institución: UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Córdoba - Argentina

Nº	CALIFICACIÓN SOBRE EL 100% EN BASE A:	PORCENTAJE	CALIFICACIÓN
1	Presentación de Resultados y Proyectos de Trabajo	30%	30%
2	Revisión Bibliográfica	25%	25%
3	Protocolo de Investigación	20%	20%
4	Claridad del documento presentado	15%	15%
5	Cumplimiento de hipótesis y objetivos	10%	10%
TOTAL		100%	100%

Comentarios: La tesis de la Lic. Gonzales Mamani plantea la producción de estruvita mediante un proceso biológico como alternativa al proceso de obtención químicos. Este enfoque no sólo es muy original sino que va en línea con el desarrollo de procesos biotecnológicos amigables con el medio ambiente lo que también resulta su impacto en el área. Los objetivos se cumplieron de manera exitosa.

NOTA.- La calificación mínima de aprobación es de 60%

FIRMA REVISOR

POSTGRADO: Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Dirección: Av. Saavedra N° 2224 - Piso 4 - Teléfonos: 2612420 - Fax: 2243320 Cs. Farm. y Bioq.
E-mail: maebiobio@hotmail.com - Casilla N° 3239 - La Paz - Bolivia (Sud América)



Córdoba, 14 de abril del 2021

MENCIÓN BIOTECNOLOGÍA

Fecha:
Institución: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
Título del Tema: **Producción de Estruvita Mediante un Proceso Biológico basado en la Recuperación de Fósforo y Nitrógeno del Suero Lácteo y Magnesio de Bischofita**
Postulante: Lic. Virginia Rigoberta Gonzales Mamani
Tutor: María Teresa Álvarez Aliaga Ph. D.
Carla Fabiana Crespo Melgar Ph. D.
Revisor: Prof. Dra. María Gabriela Paraje
Institución: Facultad de Ciencias Exactas,
Físicas y Naturales , Universidad
Nacional de Córdoba

Instituto Multidisciplinario de
Biología Vegetal (IMBIV), Consejo
Nacional de Investigaciones
Científicas y Tecnológicas
(CONICET)

Nº	CALIFICACIÓN SOBRE EL 100% CON BASE EN:	PORCENT AJE	CALIFICACI ÓN
1	Presentación de Resultados y Proyectos del Trabajo	30%	27
2	Revisión Bibliográfica	25%	25
3	Protocolo de Investigación	20%	20
4	Claridad del documento presentado	15%	13
5	Cumplimiento de hipótesis y objetivos	10%	10
TOTAL		100%	95

Comentarios:

Presentación de Resultados y Proyectos del Trabajo

Los antecedentes teóricos y empíricos expuestos son sólidos y exhaustivos. La bibliografía básica en esta sección es pertinente.

Se indica se corrijan algunos párrafos. El género va completo sólo la primera vez y abreviado a continuación. La especie de los microorganismos debe ir en *cursiva* siempre. Se solicita aclarar la primera vez las abreviaturas, independiente del resumen y respetar la misma en todo el manuscrito, este error se repite frecuentemente. Se recomienda se corrijan los errores detallados en el manuscrito.

Protocolo de Investigación

La metodología realizada es pertinente, siendo de vanguardia en algunos ensayos (*gold standard*). Sin embargo, a mi criterio en esta sección, algo fundamental es la calidad, pertinencia y actualización de la bibliografía utilizada. Esto le otorga solidez, robustez y credibilidad científica a cada ensayo y metodología presentada (porque es raro que sea la primera vez que se usan). Se deben citar autores que lo realizaron y publicaron previamente. Si son citas viejas deben ser complementadas con algunas más nuevas que demuestren su vigencia. Citas propias y previas del equipo de trabajo son muy importantes ya que demuestran experiencia en el manejo de la/s técnica/s. Si se indica que se siguieron instrucciones del fabricante se debe complementar con la/s cita/s correspondiente o publicaciones que lo hayan realizado.

Esto es el mayor problema que le veo a esta sección, es que si bien tiene citas, considero que son muy escasas y en ocasiones desactualizadas. Recomiendo que se complementen las metodologías con referencias, propias y de otros investigadores.

Claridad del documento presentado

La organización de los contenidos, calidad de los dibujos y fotografías, los esquemas, gráficos y tablas son apropiados.

Los resultados están bien analizados, con un correcto análisis estadístico correspondiente.

Las figuras se consideran correctas e ilustrativas de los distintos experimentos

realizados.

Revisión bibliográfica

A lo antes mencionado, se agrega que las referencias deben seguir normas internacionales de citas para manuscritos biomédicos o normas internacionales, y respetarla en todo el manuscrito. Algunas tienen un tipo de información o estilo diferente, se deben unificar. Hay citas incompletas. Los nombres de los microorganismos se escriben siempre en cursiva.

Cumplimiento de hipótesis y objetivos

A criterio de este evaluador, la investigación realizada en esta tesis para obtener el grado de *Magister Scientiarum* en Ciencias Biológicas y Biomédicas, Mención Biotecnología contribuirá al avance del conocimiento científico- tecnológico aplicado en su área disciplinar, con un importante impacto local y regional. Se han realizado importantes aportes para la producción de estruvita mediante un proceso biológico basado en la recuperación de fósforo y nitrógeno del suero lácteo y magnesio bischofita..

Se proyectan su utilidad en estudios futuros dirigidos a de utilizar el suero residual proveniente de la industria lechera y la bischofita mineral subproducto del procesamiento de litio para producir bioestruvita como una alternativa de fertilizante de liberación lenta de nutrientes, útil para una variedad de cultivos y suelos ácidos. En ese sentido, la producción de estruvita representaría una alternativa novedosa en Bolivia para reducir la contaminación en cuerpos de agua y obtener un producto que beneficie al sector agrícola. Los resultados obtenidos son de interés en la microbiología ambiental con potencialidad de ser patentables.

Por lo antes expuesto se le asigna a este trabajo de Tesis una calificación del 95% y se recomienda correcciones menores para que sean incorporadas al manuscrito al momento de la defensa oral.

NOTA.- La calificación mínima de aprobación es 61%



Dra. M. GABRIELA PARAJE
Profesora Titular
Fac. Ciencias Exactas
Físicas y Naturales - UNC

Prof. Dra. María Gabriela Paraje
Profesora
Titular Cátedra de
Microbiología
Departamento de
Fisiología
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de
Córdoba Investigadora
del CONICET
Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal
(IMBIV) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y
Tecnológicas (CONICET)



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS

UNIDADES ACADÉMICAS
PARTICIPANTES:

INSTITUTO DE GENÉTICA
Facultad de Medicina

LABORATORIO
DE INMUNOLOGÍA
PARASITARIA
Departamento de Patología
Facultad de Medicina

INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
FARMACO BIOQUÍMICAS
Facultad de Ciencias
Farmacéuticas y Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA
Facultad de Ciencias Exactas

UNIDADES DE
INVESTIGACION DEL
INSTITUT DE RECHERCHE
POUR LE DÉVELOPPEMENT
IRD - FRANCIA

MENCIÓN BIOTECNOLOGÍA

Fecha: México, 1 de abril de 2021
Institución: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
Título del Tema: Producción de Estruvita Mediante un Proceso Biológico basado en la Recuperación de Fósforo y Nitrógeno del Suero Lácteo y Magnesio de Bischoffita
Postulante: Lic. Virginia Rigoberta Gonzales Mamani
Tutor: María Teresa Álvarez Aliaga Ph. D.
Carla Fabiana Crespo Melgar Ph. D.
Revisor: Densy Malena Pelaez Pacheco Ph.D.
Institución: UNIVERSIDAD ANAHUAC CANCÚN, México

Nº	CALIFICACIÓN SOBRE EL 100% CON BASE EN:	PORCENTAJE	CALIFICACIÓN
1	Presentación de Resultados y Proyectos del Trabajo	30%	27%
2	Revisión Bibliográfica	25%	25%
3	Protocolo de Investigación	20%	19%
4	Claridad del documento presentado	15%	15%
5	Cumplimiento de hipótesis y objetivos	10%	10%
TOTAL		100%	96%

Comentarios:

La investigación cumplió cabalmente con los objetivos planteados, siguiendo un protocolo de investigación metódico, lo que conllevó a la presentación de resultados completos y con una proyección muy importante para el desarrollo de la industria biotecnológica de una manera sostenible; se deben revisar algunos aspectos de ortografía, una designación de especie para el estudio molecular y tomar en cuenta aspectos más amplios para el análisis de costo de producción.

Felicitaciones por la propuesta de la tecnología de producción y por la claridad del documento presentado.

NOTA.- La calificación mínima de aprobación es 61%

FIRMA DEL REVISOR

POSTGRADO: Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Dirección: Av. Saavedra N° 2224 - Piso 4 - Teléfonos: 2612420 - Fax: 2243320 Cs. Farm. y Bioq.
E-mail: maebiobio@hotmail.com - Casilla N° 3239 - La Paz - Bolivia (Sud América)

INFORME DE CORRECCIONES

DE: Lic. Virginia Rigoberta Gonzales Mamani
PARA: Revisores externos
ASUNTO: Informe de correcciones realizadas a partir de las observaciones presentadas por el tribunal de revisores externos
FECHA: 18 de junio de 2021

Tengo el agrado de dirigirme al tribunal a fin de saludarlos cordialmente, y a la vez, presentarles una síntesis sobre las correcciones hechas a partir de las observaciones a la tesis titulada “PRODUCCIÓN DE ESTRUVITA MEDIANTE UN PROCESO BIOLÓGICO BASADO EN LA RECUPERACIÓN DE FÓSFORO Y NITRÓGENO DEL SUERO LÁCTEO Y MAGNESIO DE BISCHOFITA”, realizada por mi persona.

A continuación, se presenta la descripción de las correcciones por revisor:

- REVISOR 1 (Densy Malena Peláez Pacheco Ph.D.)

Se procedió a revisar y mejorar aspectos de la ortografía en todo el documento, la designación de la especie para el estudio molecular identificada como *Chryseobacterium sp.* fue aclarada y por último punto a sugerencia de la revisora se tomaron en cuenta todos aspectos posibles para realizar el análisis financiero.

- REVISOR 2 (María Gabriela Paraje Ph.D.)

Se procedió a corregir todas las abreviaturas en el manuscrito. En cuanto al protocolo de investigación se complementó y añadió citas bibliográficas actualizadas que demuestran la vigencia de los métodos descritos, además se añadió la cita bibliográfica correspondiente a los métodos en los que se siguieron instrucciones del fabricante. En cuanto a la bibliografía, se unifico el estilo y se completó el formato de las citas bibliográficas

Sin otro particular, me despido de ustedes con las consideraciones más distinguidas.

Atentamente:

Virginia Rigoberta Gonzales Mamani
C.I. 9070735 L.P.

La Paz, 14 de junio de 2021

Señora:

Celeste del Pilar Rodríguez Quevedo Ph.D.

COORDINADORA ai. DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS

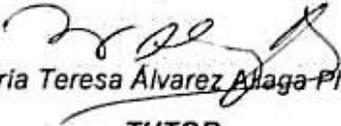
Presente

Distinguida Doctora,

A tiempo de saludarla atentamente, informamos a su autoridad mediante la presente que la Lic. Virginia Rigoberta Gonzales Mamani ha concluido de manera suficiente la parte experimental y ya cuenta con las tres revisiones del documento de tesis titulado "PRODUCCIÓN DE ESTRUVITA MEDIANTE UN PROCESO BIOLÓGICO BASADO EN LA RECUPERACIÓN DE FÓSFORO Y NITRÓGENO DEL SUERO LÁCTEO Y MAGNESIO DE BISCHOFITA". Por lo expuesto, solicitamos la defensa oral de la tesis.

Sin otro particular, nos despedimos con las consideraciones más distinguidas.

Atentamente:


María Teresa Álvarez Alaga Ph.D.
TUTOR


Carla Fabiana Crespo Melgar Ph.D.
TUTOR

DEDICATORIA

A Dios por cuidarme y acompañarme en todo momento.

*A mi familia por toda su confianza, apoyo incondicional
y comprensión, son lo más importante en mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a Dios, quien fue mi guía, protector, apoyo y fortaleza siempre. En cada paso y todas las etapas de mi vida ha estado presente, cuidándome de todo peligro, guiándome por el camino correcto y ayudándome a crecer como persona. Gracias a Dios pude lograr una más de mis metas profesionales.

A mi familia, por permitirme construir libremente mi camino; su amor, apoyo incondicional y confianza fue mi motor de cada día. A mi padre que cada mañana estaba presente para despedirme y darme ánimos. A mi madre, la mujer más valerosa y fuerte, por todo su esfuerzo y paciencia. Agradezco a mis hermanos por su comprensión y apoyo en todo lo que necesitaba durante estos años.

A mis queridas tutoras, María Teresa Álvarez Aliaga y Carla Crespo Melgar, que me apoyaron en todo momento, me transmitieron sus conocimientos y valiosas enseñanzas, me ayudaron a crecer como profesional y me incentivaron a seguir este emocionante camino de investigación. Aún recuerdo con mucha emoción la primera vez que ingresé al laboratorio de Biotecnología fúngica a hacer mi primer proyecto de investigación, supe en ese momento que había encontrado mi vocación. Me siento muy agradecida porque ellas me abrieron las puertas al instituto y me permitieron vivir una de las experiencias más lindas y enriquecedoras de mi vida.

Al programa de la cooperación sueca ASDI-SAREC y los Recursos de los Hidrocarburos IDH, por el soporte técnico y financiamiento para la realización de esta investigación.

A la empresa pública Yacimientos de Litio Bolivianos, con la que se estableció un convenio que incentiva el desarrollo de la investigación, gracias a ello pude caracterizar y analizar mis muestras, parte fundamental de mi proyecto. Por la cooperación y apoyo a los ingenieros Hugo Mobarec, Marianela Frías y Marisol Rojas, con quienes iniciamos proyectos de investigación.

Finalmente agradezco a mis amigos y amigas, que estuvieron acompañándome, aconsejándome y apoyándome, hicieron ameno este camino. ¡Gracias por su amistad y cariño!

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo general.....	6
3.2. Objetivos específicos	6
4. JUSTIFICACIÓN.....	6
5. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	7
5.1. Aguas residuales en la industria láctea	7
5.1.1. Generación de efluentes lácteos en la empresa Flor de Leche S.R.L.	9
5.2. Tecnologías para el tratamiento y recuperación de nutrientes a partir de efluentes lácteos	10
5.2.1. Tratamiento fisicoquímico de efluentes lácteos	10
5.2.2. Tratamiento biológico de efluentes lácteos	12
5.3. Producción de fertilizantes a base de fósforo	13
5.4. La estruvita como alternativa tecnológica para la recuperación de nutrientes	15
5.4.1. Características de la estruvita	15
5.4.2. Requerimientos para la formación de estruvita	16
5.4.3. Producción de estruvita por el método fisicoquímico	19
5.4.4. Producción de biológica de estruvita (o bioestruvita)	21
5.4.5. Producción de bioestruvita	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1. Microorganismos	26
6.2. Materia prima para la formación biológica de estruvita	26
6.2.1. Suero lácteo	26
6.2.2. Cristales de bischofita.....	26
6.3. Cultivo, aislamiento y selección de bacterias mineralizadoras de estruvita	27
6.3.1. Cultivo y aislamiento primario	27
6.3.2. Selección de cepas bacterianas mineralizadoras de estruvita.....	27
6.4. Producción de bioestruvita a partir de subproductos industriales.....	30
6.4.1. Diseño de un medio de cultivo a base de suero lácteo y compuestos de N y Mg para la producción de bioestruvita	30
6.5. Separación y caracterización de cristales de estruvita	32

6.5.1.	Separación de los cristales de estruvita	32
6.5.2.	Caracterización de los cristales de estruvita	32
6.6.	Caracterización de la cepa bacteriana seleccionada.....	33
6.6.1.	Caracterización fisiológica	33
6.6.2.	Identificación genotípica	34
6.7.	Determinaciones analíticas	35
6.7.1.	Determinación de Fósforo	35
6.7.2.	Determinación de Nitrógeno amoniacal	35
6.7.3.	Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	35
6.8.	Proceso fisicoquímico de producción de estruvita	36
6.9.	Análisis estadístico	36
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
7.1.	Bacterias mineralizadoras de estruvita	37
7.2.	Bioestruvita formada a partir de subproductos industriales.....	40
	Suero lácteo	40
7.2.1.	Bischofita.....	41
7.2.2.	Bioestruvita en proceso simultáneo de cultivo y producción	43
7.2.3.	Bioestruvita en proceso biológico separado de cultivo y producción	47
7.3.	Características de los cristales de estruvita.....	51
7.4.	Identidad de la cepa seleccionada 2CANA.....	53
7.5.1.	Características morfológicas	53
7.4.2.	Características fisiológicas	54
7.4.3.	Identidad molecular de la cepa 2CANA.....	57
7.5.	Comparación de los procesos biológico y fisicoquímico en la producción de estruvita 58	
8.	CONCLUSIONES	60
9.	BIBLIOGRAFIA.....	61
10.	ANEXOS.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los efluentes lácteos generados durante el proceso de elaboración de derivados lácteos a gran escala.....	8
Tabla 2. Eficiencias de diferentes métodos de tratamiento fisicoquímico del suero lácteo	11
Tabla 3. Alternativas de tratamiento biológico de suero lácteo.....	13
Tabla 4. Microorganismos productores de estruvita	22
Tabla 5. Diseño experimental para evaluar diferentes fuentes Mg y N para la recuperación de P en estruvita.....	31
Tabla 6. Características fenotípicas y fisiológicas de los aislados bacterianos provenientes del consorcio “BIOFOS”.....	39
Tabla 7. Parámetros fisicoquímicos del suero lácteo colectado a partir del tanque de acumulación de la empresa “Flor de Leche S.R.L.”, La Paz-Bolivia en agosto de 2018.....	41
Tabla 8. Composición química de bischofita en fase cristal obtenida por YLB en el Salar de Uyuni, Bolivia en agosto de 2018 y valores de referencia del Salar de Atacama.	42
Tabla 9. Parámetros finales obtenidos en respuesta al efecto de la fuente de Mg y N en el proceso biológico simultáneo de cultivo y producción de estruvita a partir de suero lácteo con DQO inicial de 75,52 g/L y pH de 7,0.	47
Tabla 10. Parámetros de crecimiento obtenidos en medios de cultivo diseñados C: N: P (100:5:1) durante la primera fase del proceso biológico separado de cultivo y producción.	49
Tabla 11. Segunda fase del proceso biológico separado de cultivo y producción de estruvita.	50
Tabla 12. Características morfológicas, fisiológicas y antibiograma de la cepa 2CANA.	56
Tabla 13. Producción de estruvita obtenida por: proceso biológico simultáneo y separado, y proceso fisicoquímico.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generación de residuos en la empresa Flor de Leche S.R.L.....	9
Figura 2. Principales usos del P a nivel global. Informe de la Comisión de la Unión Europea 2010	14
Figura 3. Morfología de los cristales de estruvita ilustrados en micrografías observadas por SEM. (A) Hemimorfismo de los cristales de estruvita, (B) prismática, (C) rectangular, (D) forma de estrella, (E) dendrítica alargada.	16
Figura 4. Piscinas de evaporación para la concentración de salmueras	18
Figura 5. Ilustración esquemática del mecanismo de formación de la estruvita a pH constante	20
Figura 6. Representación esquemática del probable mecanismo de formación de bioestruvita sobre células bacterianas.	24
Figura 7. Reacciones catalizadas por microorganismos ureolíticos para mediar la formación de bioestruvita	25
Figura 8. Porcentajes de remoción de P en medios formulados con suero lácteo de acuerdo al diseño experimental: 1) $MgSO_4 \cdot 7H_2O - (NH_4)_2SO_4$, 2) $MgCl_2 \cdot 2H_2O - (NH_4)_2SO_4$, 3) Bischofita- $(NH_4)_2SO_4$, 4) $MgSO_4 \cdot 7H_2O - urea$, 5) $MgCl_2 \cdot 2H_2O - urea$ y 6) Bischofita-urea.....	46
Figura 9. Cristales de bioestruvita analizados por microscopía óptica producidos por la cepa 2CANA en: A. medio B41 (100X) (sección 6.3.2), B. medio formulado con suero lácteo en proceso biológico simultáneo de cultivo y producción de estruvita (40X) (sección 6.4.1.1) y C. medio formulado con suero lácteo en proceso biológico separado de cultivo y producción de estruvita (40X) (sección 6.4.1.2).	51
Figura 10. A. Elementos principales en muestras de cristales de estruvita B. Morfología de los cristales de estruvita observadas por EDS, formada por la cepa 2CANA en el proceso biológico separado de cultivo y producción.	52
Figura 11. Patrón de difracción de rayos X correspondiente a cristales de estruvita formados en medios formulados a base de suero lácteo para el cultivo y producción separada.....	53
Figura 12. A) Características fenotípicas de la cepa 2CANA en medio TSA. B) Morfología microscópica de la cepa 2CANA observada con tinción Gram a 1000X.....	54

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Antibiotipo para Enterobacterias y Escherichia coli ATCC 25922 empleada como cepa de referencia	76
Anexo 2. Curva de calibración de fósforo - Método del ácido ascórbico	77
Anexo 3. Curva de calibración de N-NH ₄ - Método salicilato – hipoclorito	77
Anexo 4. Cepas aisladas a partir del consorcio microbiano “BIOFOS”	78
Anexo 5. Producción de bioestruvita en medio B41 por las cepas aisladas seleccionadas a partir del consorcio microbiano “BIOFOS”	79
Anexo 6. Contenido de carbono (DQO), nitrógeno total (N-total) y fósforo (P-PO ₄) del suero lácteo proveniente de la empresa “Flor de Leche S.R.L.” y proporción de N y P, considerando una concentración de DQO (70400,0 mg/L) que representa 100 partes. La Paz-Bolivia, agosto de 2018.	79
Anexo 7. A. Elementos principales en muestras de cristales de estruvita B. Morfología de los cristales de estruvita formada por la cepa 2CANA en medio B41 observadas por EDS.	80
Anexo 8. A. Elementos principales en muestras de cristales de estruvita B. Morfología de los cristales de estruvita observadas por EDS, formada por la cepa 2CANA mediante el proceso biológico simultáneo de cultivo y producción.....	80
Anexo 9. Patrón de difracción de rayos X correspondiente a cristales de estruvita formados por la cepa 2CANA en medio B41.	81
Anexo 10. Patrón de difracción de rayos X correspondiente a cristales de estruvita formados por la cepa 2CANA en medios formulados a base de suero lácteo mediante el proceso biológico simultáneo de cultivo y producción.....	81
Anexo 11. Estimación de costos para la producción de estruvita mediante procesos fisicoquímico y biológicos	82

RESUMEN

La producción de estruvita a través de la remoción de fósforo (P) y nitrógeno (N) de efluentes industriales representa una alternativa tecnológica para reducir la contaminación en los cursos de agua. La estruvita es un fertilizante de liberación lenta que requiere la adición de magnesio (Mg); $Mg(OH)_2$ y $MgCl_2$ son las principales fuentes para su producción. Minerales con contenido de Mg como la bischofita ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) pueden ser potencialmente utilizados. En ese sentido, esta investigación revela la producción de bioestruvita recuperando P y N del suero lácteo y Mg de bischofita.

A partir del consorcio acumulador de P “*BIOFOS*”, se evaluaron 9 aislados bacterianos por su capacidad de producir cristales de estruvita en medio B41, seleccionando el cultivo de la cepa 2CANA por su mayor contenido de estruvita (3,55 g/L). Medios de cultivo diseñados en base a suero lácteo suplementado con compuestos de N, P y Mg fueron evaluados a través de procesos de cultivo y producción de bioestruvita: *Simultáneo*, combinando urea o $(NH_4)_2SO_4$ como fuente de N (11,5 mM), K_2HPO_4 como fuente de fósforo (11,5 mM) y $MgSO_4$, $MgCl_2$ o bischofita como fuente de Mg (14,5 mM). *Separado*, variando la DQO del medio (0,5, 2, 8 o 32 g/L) y empleando urea (44, 178, 711, 2843 mg/L), K_2HPO_4 (2,0 g/L) y bischofita (5,5 g/L). En el proceso biológico *simultáneo* de cultivo y producción se obtuvo $4,57 \pm 1,08$ g/L de estruvita y 53 % de remoción de P empleando urea-bischofita (0,35 g/L-5,5 g/L) y suero lácteo (75,52 g/L de DQO). En contraste, en el proceso biológico *separado* de cultivo y producción se obtuvo mayor producción de estruvita ($5,1 \pm 0,7$ g/L) y elevados porcentajes de remoción de P (94 %) y N (82 %) empleando suero lácteo (DQO 8 g/L), urea (711 mg/L) y bischofita (5,5 g/L) incluso superiores al proceso fisicoquímico [$2,34 \pm 0,06$ g/L estruvita, remoción de P (84 %) y N (74 %)]. Los cristales de estruvita obtenidos en todos los procesos fueron identificados mediante Difracción de Rayos X y Espectrometría por dispersión de rayos X acoplada a microscopía electrónica de barrido. Finalmente, las características morfológicas, fisiológicas y la identificación molecular permiten asignar a la cepa 2CANA como miembro del género *Chryseobacterium*. En ese sentido, en este trabajo se demuestra la factibilidad de utilizar el suero residual proveniente de la industria lechera y la bischofita mineral subproducto del procesamiento de litio para producir bioestruvita como una alternativa de fertilizante de liberación lenta de nutrientes, útil para una variedad de cultivos y suelos ácidos. En ese sentido, la producción de estruvita representaría una alternativa novedosa en Bolivia para reducir la contaminación en cuerpos de agua y obtener un producto que beneficie al sector agrícola.

Palabras clave: Bischofita, estruvita, fertilizante, suero lácteo, *Chryseobacterium*.

ABSTRACT

Phosphorus (P) and nitrogen (N) removal from industrial wastewater through struvite production represents a technological alternative to reduce pollution in water courses. Struvite is a slow-release fertilizer that requires a magnesium (Mg) source. Currently $Mg(OH)_2$ and $MgCl_2$ are used for struvite production. However, Mg containing minerals such as bischofite ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) can potentially be used. In that sense, this research reveals the production of biological struvite by recovering P and N from whey and Mg from bischofite.

From "BIOFOS" a P-accumulating consortium, 9 bacterial isolates produced struvite crystals in B41 medium. 2CANA strain was selected based on higher struvite content in liquid culture (3,55 g/L). Media formulated using whey and N, P, Mg compounds were evaluated: A *simultaneous* cultivation and production process combining urea or $(NH_4)_2SO_4$ as N source (11,5 mM) with K_2HPO_4 as phosphorus source (11,5 mM) and $MgSO_4$, $MgCl_2$ or bischofite as Mg source (14,5 mM). A *separated* cultivation and production process, varying COD (0,5, 2, 8 or 32 g/L) and urea (44, 178, 711, 2843 mg/L), K_2HPO_4 (2,0 g/L) and bischofite (5,5 g/L). In the *simultaneous* biological process of cultivation and production, $4,57 \pm 1,08$ g/L of struvite and 53 % of P removal were obtained using urea-bischofite (0,35 g/L-5,5 g/L) and whey (75,52 g/L of COD). In contrast, in the biological process of *separate* cultivation and production, higher struvite production ($5,1 \pm 0,7$ g/L) and high percentages of P (94 %) and N (82 %) removal were obtained using whey (COD 8 g/L), urea (711 mg/L) and bischofite (5,5 g/L) even higher than the physicochemical process [$2,34 \pm 0,06$ g/L struvite, P (84 %) and N (74 %) removal]. The struvite crystals obtained in all processes were identified by X-ray diffraction and X-ray scattering spectrometry coupled to scanning electron microscopy. Finally, through morphological, physiological and molecular the strain 2CANA was assigned in *Chryseobacterium* genus. In this sense, the feasibility for producing biostruvite from residual whey from the dairy industry and the mineral bischofite, a byproduct of lithium processing industry, was demonstrated. Moreover, reducing the pollution in water by producing struvite, as a slow release nutrient fertilizer useful for a variety of agricultural crops and acid soils, may represent a novel alternative in Bolivia.

Key words: Bischofite, struvite, fertilizer, whey, *Chryseobacterium*.

1. INTRODUCCIÓN

Las fuentes de agua generalmente son afectadas por una variedad de contaminantes, como ser: desechos y compuestos orgánicos, sustancias inorgánicas, microorganismos patógenos y no patógenos y nutrientes como nitrógeno (N) y fósforo (P) (Munch, Barr, & Münch, E. V., & Barr, 2001). El N y P son elementos que se destacan no sólo por su abundancia sino también por su peligrosidad, ya que son la principal causa de eutrofización en cuerpos de agua (De-Bashan & Bashan, 2007). La eutrofización tiene graves consecuencias en los ecosistemas acuáticos interfiriendo con el ciclo de nutrientes y reduciendo drásticamente la biodiversidad (Alexander, Vonlanthen, & Seehausen, 2017). Debido a esto, una prioridad durante el tratamiento de aguas residuales radica en disminuir los niveles de P y N antes de que desemboquen en cuerpos de agua. Entre los tratamientos alternativos para reducir los niveles elevados de P y N se hallan el secado de lodos (Morse, Brett, Guy, & Lester, 1998), remoción biológica de P (Van-Loosdrecht, Hooijmans, Brdjanovic, & Heijnen, 1997) y N (Ahn, 2006), adsorción, cristalización (Peng, Dai, Wu, Peng, & Lu, 2018) y recuperación de P y N a través de la producción de estruvita (Le Corre, Valsami-Jones, Hobbs, & Parsons, 2009; Tansel, Lunn, & Monje, 2018).

La estruvita ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) es un mineral compuesto por cantidades equimolares de Mg, N y P, la nucleación de estos elementos permite su formación y constituye un método alternativo para reducir el problema de la contaminación por N y P en los cursos de agua. La estruvita se caracteriza por ser un fertilizante fosfato monoamónico (MAP) de liberación lenta, por lo cual las plantas pueden utilizar dosis controladas de nutrientes por tiempos prolongados (Li et al., 2019).

El uso de fertilizantes en Bolivia es reducido, alrededor de 10 Kg/hectárea (Ha) de fertilizantes de Nitrógeno, Fósforo y Potasio (NPK) son usados en cultivos de banano, papa, caña de azúcar, trigo y hortalizas, en comparación a Chile donde se usan alrededor de 300 Kg de fertilizantes NPK por hectárea cultivada. Una de las principales causas que sustentan esta diferencia radica en el elevado costo de los fertilizantes en Bolivia en comparación a los demás países de Sudamérica¹, aunado a la limitada oferta y disponibilidad en el mercado interno, dando como

¹Costo de adquisición en que expresado en \$US/TM es: Argentina 380; Bolivia 620; Brasil 360; Chile 400; Colombia 360; Ecuador 380; Paraguay 480; Perú 440; Uruguay 420; Venezuela 340 (Escalera S, 2014)

resultado una baja productividad y débil competitividad del sector agrícola nacional (Escalera, 2014).

Actualmente, en nuestro país la empresa Yacimientos Petrolíferos Fiscales Bolivianos (YPFB) proyecta la instalación de 6 nuevas plantas para la producción de fertilizantes en Bulo Bulo - Cochabamba, donde inicialmente Metanol, Urea-Formaldehído serán producidos y posteriormente se contempla la producción de fertilizantes NPK, Nitrato de Amonio, Fosfato Monoamónico (MAP) y Fosfato Diamónico (DAP). En ese sentido, al ser la estruvita un fertilizante de tipo MAP, es posible que en el futuro su producción a gran escala sea considerada, lo cual fortalecería los planes del Gobierno Central de diversificar e industrializar la producción de fertilizantes (Agronegocios, 2019).

Por otro lado, para la producción de estruvita además de N y P, la adición de Mg es requerida. Las principales fuentes de Mg usadas en la producción de estruvita son $Mg(OH)_2$ y $MgCl_2$, los costos por adición de éstos limitan la producción de estruvita. Existen diferentes fuentes naturales de Mg como: agua de mar y salmueras marinas, minerales como magnesia calcinada (MgO), brucita ($Mg(OH)_2$), magnesita ($MgCO_3$) y ceniza de madera (Kataki, West, Clarke, & Baruah, 2016). Adicionalmente, nuestro país cuenta con la reserva de litio más grande del mundo el Salar de Uyuni, sin embargo, la abundancia de Mg disuelto reduce la calidad de litio como recurso evaporítico, precipitando prematuramente como impurezas en las sales de Mg. La bischofita, constituida por $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, es un subproducto abundante de la industrialización del litio y en la actualidad no es industrializada a pesar de ser una fuente valiosa de Mg que podría ser utilizada para la obtención de estruvita, reduciendo los costos de producción.

Un método alternativo de producción de estruvita, se basa en la capacidad que tienen los microorganismos de mineralizar el P (Albuquerque, Torres, & Reis, 2010) que a diferencia de la producción química de estruvita, el medio y las condiciones de cultivo son vitales, ya que los microorganismos promueven la nucleación activa de estruvita como mineral (Sánchez-Román, Rivadeneyra, Vasconcelos, & McKenzie, 2007). Los efluentes industriales con elevado contenido en C, N y P, como el suero lácteo, aguas residuales, lodos, entre otros, pueden utilizarse como medios de cultivo para los microorganismos que promueven la formación de estruvita. En este estudio se pretende producir estruvita mediante un proceso biológico basado en la recuperación de fósforo y nitrógeno del suero lácteo y magnesio de bischofita.

2. ANTECEDENTES

Los fertilizantes son insumos importantes de la agricultura moderna, se han utilizado como un medio para mejorar la fertilidad del suelo y la producción de cultivos a lo largo de la historia de la agricultura. Los nutrientes de las plantas son esenciales para la producción de cultivos y alimentos saludables para la creciente población mundial. Las estrategias actuales de manejo de suelos dependen principalmente de los fertilizantes inorgánicos a base de químicos (Itelima, Bang, Onyimba, Sila, & Egbere, 2018). La aplicación de fertilizantes en las prácticas agrícolas ha aumentado notablemente la producción de alimentos, combustibles, fibra y otros productos vegetales (Timilsena et al., 2014). Sin embargo, una parte significativa de los nutrientes aplicados en el campo no es utilizada por las plantas y se pierde por lixiviación, volatilización, nitrificación u otros procesos. Estas pérdidas incrementan la necesidad de utilizar mayor cantidad de fertilizantes, incrementando el costo de los productos agrícolas y contaminando gravemente el medio ambiente. Para aliviar estos problemas, se producen y utilizan fertilizantes de mayor eficiencia (Timilsena et al., 2014), como aquellos de liberación lenta y controlada.

El uso de la estruvita como fertilizante de liberación lenta ha sido sugerido hace un siglo atrás, este es un fertilizante con alto contenido de P y una cantidad significativa de N y Mg (Rahman et al., 2014). Los fertilizantes de P desempeñan un papel clave en la agricultura moderna, de satisfacer la creciente demanda de alimentos (Mogollón, Beusen, Grinsven, Westhoek, & Bouwman, 2018).

La producción biológica de estruvita (o Bioestruvita) es una alternativa al proceso químico convencional (Kataki et al., 2016), aprovecha las características metabólicas y estructurales de algunas bacterias que favorecen la biomineralización de los cristales de estruvita, de modo que no se requieren procedimientos adicionales para formar el mineral. Las bacterias pueden servir como núcleo para la precipitación mineral mediante la adsorción de cationes (como el Mg) alrededor de la membrana de la superficie celular, la pared celular o las capas de sustancias poliméricas extracelulares y son mediadores activos en el proceso, además la actividad metabólica de las bacterias es extremadamente importante porque suministra los iones NH_4^+ necesarios para la formación de estruvita (Sánchez-Román et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Producir estruvita mediante un proceso biológico basado en la recuperación de fósforo y nitrógeno del suero lácteo y magnesio de bischofita.

3.2. Objetivos específicos

- Seleccionar cepas bacterianas por su capacidad para producir estruvita en medio B41.
- Evaluar la factibilidad del uso de suero lácteo para la producción de bioestruvita.
- Evaluar la producción de bioestruvita a través de un diseño experimental empleando fuentes de nitrógeno y magnesio, entre ellos la urea y bischofita.
- Caracterizar la fisiología y genotipo de la cepa bacteriana seleccionada por su capacidad de inducir la formación de estruvita.
- Comparar los métodos biológico y fisicoquímico de producción de estruvita en función a los costos de producción.

4. JUSTIFICACIÓN

La necesidad de administrar cada vez mayores cantidades de nutrientes en áreas de cultivo proyecta un problema de importancia mundial que impulsará el desarrollo de la recuperación de nutrientes a partir de diferentes fuentes, a mediano plazo. Por ello, el tratamiento de aguas residuales, la protección del medio ambiente, la agricultura sostenible y la seguridad alimentaria, dependerán de diferentes estrategias que conlleven a la recuperación y uso eficiente de nutrientes del suelo. En las próximas décadas, se incrementará la presión sobre los sistemas alimentarios globales y la agricultura enfrentará el desafío de brindar seguridad alimentaria a una población mundial en crecimiento sin afectar la seguridad ambiental. En consecuencia, será necesario utilizar tecnologías modernas en los agroecosistemas para suministrar alimentos suficientes y disminuir los impactos negativos en el medio ambiente inducidos por la eliminación o reutilización inadecuada de los desechos agrícolas e importantemente la contaminación del agua o suelos por el exceso de nutrientes.

La recuperación de nutrientes a través de la formación de estruvita ha ganado gran interés comercial por ser una tecnología promisoría. Una alternativa a la producción convencional de

estruvita es la mineralización biológica mediada por microorganismos, que emplea una diversidad de sustratos que favorecen su recuperación en condiciones operacionales sencillas y con menor impacto en la utilización de agentes químicos en comparación al proceso fisicoquímico convencional.

El presente trabajo de investigación desarrolló un proceso biológico optimizado para la producción de estruvita empleando bacterias mineralizadoras, esta estrategia constituye una alternativa de recuperación de P y N, y Mg a partir de suero lácteo y bischofita, respectivamente. Este proceso propone el empleo de estos subproductos industriales con bajo valor económico para la producción de bioestruvita, de esta manera darles un valor agregado, además, reduciría su posible impacto ambiental y fomentaría la seguridad alimentaria.

5. FUNDAMENTO TEÓRICO

5.1. Aguas residuales en la industria láctea

Actualmente a nivel mundial existe una importante demanda de productos lácteos y sus derivados, la industria láctea desarrolla productos más saludables, naturales y ecológicos, que cambian las percepciones del consumidor (Outlook, 2017). Durante el procesamiento de los lácteos se generan elevadas cantidades de aguas residuales, por ejemplo, se requieren entre 2 a 3 veces de volumen de agua por cada litro de leche procesada. Los efluentes lácteos son generados durante la limpieza del equipamiento, las salas de tratamiento, el medio de transporte, entre otros (Uludag-Demirer, Demirer, & Chen, 2005). El efluente que se genera en las empresas lácteas durante los diferentes procesos productivos puede contaminar el medio ambiente si no se trata adecuadamente. La producción de queso, helado y mantequilla son las mayores fuentes de contaminación orgánica de los efluentes (Prazeres, Carvalho, & Rivas, 2012), siendo el suero lácteo uno de los principales residuos líquidos generados en la industria láctea (Goli, Shamiri, Khosroyar, Talaiekhosani, & Sanaye, 2019).

Las aguas residuales que se generan en la industria láctea se caracterizan por su alto contenido de materia orgánica y nutrientes. La composición de los efluentes líquidos es muy variable y depende del tipo de proceso y producto fabricado, por lo que la caracterización de sus parámetros fisicoquímicos contribuye en la elección de la tecnología para su tratamiento (Uludag-Demirer et al., 2005). La tabla 1 muestra un resumen de la composición de algunos efluentes lácteos generados durante el proceso de elaboración de derivados lácteos.

Tabla 1. Características de los efluentes lácteos generados durante el proceso de elaboración de derivados lácteos a gran escala.

Derivado lácteo	Tipo de efluente	DQO (mg/L)	DBO ₅ (mg/L)	pH	Nitrógeno total (mg/L)	Fósforo total (mg/L)	Referencia
Queso	Suero lácteo	68000–94000	60000–100000	4,0-7,0	1020-1462	300-379	Gelegenis, Georgakakis, Angelidakic, & Mavris, 2007; Malaspina, Stante, Cellamare, & Tilche, 1995; Mawson, 1994; Van den Berg & Kennedy, 1983)
Queso, yogurt, mantequilla	Combinado	1150–9200	500-1300	6,0–11,0	14–272	8–68	(Ozturk, Eroglu, Ubay, & Demir, 1993)
Crema de queso	Generado en ciclo de limpieza	2000–6000	1200–4000	8,0–11,0	50–60	-	(Kasapgil, Anderson, & Ince, 1994)
Leche en polvo/ mantequilla	Derivado del proceso de fabricación	1908	-	5,8-10,2	77 aprox.	10 aprox.	(Janczukowicz, Rodziewicz, Thornton, & Czaplicka, 2012; Ozturk et al., 1993)

Adaptado de: (Prazeres et al., 2012)

El suero lácteo es la fracción líquida que queda después de la elaboración del queso, representa entre el 85 al 95% del volumen de leche procesada, se caracteriza principalmente por una elevada carga orgánica con una Demanda Química de Oxígeno (DQO) que varía en el rango de 68 a 94 g/L y una Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅) variable de 30 a 50 g/L (Dareioti & Kornaros, 2015; Gelegenis, Georgakakis, Angelidakic, & Mavris, 2007; Jasko, Skripsts, Dubrovskis, Zabarovskis, & Kotelenecs, 2011; Riggio, Comino, & Rosso, 2015). La lactosa del suero es uno de los componentes que más aporta a estos valores de DQO y DBO₅, y se encuentra a una concentración de 45-50 g/L, seguido de las proteínas del suero (5-8 g/L) y los lípidos (4-5 g/L) (Mawson, 1994). Además, el suero lácteo retiene nutrientes y micronutrientes como: N (1020-1462 mg/L), P (300-379 mg/L), Na (735 mg/L), K (42,8 mg/L), Ca (47,7 mg/L), Mg (11,4 mg/L) y vitaminas del grupo B (5,66 mg/kg) (Gelegenis et al., 2007; Mawson, 1994; McDonough, Hargrove, Mattingly, Posati, & Alford, 1974; Uludag-Demirer et al., 2005). A pesar del elevado contenido de nutrientes en el suero de leche, más de la mitad del suero que se genera no se trata y se descarga al medio ambiente, por lo que representa un problema ambiental importante debido a los altos volúmenes producidos y su alto contenido de materia orgánica (Gonzalez, 1996). El elevado contenido de materia orgánica en los efluentes lácteos reduce la cantidad de oxígeno disuelto y su descarga a los cuerpos de agua puede generar varios problemas

como la eutrofización, brote de enfermedades vectoriales como la fiebre amarilla y afectar la vida acuática (Zainab, Vijayaraghavalu, Prasad, & Kumar, 2019).

5.1.1. Generación de efluentes lácteos en la empresa Flor de Leche S.R.L.

Flor de Leche S.R.L. es una empresa láctea ubicada en el municipio de Achocalla – La Paz, produce diferentes tipos de derivados lácteos, entre ellos quesos, cremas y yogures producidos de forma artesanal. Esta empresa emplea alrededor de 35 personas y más de la mitad pertenecen al municipio de Achocalla, además, la empresa trabaja con 180 familias proveedoras de leche. Flor de Leche S.R.L. genera distintos tipos de residuos sólidos y líquidos (Figura 1). Diariamente se descarga un efluente de 7000 L de residuos líquidos y el suero lácteo constituye un 44% del efluente diario generado, es así que 18316 L de suero lácteo son generados en una producción semanal, de los cuales aproximadamente un tercio (5500 L) es distribuido a 60 familias para su utilización como suplemento alimenticio para el ganado (Flores, Carrasco, & Álvarez, 2017).

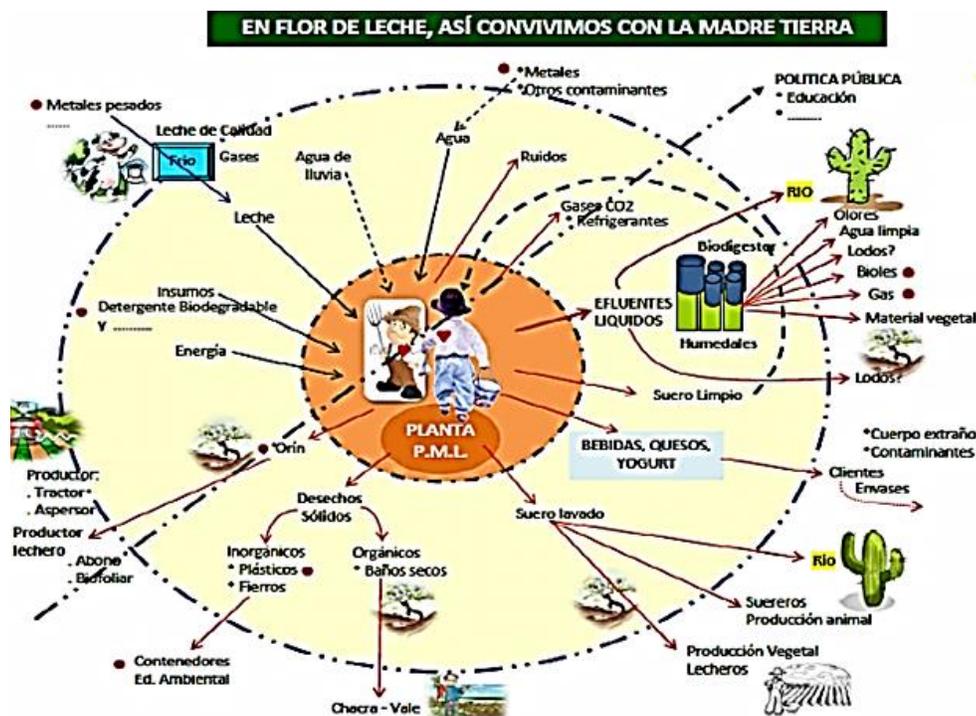


Figura 1. Generación de residuos en la empresa Flor de Leche S.R.L.
 Fuente: Área de medio ambiente de la Empresa Flor de Leche S.R.L., 2015

La empresa Flor de Leche S.R.L. cuenta con un sistema de tratamiento de aguas residuales, el cual está constituido por: tratamiento primario de sedimentación, que reduce las partículas en

suspensión; tratamiento biológico secundario basado en un reactor anaerobio de flujo ascendente para la digestión de la materia orgánica; y un tratamiento terciario de humedales para reducir la carga orgánica residual, nutrientes como el P, entre otros. Después del tratamiento, los efluentes se utilizan para riego (Flores et al., 2017). Sin embargo, de manera recurrente el tratamiento biológico es afectado, debido a los desbalances de la actividad microbiana generando ácidos grasos volátiles de cadena corta que provocan inestabilidad del pH, conduciendo a la digestión incompleta de la materia orgánica, siendo estos residuos característicos por su elevada carga orgánica y de nutrientes, tampoco se contemplan otras alternativas de tratamiento que podrían conducir a la recuperación de nutrientes para la elaboración de otros productos, como los fertilizantes.

5.2. Tecnologías para el tratamiento y recuperación de nutrientes a partir de efluentes lácteos

En el siglo XX, más de la mitad del suero lácteo que se generaba no era tratado; en algunos casos no se utilizaban los métodos más adecuados de tratamiento, descargando al medio ambiente efluentes con alto contenido de carga orgánica residual. Hoy en día, el tratamiento del suero lácteo representa un desafío global debido a la cantidad producida en todo el mundo, que se estima alcanza alrededor de 190 millones de toneladas anuales (J. Shen, Chen, Jensen, & Solem, 2019). Debido al elevado contenido orgánico del suero lácteo, se han desarrollado diferentes tecnologías de tratamiento incluyendo procesos biológicos, fisicoquímicos o combinados, que conducen a la valorización de este subproducto (Prazeres et al., 2012).

5.2.1. Tratamiento fisicoquímico de efluentes lácteos

Los tratamientos fisicoquímicos basados en la precipitación o coagulación-floculación son métodos económicos y fáciles de monitorear, permiten la remoción parcial de la materia orgánica, son eficientes en la remoción de grasas, sólidos suspendidos, N y P, y reducen el tiempo de digestión anaeróbica en procesos combinados. Los tratamientos fisicoquímicos son ampliamente usados por las empresas lácteas por los elevados volúmenes de procesamiento, sin embargo, algunos de estos tratamientos son costosos, generan gran cantidad de lodos y bajos rendimientos en la remoción de materia orgánica (Zainab et al., 2019).

Las pequeñas y medianas empresas normalmente no emplean procesos de tratamiento sofisticados, por lo cual optan por distribuir el suero para su utilización como suplemento

alimenticio para ganado o descargan sus efluentes al sistema de alcantarillado municipal (Prazeres et al., 2012).

La tabla 2 muestra las características de diferentes métodos fisicoquímicos de tratamiento de suero que incluyen coagulación-floculación y precipitación alcalina como métodos convencionales y otras alternativas en desarrollo como el tratamiento por ozonización, método Fenton y coagulación electroquímica.

Tabla 2. Eficiencias de diferentes métodos de tratamiento fisicoquímico del suero lácteo.

Tratamiento	Condiciones experimentales					Remoción (%)			
	DQO (g/L)	Concentración del reactivo (g/L)	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	DQO	DBO ₅	P	Nitrógeno total
Coagulación-floculación con FeSO ₄	13,6-14,2	0,25	8,5	10-15	-	43	67	89	43
Coagulación-floculación con FeCl ₃	13,6-14,2	0,25	4,4	10-15	-	32	23	14	19
Coagulación-floculación con Al ₂ (SO ₄) ₃	13,6-14,2	1,0	7,0	10-15	-	35	36	77	44
Precipitación con cal	18,5	3,8-5,0	11,5	-	-	47	55	97	55
Precipitación con NaOH	18,5	2,7	11,0	-	-	50	46	46	34
O ₃ +H ₂ O ₂	0,5	10 gO ₃ /Nm ³	10,0	Ambiente	7	63	53	-	-
Fenton	0,5	0,5 M (H ₂ O ₂)	3,0	-	3	96	100	-	-
Coagulación electroquímica	27,6	25,0 (electrodo de Fe en presencia de NaCl)	5,0	25	8	53,3	-	-	-

Fuente: Adaptado de (Carvalho, Prazeres, & Rivas, 2013; Prazeres et al., 2012)

Entre los métodos fisicoquímicos más eficientes para la remoción de materia orgánica está el método Fenton, sin embargo, no permite la remoción ni recuperación del P. Los métodos combinados de tratamiento buscan lograr mayores rendimientos de remoción de materia orgánica y generar productos de valor agregado, como los fertilizantes de P. Debido a que el contenido de P en el suero lácteo es aproximadamente 10 veces más elevado que el promedio presente en otros efluentes residuales de la industria láctea (Prieto-García, Callejas-Hernández,

Reyes-Cruz, & Marmolejo-Santillán, 2012), éste representa una fuente abundante de P, para su recuperación.

Otras tecnologías, entre ellas la precipitación, permiten la remoción y recuperación de P entre 46-97 %, empleando suero lácteo (Prazeres et al., 2012). Por otro lado, la cristalización como estruvita es una alternativa que permite la recuperación de aproximadamente un 90 % de P a partir de suero lácteo previamente sometido a digestión anaeróbica (Kataki et al., 2016).

5.2.2. Tratamiento biológico de efluentes lácteos

Los procesos biológicos tienen múltiples ventajas en el tratamiento de residuos orgánicos frente al proceso fisicoquímico, además, buscan simultáneamente la valorización y el tratamiento de los residuos y subproductos. Uno de los procesos más explorados de la biotecnología es la digestión anaeróbica que permite reducir la carga orgánica y obtener energía (Kataki et al., 2016; Song et al., 2011). Además, el lodo proveniente de la digestión anaeróbica, después de su estabilización, puede ser empleado como un fertilizante alternativo viable. La digestión aeróbica, es otro método de tratamiento biológico de la materia orgánica en el suero, a diferencia de la digestión anaeróbica, se produce relativamente más rápido, la remoción de P puede alcanzar hasta el 99 % y de P hasta un 88 % y se puede recuperar el P de los lodos. Sin embargo, la elevada carga orgánica del suero no favorece este proceso (Prazeres et al., 2012).

Otros tratamientos biológicos como la producción de ácido láctico, etanol o biohidrógeno son alternativas de procesos fermentativos que se basan en la utilización de lactosa proveniente del suero lácteo, sin embargo, estos procesos no reducen totalmente la carga orgánica y por ello se requiere un postratamiento como la digestión anaeróbica. La tabla 3 describe las características de diferentes tecnologías de tratamiento biológico de suero lácteo.

Tabla 3. Alternativas de tratamiento biológico de suero lácteo.

Tipo de suero lácteo	DQO (Kg/m ³)	Tratamiento biológico	Remoción (%)	Recuperación de productos
Crudo, diluido	0,5-70	Digestión aeróbica	53-99	-
Crudo, diluido, en polvo, pretratado	0,5-79	Digestión anaeróbica	36-99	Metano (53-79 %)
Crudo, pasteurizado, solución permeada, polvo, desproteïnizada	35-200*	Fermentación a etanol	33-100*	Etanol (2,1-81 kg/m ³)
Crudo, diluido, polvo permeado, solución en polvo	10-89	Fermentación a hidrógeno	86-97	Hidrógeno (20-88 %)
Crudo, desproteïnizado, pasteurizado, permeado, pretratado permeado	30-100*	Fermentación a ácido láctico	34-100*	Ácido láctico (3,8-52 kg/m ³)
No esterilizado y diluido, filtrado-esterilizado y diluido, crudo, crudo e inoculado, tratado térmicamente e inoculado	0,35-96,5	Células como combustible microbiano	5-100	Electricidad (18,4-16700 mW/m ²)

*Referido al consumo/remoción de lactosa

Fuente: Adaptado de (Prazeres et al., 2012)

Otro proceso que permite valorizar el P del suero lácteo es la eliminación mejorada de P biológico, mediada por PAOs (del inglés Phosphorus Accumulating Organisms), en etapas anaeróbicas y aeróbicas secuenciales. El P se elimina en el tanque aeróbico donde precipita como polifosfato, que puede usarse como fertilizante (Latifian, 2015). Así mismo, la cristalización del P, como estruvita, mediada por microorganismos mineralizadores de P es una alternativa para la remoción de la materia orgánica del suero y permite la recuperación de nutrientes como el N y el P en forma de estruvita (Escalante, Castro, Amaya, Jaimes, & Jaimes-Estévez, 2017).

5.3. Producción de fertilizantes a base de fósforo

El acelerado crecimiento de la población humana y el incremento en la demanda de alimentos genera una elevada presión en los ecosistemas acuáticos y terrestres. Los fertilizantes de P desempeñan un papel clave en la agricultura moderna para satisfacer la creciente demanda de alimentos. Hoy en día existe una progresiva importancia respecto a la recuperación de P, fuente no renovable, por lo que muchos estudios se han enfocado a prevenir su pérdida y aplicar diversos métodos de recuperación a partir de diferentes fuentes (Latifian, 2015).

Una de las principales fuentes de P es la roca fosfórica y alrededor del 80% de ésta se emplea principalmente para la producción de fertilizantes, además de otros productos (Figura 2). El proceso de digestión anaeróbica de diferentes efluentes con elevada carga orgánica, genera lodos con propiedades fertilizantes debido a su elevado contenido de P y N, sin embargo, su aplicación directa a los cultivos tiene desventajas, como la emisión de amonio durante el riego y la introducción de patógenos en los campos de cultivo (Appels, Baeyens, Degre, & Dewil, 2008). Abordando estos problemas, se han propuesto soluciones prácticas para recuperar nutrientes, una de estas alternativas es obtener fertilizantes como la estruvita (Stolzenburg, Capdevielle, Teychené, & Biscans, 2015).

Una de las ventajas de la estruvita es su baja solubilidad en agua en comparación con los fertilizantes comerciales, lo que mejora su rendimiento e inhibe la dispersión descontrolada de nutrientes (Karak et al., 2015).

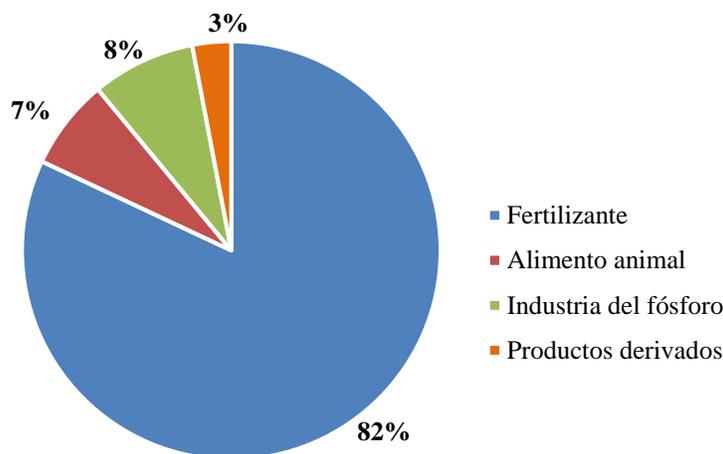


Figura 2. Principales usos del P a nivel global. Informe de la Comisión de la Unión Europea 2010

Fuente: Adaptado de Prud'homme, 2010

Un problema emergente en la utilización del P es que gran parte se pierde, principalmente debido a la erosión del suelo, las pérdidas de cultivos, en los sistemas de aguas residuales tratadas y no tratadas o en forma de desechos animales (Cordell, Drangert, & White, 2009). El tiempo de vida de las reservas de P no está claro, sin embargo, se espera que a menos que haya un cambio en

la forma en que se produce y utiliza, se alcanzará el pico máximo cuando la demanda supere el suministro de este recurso no renovable (Cordell et al., 2009).

5.4. La estruvita como alternativa tecnológica para la recuperación de nutrientes

Se ha demostrado que el proceso de producción de estruvita es una tecnología prometedora para recuperar eficientemente P y N a partir de aguas residuales municipales, agrícolas e industriales. La estruvita puede ser empleada como fertilizante de liberación lenta, por lo que se considera una fuente efectiva de N, Mg y P para el crecimiento de las plantas (Celen, Buchanan, Burns, Robinson, & Raman, 2007; Sadowski, Prywer, & Torzewska, 2014).

5.4.1. Características de la estruvita

La estruvita, conocida también como fosfato de amonio y magnesio hexahidratado ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), es un mineral de aspecto cristalino, color blanco brillante (Le Corre et al., 2009), su composición elemental consiste en (% p/p): N 6%, P 13% y Mg 10%. Los cristales de estruvita son poco solubles en agua (0,18 g/L a 25°C) y muy solubles en ácidos (Le Corre et al., 2009). La constante de solubilidad de la estruvita (pK_{so}) a 25 °C es de 13,4 y a 37°C de 13,3 (Babić-Ivančić, Kontrec, Kralj, & Brečević, 2002), los cristales de estruvita son estables hasta 55 °C y se descomponen a 80°C (Ramlogan & Rouff, 2016). Por su composición y características de baja solubilidad y estabilidad, la estruvita es un fertilizante de excelencia porque permite una liberación lenta de sus componentes y puede ser usada en cultivos agrícolas, plantas ornamentales, plantas forestales, césped, huertos, viveros, entre otros cultivos (Bridger, Salutsky, & Starostka, 1962; Li et al., 2019), además la estruvita puede ser utilizada en suelos ácidos. Los cristales de estruvita se forman por la agregación de sus iones, inducida por diferencias en la polaridad a lo largo de los ejes del cristal, por lo que se puede sugerir que la estruvita es un mesocristal (Cölfen & Antonietti, 2005; Prywer & Torzewska, 2010; Prywer, Torzewska, & Płociński, 2012). Los cristales pertenecen al sistema ortorrómbico, su grupo espacial es $\text{Pmn}21$ y las dimensiones aproximadas para cada celda unitaria son: 9 x 11.1 x 6.1 Å. (Le Corre et al., 2009; Prywer & Torzewska, 2009).

Los cristales de estruvita presentan una variedad de formas (Ben Omar et al., 1996) tales como: rectangular, prismática, dendrítica, dendrítica alargada, en forma de aguja, estrella, poliédrica o pseudo-poliédrica (Chauhan, Joseph, Parekh, & Joshi, 2008; González-Muñoz et al., 2008) como se puede observar en la figura 3.

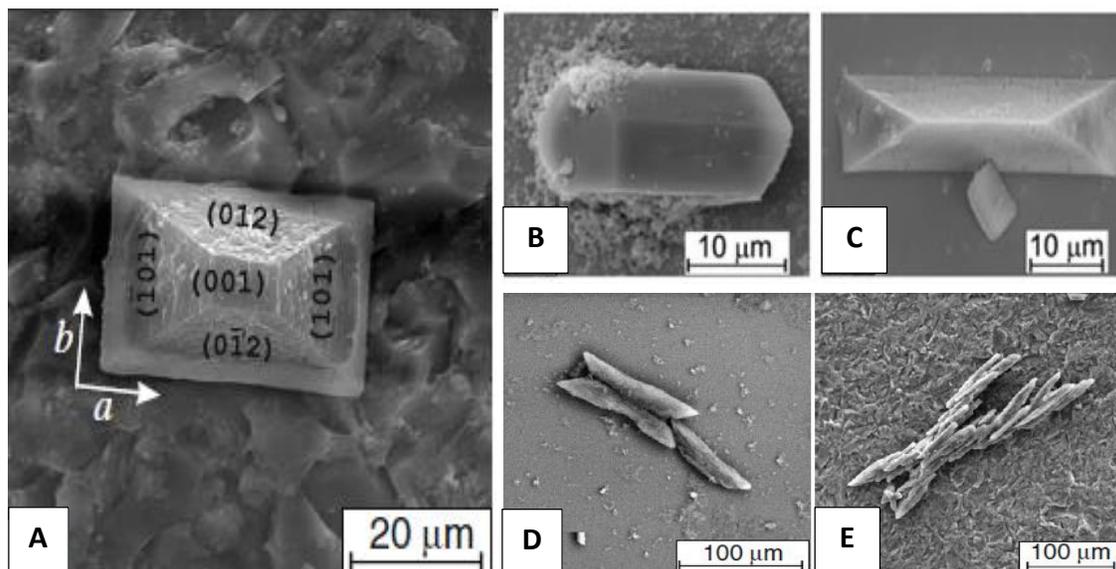


Figura 3. Morfología de los cristales de estruvita ilustrados en micrografías observadas por SEM. (A) Hemimorfismo de los cristales de estruvita, (B) prismática, (C) rectangular, (D) forma de estrella, (E) dendrítica alargada.

Fuente: Extraído de (Prywer & Torzewska, 2009; Prywer et al., 2012)

El hemimorfismo (caras paralelas no son simétricamente equivalentes) es típico de los cristales de estruvita (Prywer & Torzewska, 2010). Los iones que forman el cristal de estruvita: Mg^{+2} , NH_4^+ y PO_4^{-3} , se asocian por atracciones iónicas, por lo que es sensible a los cambios en la forma, por efecto del pH o impurezas (Ben Omar et al., 1996). Estas características facilitan la identificación de los cristales empleando un microscopio óptico, sin embargo, existen otras técnicas como: Espectrometría por dispersión de energías de rayos X acoplada a Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS) para determinar la composición y morfología, y difracción de rayos X (DRX) para determinar la identidad de los cristales.

5.4.2. Requerimientos para la formación de estruvita

Los requerimientos necesarios para la formación de estruvita, se describen a continuación:

5.4.2.1. Sustrato

El conocimiento acerca del mecanismo molecular para la cristalización de la estruvita ha permitido desarrollar procedimientos para obtener el mineral a partir de varios sustratos (Celen et al., 2007; Kabdash, Tünay, & Özcan, 2009; Maurer, Pronk, & Larsen, 2006). Entre los sustratos más frecuentes se encuentran: *a) Aguas residuales de origen doméstico o industrial* (Kabdash et al., 2009) *b) Orina, de origen humano o animal* (Ronteltap, Maurer, Hausherr, & Gujer, 2010) *c) Estiércol líquido* (Celen et al., 2007) *d) Sobrenadante de digestores anaeróbicos* (Battistoni, Pavan, Prisciandaro, & Cecchi, 2000) *e) Lixiviados de riego de campos de cultivo* (Huang, Xiao, Zhang, & Ding, 2014). Una característica común entre los sustratos mencionados es la presencia de materia orgánica en descomposición y el contenido elevado de P. Además, la cantidad de sustrato influye en la recuperación de nutrientes durante la formación de estruvita.

5.4.2.2. pH

El pH es un parámetro importante en la cristalización de la estruvita, debido a que la especiación de los componentes hacia la formación de estruvita depende del pH y la solubilidad de la estruvita disminuye a medida que el pH se incrementa en un rango de 6,0-8,0 (Ohlinger, Young, & Schroeder, 1998). El pH del medio se eleva mediante la adición de un álcali como NaOH o $Mg(OH)_2$, sin embargo, su adición es un proceso costoso. También se puede remover el CO_2 del medio por aireación del sustrato para incrementar la alcalinidad (Ohlinger et al., 1998; Stratful, Scrimshaw, & Lester, 2001; Suzuki, Tanaka, Osada, & Waki, 2002).

5.4.2.3. Fuente de Magnesio

El Mg une de forma sólida el amonio y el P durante la formación de estruvita. La precipitación de la estruvita está limitada por la cantidad de Mg, es por esto que se adiciona una fuente de Mg al medio, de tal manera que se tenga cantidades equimolares de Mg^{+2} : NH_4^+ : PO_4^{-3} (Stratful et al., 2001). Las principales fuentes de Mg utilizados son: $Mg(OH)_2$ y $MgCl_2$. La ventaja de usar $MgCl_2$ es que se disocia más rápido que el $Mg(OH)_2$, lo que resulta en tiempos de reacción más cortos. Sin embargo, el $Mg(OH)_2$ es generalmente más barato y puede elevar el pH (Munch et al., 2001). Una importante forma de reducir el costo de producción de estruvita es a través del uso de materiales reciclables, desechos o subproductos, los cuales son reconocidos por su bajo costo.

5.4.2.3.1. Bischofita como fuente potencial de magnesio

La bischofita ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) es una sal cristalina de color blanco, higroscópica y altamente soluble en agua (1.5 Kg/L) (Montes, 2010). La bischofita es una salmuera abundante en el Salar de Uyuni. Se obtiene de forma natural de las piscinas residuales en los salares en el último paso de concentración de salmueras por el proceso de evaporación natural fraccionada (figura 4). La cantidad de Mg disuelto en el Salar de Uyuni tiene una relación Mg: litio de 18,6: 1. La abundancia del Mg dificulta la concentración de litio en el proceso de evaporación y conduce a la precipitación prematura del litio como una impureza en las sales de Mg dificultando de esta manera su recuperación.

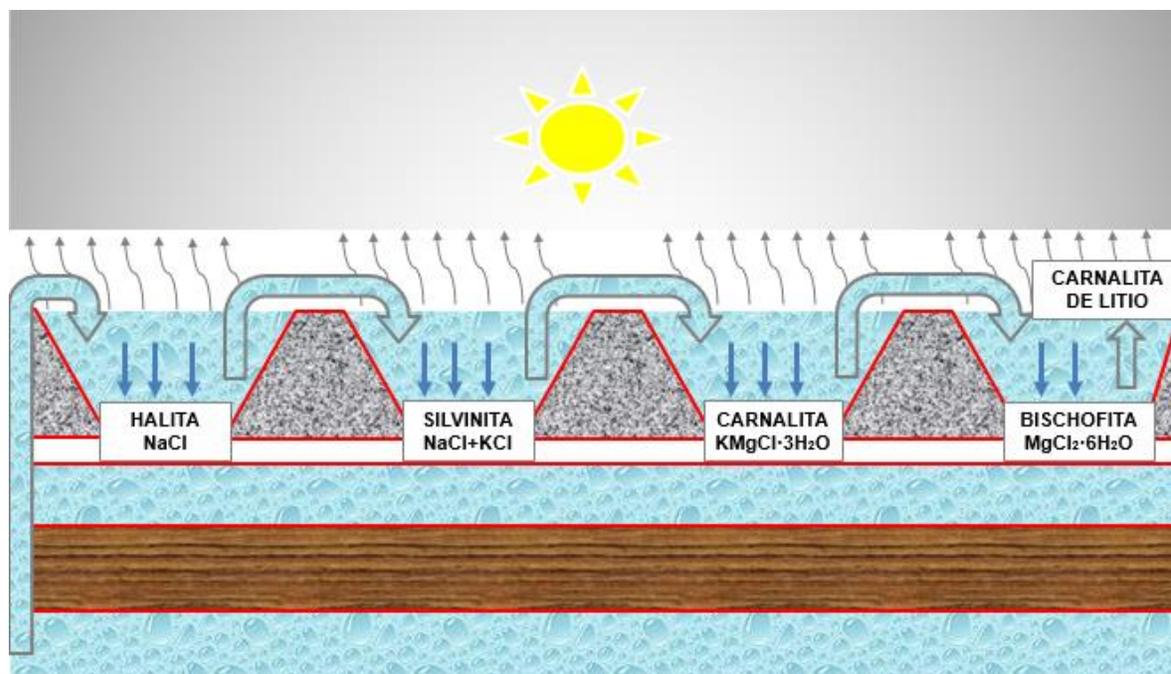


Figura 4. Piscinas de evaporación para la concentración de salmueras

Fuente: Modificado de GRNE, 2016

La bischofita se utiliza principalmente como estabilizador químico de suelos porque reduce el deterioro de la capa superficial de rodadura a cierto espesor y controla la emisión de polvo. También es usado como fuente de Mg para la fabricación de hidróxido de Mg (Kondakov & Danilov, 2007), como material de cambio de fase en el almacenamiento de energía térmica combinado con polietilenglicol para la fabricación de baterías (Gutierrez et al., 2015), en la industria farmacéutica para la curación de heridas (Majorova et al., 2018). Sin embargo, en

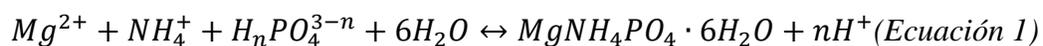
ningún estudio se ha considerado su uso como potencial fuente de Mg para la producción de estruvita como fertilizante.

5.4.2.4. Partícula semilla

En la cristalización de estruvita, la partícula semilla controla la nucleación de los iones, ya que proporciona un área de superficie que actúa como una plantilla sobre la cual se acumulan los cristales (Kataki et al., 2016). La adición de partículas semilla puede aumentar la velocidad de cristalización de la estruvita, especialmente para soluciones con una relación de sobresaturación inferior. Diferentes materiales se pueden usar como partícula semilla, por ejemplo: arena, mallas de acero inoxidable o cristales de estruvita formados anteriormente. Es necesario colocar algún tipo de partícula semilla cuando no se trabaja en condiciones de laboratorio para favorecer la nucleación de los cristales (Y. Liu, Kwag, Kim, & Ra, 2011; Shimamura, Tanaka, Miura, & Ishikawa, 2003).

5.4.3. Producción de estruvita por el método fisicoquímico

La estruvita se forma como cristales que precipitan naturalmente cuando existe una relación equimolar de Mg^{2+} : NH_4^+ : PO_4^{3-} (Le Corre et al., 2009), tal como se muestra en la ecuación 1:



5.4.3.1. Mecanismo de formación

La formación del cristal de estruvita es un proceso complejo que depende de muchos factores, como: los componentes del cristal (Mg^{2+} , NH_4^+ y PO_4^{3-}) que deben encontrarse en el medio en concentraciones equimolares; se requiere elevar el pH del medio, ya que el ion Mg^{2+} es insoluble en ambientes alcalinos contribuyendo así a la precipitación de amonio y fosfato; es necesario cierto grado de agitación y la temperatura no debe exceder los 35°C para que la tasa de precipitación no disminuya (Le Corre, Valsami-Jones, Hobbs, & Parsons, 2005; Le Corre et al., 2009). En estas condiciones, 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 ($1,41 \cdot 10^{13}$) y da comienzo el crecimiento del cristal (Hjorth, Christensen, Christensen, & Sommer, 2011).

El inicio de la formación de los cristales de estruvita ocurre de manera general en dos pasos:

1. **Nucleación primaria**, este paso a su vez se divide en dos mecanismos: La nucleación primaria homogénea, que corresponde a la aparición de núcleos directamente en la solución supersaturada. Y la nucleación primaria heterogénea, que es inducida por partículas semilla (como la arena).
2. **Nucleación secundaria**, también denominada nucleación verdadera, en esta etapa se requiere tener núcleos primarios sobre los cuales se forman más núcleos en la superficie.

Una vez iniciada la nucleación de los cristales de estruvita, sigue el crecimiento de los cristales y la agregación de los mismos, tal como se muestra en la figura 5.



Figura 5. Ilustración esquemática del mecanismo de formación de la estruvita a pH constante
Fuente: modificado de Ye, et.al., 2014

Los parámetros fisicoquímicos que favorecen la formación de estruvita son los mismos que pueden afectar el proceso de formación, además de: la agitación, que si bien reduce el tiempo de inducción requerido para la precipitación de los cristales de estruvita también disminuye el tamaño de los cristales, lo que puede dificultar la separación de la estruvita del sustrato (Ronteltap et al., 2010); también los iones competitivos como el calcio que reducen la concentración de iones fosfato y Mg en el medio, porque precipita en forma Hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$ y Dolomita $[\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2]$, respectivamente (Le Corre et al., 2005), haciendo que la precipitación de estruvita sea difícil e incluso inhibida (Sánchez-Román et al., 2007).

5.4.4. Producción de biológica de estruvita (o bioestruvita)

La biomineralización tiene un rol importante en los ciclos biogeoquímicos y los mecanismos que controlan este proceso dependen más de las condiciones ambientales que de la actividad de un tipo de organismo en particular (González-Muñoz et al., 2010), un ejemplo claro es la formación de estruvita.

La estruvita no es un mineral abundante en la naturaleza y solo se ha encontrado asociado con ambientes donde abunda materia orgánica en descomposición, elevada concentración de nutrientes y pH elevado. Se ha descrito varios ambientes naturales donde los microorganismos inducen la formación de estruvita (o bioestruvita) como: establos, suelos de cementerios, orillas de lagos ricos en materia orgánica (Sánchez-Román et al., 2007), el esclerocio de algunos hongos (Nelson et al., 1991), frecuentemente en filtros en plantas de tratamiento de agua (A. Rivadeneyra et al., 2014), biofilms bacterianos (Czichos & Saito, 2006), conductos del sistema urinario de mamíferos (Eisner, Deshmukh, & Lange, 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 (Albuquerque et al., 2010; Sánchez-Román et al., 2007), esta información resulta útil para identificar sitios adecuados para aislar bacterias con capacidad de inducir la formación de bioestruvita.

La biomineralización de la estruvita ocurre en presencia de microorganismos con la capacidad de mineralizar el P y además en las condiciones específicas descritas anteriormente. Sin embargo, la estruvita es un mineral metaestable por lo que solo se registra su presencia cuando existe las condiciones ambientales apropiadas (Delgado et al., 2013).

5.4.4.1. Microorganismos productores de estruvita

Existen más de 200 especies relacionadas con la formación de estruvita, las cuales se han encontrado asociadas con microorganismos ureasa positiva. La tabla 4 muestra una lista de los microorganismos reportados:

Tabla 4. Microorganismos productores de estruvita.

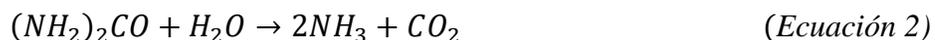
Microorganismo		Especie	Referencia
Bacterias	Gram (+)	Especies de: <i>Flavobacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Peptococcus asaccharolyticus</i> , <i>Clostridium tetani</i> , <i>Trichococcus flocculiformis</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> , <i>Salibacillus salexigens</i>	(Eisner et al., 2014; Gonzalez-Martinez et al., 2015; Nelson et al., 1991; Robinson, Dickie, Rose, & Stapleton, 1995; Sánchez-Román et al., 2011; Soriano, Ponte, Santamaria, Castilla, & Fernandez Robla, 1986; Tauch et al., 2008)
	Gram (-)	Especies de: <i>Proteus</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Brucella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Marinomonas</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Idiomarina</i> , <i>Myxococcus</i> , <i>Providencia stuartii</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bacteroides corrodens</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Halobacterium salinarum</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Chromohalobacter marismortui</i> , <i>Desulfotignum phosphitoxidans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , <i>Ochrobactrum anthropi</i> .	(Beavon & Heatley, 1962; Eisner et al., 2014; A. Rivadeneyra et al., 2014; M. A. Rivadeneyra, Ramos-Cormenzana, & García-Cervigón, 1983; Sánchez-Navas, Martín-Algarra, Rivadeneyra, Melchor, & Martín-Ramos, 2009; Sánchez-Román et al., 2007, 2011; Schink, Thiemann, Laue, & Friedrich, 2002; Soares et al., 2014; Zammit, Sánchez-Moral, & Albertano, 2011; Zhu et al., 2012)
Mycoplasmas		<i>Mycoplasma cepa</i> T, <i>Ureaplasma urealyticum</i>	(Eisner et al., 2014)
Levaduras		Especies de: <i>Cryptococcus</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Sporobolomyces</i> , <i>Candida humicola</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i>	(Eisner et al., 2014)

No existe una relación directa entre la capacidad de producir estruvita y la cercanía taxonómica (M. Rivadeneyra, Pérez-García, & Ramos-Cormenzana, 1992). Sin embargo, la mayoría de las bacterias que son capaces de inducir la formación de estruvita son Gram (-) y pertenecen a la clase *Alphaproteobacteria* (M. Rivadeneyra et al., 1992; Sánchez-Román et al., 2007).

5.4.4.2. Mecanismo de formación

La biomineralización de la estruvita sigue un mecanismo similar al proceso fisicoquímico (descrito en la sección 5.4.3.) e involucra a las mismas moléculas que participan en la formación de estruvita. A diferencia del método fisicoquímico, las bacterias juegan un rol activo en la mineralización de la estruvita, constituyen núcleos heterogéneos para la precipitación de los cristales, mediadores activos en el proceso y la actividad metabólica de las bacterias suministra iones amonio, necesarios para la formación del mineral (Sánchez-Román et al., 2007).

La formación de bioestruvita comienza cuando las bacterias degradan proteínas o urea para obtener energía, como resultado de esta actividad metabólica se libera ión amonio al medio circundante, como se describe en las siguientes ecuaciones:



El amonio en medio acuoso da lugar a la formación de NH_4OH , que eleva el pH del medio y disminuye la solubilidad del Mg y fosfato (Mclean, Downey, Clapham, & Nickel, 1990). Este mecanismo favorece la precipitación de la estruvita como describe la ecuación 1, e inicia la formación de núcleos primarios, cristales y agregados de estruvita.

Para una comprensión más clara de lo que sucede durante el proceso de formación de bioestruvita, a continuación, se explican los posibles mecanismos mediados por microorganismos:

1. Núcleos biológicos

Los microorganismos pueden servir como núcleo para la precipitación mineral, los posibles mecanismos de formación han sido estudiados principalmente en bacterias, se sabe que la precipitación de estruvita sucede mediante la adsorción de cationes alrededor de la membrana externa, cápsula, pared celular o sobre sustancias poliméricas extracelulares que poseen lipopolisacáridos y péptidoglicanos (figura 6). Todos estos componentes comparten una característica en común y es que tienen grupos funcionales expuestos con carga que crean un microambiente que favorece la adsorción de iones como el NH_4^+ o Mg^{+2} (Eisner et al., 2014; M. Rivadeneira et al., 1992; Sadowski et al., 2014; Sánchez-Román et al., 2007) generando una supersaturación localizada de estos iones alrededor de la bacteria (Beavon & Heatley, 1962;

Mclean et al., 1990). Este proceso da como resultado la acumulación de estruvita en el exterior de las células (Ben Omar, Entrena, González-Muñoz, Arias, & Huertas, 1994). Cuando las bacterias mueren se degradan por la acción de autolisinas con la consecuente liberación de amonio y esto nuevamente induce la formación de más bioestruvita y el crecimiento del cristal en capas concéntricas (Ben Omar et al., 1996; Nelson et al., 1991; Prywer & Torzewska, 2010).

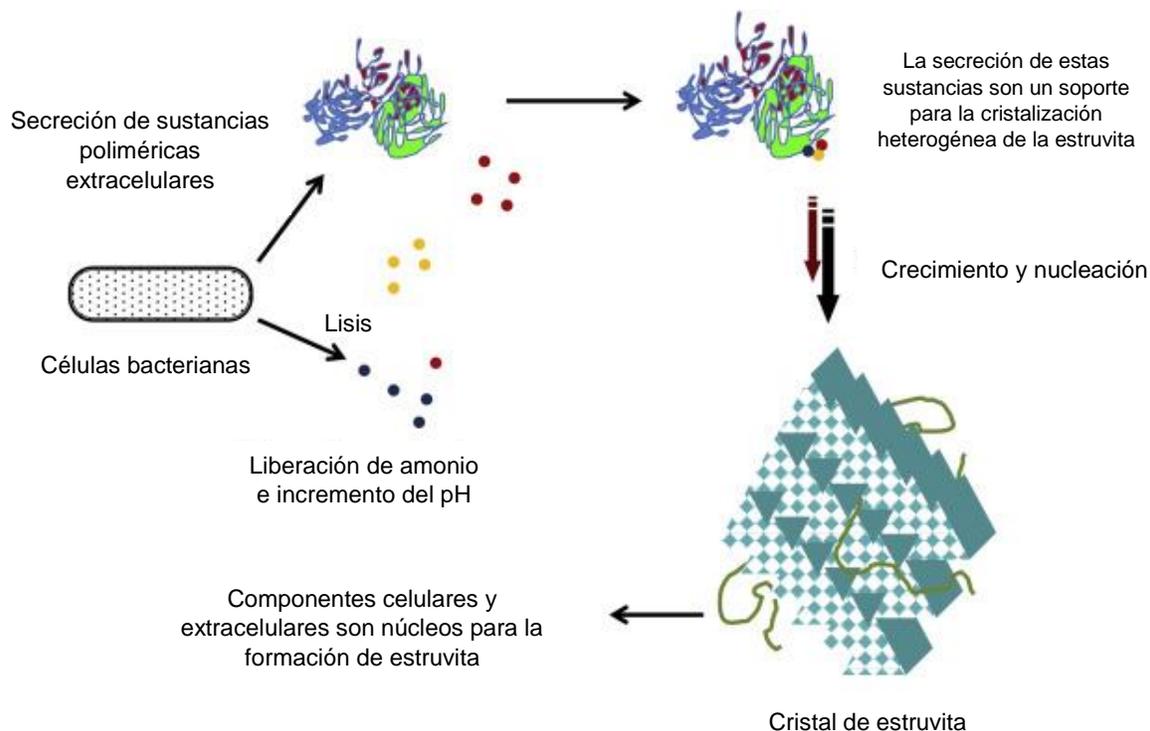


Figura 6. Representación esquemática del probable mecanismo de formación de bioestruvita sobre células bacterianas.

Fuente: Adaptado de (Sinha, Singh, Kumar, & Khare, 2014)

2. Actividad enzimática

Los microorganismos son una valiosa fuente de enzimas hidrolíticas como amilasas, proteasas, lipasas, celulasas, xilanasas, pectinasas y ureasas, exhibiendo inclusive actividades combinadas (Arias, Cisternas, & Rivas, 2017; Karray et al., 2018). La ureasa y la proteasa son activas en una gran diversidad de microorganismos y les permite utilizar la urea y las proteínas como fuente de N y energía (Burbank, Weaver, Williams, & Crawford, 2012; Sadowski et al., 2014). Los microorganismos con actividad ureasa están relacionados con la capacidad de formar cristales como la calcita, aragonita, estruvita, entre otros minerales (Arias et al., 2017). La figura 7 detalla la capacidad de los microorganismos ureolíticos, a través de la actividad ureasa para catalizar la

hidrolisis de la urea, generando ácido carbónico y amonio, que incrementan el pH del medio (Christensen, 1946; Mclean et al., 1990) y de esta manera se promueve la formación de bioestruvita.

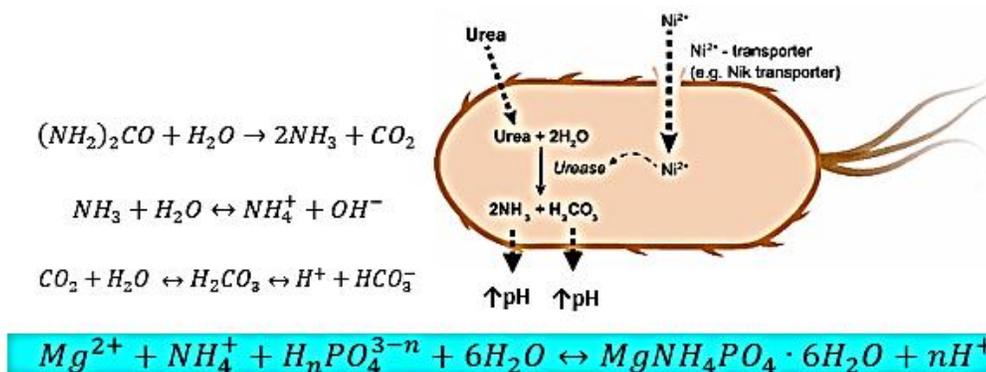


Figura 7. Reacciones catalizadas por microorganismos ureolíticos para mediar la formación de bioestruvita

Fuente: Adaptado de: (Sigurdarson, Svane, & Karring, 2018)

5.4.5. Producción de bioestruvita

Se ha reportado que la producción de bioestruvita constituye una tecnología económicamente factible en comparación con los métodos químicos u otros métodos biológicos convencionales para la recuperación de P, ya que no requiere la adición de agentes químicos para la precipitación del P. Entre otras ventajas, la eficiencia de remoción de P es elevada, se puede recuperar P a partir de una diversidad de fuentes como: aguas y lodos provenientes de plantas de tratamiento, desechos y residuos animales como heces y huesos, provenientes de la industria cárnica, y subproductos industriales como el suero lácteo, a partir de la industria láctea, por lo que también se convierte en una tecnología amigable con el medio ambiente (Shu, Schneider, Jegatheesan, & Johnson, 2006). A pesar de que esta tecnología está siendo ampliamente investigada en las últimas dos décadas, actualmente su aplicación es limitada (Li et al., 2019) debido principalmente a la obtención directa de la roca fosfórica, que es la principal fuente de P en el mundo pero que sin duda es un recurso limitado y no renovable (Jaffer, Clark, Pearce, & Parsons, 2002).

La rentabilidad de las tecnologías de recuperación de P a partir de aguas residuales, como tecnología de producción de bioestruvita, considera también los beneficios ambientales ya que previene la descarga de P al medio ambiente (Molinos-Senante, Hernández-Sancho, Sala-

Garrido, & Garrido-Baserba, 2011). La eficiencia de recuperación de estruvita a partir de aguas residuales es de aproximadamente 1 kg de estruvita a partir de 100 m³ de efluente, considerando que una planta de tratamiento puede procesar 100 m³ de aguas residuales por día, la cantidad de estruvita obtenida por día puede ser aplicada como biofertilizante en una superficie de 2.6 hectáreas de tierra cultivable. Si el P en forma de estruvita podría recuperarse de las plantas de tratamiento a nivel global, 0,63 millones de toneladas de P anualmente reducirían la extracción de roca fosfórica en un 1,6 %. Por lo tanto, esta tecnología podría brindar oportunidades para recuperar P de manera sostenible de las corrientes de desechos, preservar las reservas de P y reducir su inminente impacto ambiental (Shu et al., 2006).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Microorganismos

El consorcio microbiano criopreservado “BIOFOS” perteneciente al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) se utilizó en el presente trabajo para el aislamiento de bacterias mineralizadoras de estruvita, debido a que en un estudio previo se reportó la capacidad acumuladora de P por los microorganismos de éste consorcio, identificados como β -proteobacterias y α -proteobacterias (Pacheco & Alvarez, 2016).

6.2. Materia prima para la formación biológica de estruvita

6.2.1. Suero lácteo

Se colectaron 4 litros de suero lácteo en botellas de plástico, a partir del tanque de acumulación de la empresa láctea Flor de leche S.R.L., y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. El suero lácteo fue esterilizado pretratamiento por calor húmedo a 121 °C, 15 psi por 15 min y filtrado al vacío en condiciones estériles usando membranas de papel filtro (Whatman N° 1). El suero lácteo pretratado fue sometido a las siguientes determinaciones analíticas: DQO mg/L, Nitrógeno Total (NT mg/L), Nitrógeno amoniacal (N-NH₄ mg/L), Fosfato (P-PO₄ mg/L) y pH.

6.2.2. Cristales de bischofita

Bischofita en forma de cristales (1 kg) fue proporcionada por Yacimientos de Litio Bolivianos (YLB), obtenida de salmueras residuales del Salar de Uyuni. Los cristales fueron conservados en una bolsa herméticamente cerrada dentro de un desecador, antes y durante su uso. La composición iónica de (en %, p/p): litio (Li), sodio (Na), potasio (K), magnesio (Mg), calcio

(Ca), sulfato (SO₄), cloro (Cl), boro (B) y agua (H₂O) en los cristales de bischofita fue determinada mediante la técnica de espectroscopia de energía dispersa (EDS) por el Laboratorio de Análisis Químico de YLB de Llipi-Uyuni, Potosí.

6.3. Cultivo, aislamiento y selección de bacterias mineralizadoras de estruvita

6.3.1. Cultivo y aislamiento primario

Un criopreservado del consorcio “BIOFOS” fue activado en caldo soya tripticasa (TSB, Becton Dickinson, Francia) preparado de acuerdo a especificaciones del proveedor, 30 g/L se disolvieron en agua destilada y se ajustó el pH a 7,3 con NaOH (1M). 50 mL de medio en matraces Erlenmeyer (125 mL de capacidad) fueron esterilizados a 121 °C, 15 psi, por 15 min y mantenidos a 4 °C hasta su uso. Los matraces fueron inoculados al 3 % (v/v) con una suspensión del consorcio “BIOFOS” e incubados a 30 °C, 100 rpm por 24 horas.

Posterior a ello, se realizó el aislamiento primario de cepas bacterianas en agar soya tripticasa (TSA), cuya composición es similar al medio TSB con la adición de agar al 1,5 % (p/v). Un volumen de 100 µL del consorcio activo fue inoculado por estría y agotamiento en placas de TSA e incubado a 30 °C por 24 h. Se realizó un subcultivo de las colonias aisladas en TSA para obtener cultivos axénicos de cada morfotipo, considerando las características macroscópicas de las colonias (morfología, tamaño y color). Las características microscópicas de cada morfotipo se determinaron por tinción de Gram usando un microscopio óptico (Olympus CX31, Tokio-Japón) a una magnificación de 1000X (Alfaro, Crespo, & Alvarez, 2019).

6.3.2. Selección de cepas bacterianas mineralizadoras de estruvita

La selección de cepas bacterianas mineralizadoras de estruvita se realizó en función a las siguientes características: *a) Actividad ureasa, b) Actividad proteasa, c) Oxidación y/o fermentación de azúcares, d) Cinética de crecimiento en medio B41 y e) Producción de estruvita en medio B41.*

a) Determinación de la actividad ureasa. Se determinó cualitativamente la actividad ureasa de las cepas aisladas empleando agar urea de Christensen (Christensen, 1946; Downey, Nickel, Clapham, & McLean, 1992; Prywer & Torzewska, 2012), cuya composición para un litro fue: caldo urea base 9,0 g (Oxoid, Reino Unido), agar bacteriológico 15,0 g (Oxoid, Inglaterra) y urea 20,0 g (Scharlab, España). Todos los componentes fueron esterilizados a 121 °C, 15 libras por pulgada cuadrada (psi) por 15 min, excepto la solución de urea que

fue esterilizada por filtración empleando membranas de metilcelulosa de 0,45 μm de porosidad (Filter-Bio, China). Un volumen de 50 mL de solución de urea (400x) se adicionó al medio estéril a 40 °C. Posteriormente, el medio fue distribuido en tubos de ensayo (9,5x1,5 cm) para su solidificación como agar inclinado. El medio sólido fue inoculado por punción y estría con una colonia de cada morfotipo aislado. Los cultivos fueron incubados a 30 °C por 48 h y observados cada 12 h. La prueba se asignó como positiva cuando el indicador rojo fenol viró de color de amarillo ámbar a rosa brillante. Las cepas con actividad ureasa positiva fueron conservadas a -80 °C. Para ello, un inóculo bacteriano activo [$1,5 \cdot 10^9$ Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/mL] fue sembrado en medio TSB y se adicionó glicerol estéril al 25 % (v/v) como agente crioprotector (Moreno & Albarracín, 2012).

b) *Determinación de la actividad proteasa.* La actividad proteasa de los aislados bacterianos ureolíticos se evaluó cualitativamente en agar leche descremada, cuya composición para un litro fue: peptona (Oxoid, Inglaterra) 15,0 g, agar bacteriológico (Oxoid, Inglaterra) 15,0 g y leche descremada en polvo (Pil, Bolivia) 10,0 g. La leche descremada se esterilizó por calor húmedo de manera separada y se mezcló con los demás componentes en condiciones estériles a 45 °C. Las placas fueron inoculadas por punción con una colonia de cada morfotipo ureolítico e incubadas a 30°C por 24-72 h. La actividad proteasa positiva se determinó por la formación de un halo claro alrededor de las colonias (Olajuyigbe & Ajele, 2005; Wassif, Cheek, & Belas, 1995).

c) *Evaluación del metabolismo de carbohidratos mediante la prueba O/F (Oxidación /Fermentación).* La evaluación del metabolismo de carbohidratos se realizó en tubos con medio Hugh Leifson (Hugh & Leifson, 1953; Mirza et al., 2001) cuya composición para un litro fue: 2,0 g de peptona (Oxoid, Inglaterra), 5,0 g de NaCl (J.T. Baker, Mexico), 0,3 g de K_2HPO_4 (Scharlau, España), 0,3 g de agar bacteriológico (Oxoid, Inglaterra), 0,03 g de azul de bromotimol (Riedel De Haen, Austria), 10,0 g de cada carbohidrato [lactosa (Sigma Aldrich, Países Bajos), sacarosa (Sigma Aldrich, Italia) o glucosa (Riedel De Haen, Alemania)]. Todos los componentes se disolvieron en agua destilada, se ajustó el pH a 7,1 con NaOH (1M) y se esterilizó el medio a 121 °C, 15 psi por 15 min. Dos tubos con tapa rosca conteniendo el medio Hugh Leifson con el mismo carbohidrato (lactosa, sacarosa o glucosa) fueron inoculados con una colonia de cada cepa, mediante punción con aguja bacteriológica. Uno de los tubos fue cubierto con una capa de vaselina líquida estéril para

crear un ambiente anóxico, realizando este procedimiento para cada azúcar evaluado. Los tubos fueron incubados a 30 °C por 72 h y observados cada 24 h. El metabolismo fermentativo fue evidenciado por el viraje del indicador, azul de bromo timol, de verde a amarillo en ambos tubos. El metabolismo oxidativo fue evidenciado como positivo, por la ausencia o leve de viraje del indicador en la superficie del tubo abierto (de verde a amarillo) y sin cambios aparentes en el tubo cubierto. El metabolismo oxidativo lento fue evidenciado por el viraje del indicador de verde a azul en la superficie del tubo abierto permaneciendo por un tiempo considerable, antes de virar a amarillo.

d) *Determinación de la cinética de crecimiento bacteriano en medio B41.* Se determinó la cinética de crecimiento de aislados bacterianos seleccionados por su actividad ureasa y proteasa positivas y metabolismo oxidativo de lactosa. Para ello, se empleó el medio B41 (Simoes, Vale, Stephenson, & Soares, 2018b), cuya composición para un litro fue: Extracto de levadura (Oxoid, Reino Unido) 4,0 g, MgSO₄•H₂O (J.T. Baker, Mexico) 2,0 g y K₂HPO₄ (Scharlau, España) 2,0 g (Da Silva, Bernet, Delgenès, & Moletta, 2000). El pH del medio B41 fue ajustado a 7,0 ± 0,2 con NaOH (1M) y esterilizado a 121 °C, 15 psi por 15 min. Un volumen de 50 mL de medio B41 fue inoculado con una suspensión de cada aislado bacteriano (3·10⁸ UFC/mL) al 3% (v/v). Los cultivos fueron incubados a 30 °C, 100 rpm durante 48 h. Se colectaron muestras en intervalos de dos horas durante 24 h y a las 48 h, en condiciones asépticas dentro de una cabina de seguridad biológica clase II (NUAIRE, USA). Se determinó la turbidez de cada muestra a 600 nm de longitud de onda empleando un espectrofotómetro UV-Vis (Cary 50, Australia), además se registró la variación de pH a las 48 h, empleando un potenciómetro de mesa (OAKTON, Malasia). Se emplearon duplicados de cada cultivo y se incluyó un control abiótico.

e) *Evaluación de la producción de bioestruvita en medio B41 empleando cepas seleccionadas.* La producción de bioestruvita por los aislados bacterianos seleccionados fue evaluada. Para a ello, cada aislado fue cultivado en 40 mL de medio B41 [procedimiento descrito en la sección previa (d)], prolongando el tiempo de incubación a 15 días (Ben Omar et al., 1996; M. Rivadeneyra, Pérez-García, & Ramos-Cormenzana, 1993). Se incluyó como control positivo de producción de estruvita, una cepa de *Proteus mirabilis* (Chen et al., 2010; Prywer et al., 2012) provista por el Laboratorio de Microbiología del Hospital del Niño “Dr. Ovidio Aliaga Uría”. Adicionalmente, se empleó una suspensión de células

lisadas de cada aislado bacteriano como control negativo y un cultivo abiótico como control de medio. Posteriormente, se purificaron y analizaron los cristales de bioestruvita formados, tal como se describe en la sección 6.6.

6.4. Producción de bioestruvita a partir de subproductos industriales

6.4.1. Diseño de un medio de cultivo a base de suero lácteo y compuestos de N y Mg para la producción de bioestruvita

Para evaluar la producción de estruvita en un medio de cultivo diseñado a base de suero lácteo y diferentes fuentes de Mg y N, se establecieron dos tipos de proceso: 1) *Proceso biológico simultáneo de cultivo y producción de estruvita* y 2) *Proceso biológico separado de cultivo y producción de bioestruvita*.

6.4.1.1. Proceso biológico simultáneo de cultivo y producción de estruvita

Un diseño experimental de 6 ensayos fue establecido para evaluar la producción de bioestruvita concomitante al crecimiento bacteriano. Para ello, se empleó un medio de cultivo formulado en base a suero lácteo (75,52 g/L de DQO) y K_2HPO_4 2,0 g/L (o $P-PO_4$ 11,5 mM) y suplementado con diferentes tipos de fuente de Mg y N manteniendo constante la relación Mg: N (14,5 mM: 11,5 mM), como se detalla en la tabla 5. Las fuentes de Mg evaluadas fueron: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Scharlau, España) 3,6 g/L, $MgCl_2 \cdot 2H_2O$ (Scharlau, España) 3,0 g/L y cristales de bischofita (5,5 g/L). Las fuentes de N evaluadas fueron $(NH_4)_2SO_4$ (J.T Baker, México) 0,8 g/L o urea (Scharlau, España) 0,35 g/L. Cada ensayo del diseño experimental fue realizado por triplicado en matraces Erlenmeyer (125 mL de capacidad) conteniendo 40 mL de medio formulado, ajustado a pH $7,0 \pm 0,3$ con NaOH (1M). Cada matraz fue inoculado al 3 % (v/v) con la cepa seleccionada e incubado en agitación a 100 rpm, 30 °C por 15 días. Finalmente, la variación de pH, DQO remanente (mg/L), la producción de estruvita (purificación y caracterización de cristales, sección 6.5) y la concentración de fósforo remanente (mg/L) fueron determinados para estimar el porcentaje de recuperación de P en estruvita, según la ecuación 4.

$$Recuperacion\ de\ P\ (\%) = \frac{\Delta P (P\ inicial - P\ final)}{\frac{produccion\ de\ estruvita}{P\ inicial}} * 100 \quad (Ecuación\ 4)$$

Dónde:

P = concentración de fósforo en el medio (mg/L)

Producción de estruvita = cantidad de estruvita recuperada (mg/L)

Tabla 5. Diseño experimental para evaluar diferentes fuentes Mg y N para la recuperación de P en estruvita.

Nº de Experimento	Magnesio (mM)			Nitrógeno (mM)	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	MgCl ₂ ·2H ₂ O	Bischofita	(NH ₄) ₂ SO ₄	Urea
1	14,5			11,5	
2		14,5		11,5	
3			14,5	11,5	
4	14,5				11,5
5		14,5			11,5
6			14,5		11,5

Para cada experimento, suero lácteo con DQO de 70,4 g/L y P (11,5 mM) como K₂HPO₄ fueron empleados

6.4.1.2. *Proceso biológico separado de cultivo y producción de estruvita*

Un diseño experimental de 4 ensayos fue establecido manteniendo una relación constante de C: N: P de 100: 5: 1 y variando las proporciones de estos componentes. Para ello, se formularon medios en base a suero lácteo con concentraciones de DQO de 500, 2000, 8000 y 32000 mg/L; urea (44, 178, 711, 2843 mg/L, respectivamente); K₂HPO₄ (27, 111, 446, 1784 mg/L, respectivamente) y ajustando el pH a 7,0 ± 0,3. Estos ensayos fueron realizados por triplicado en matraces Erlenmeyer (125 mL de capacidad) conteniendo 40 mL de cada medio de cultivo formulado. Cada matraz fue inoculado al 3 % (v/v) con la cepa seleccionada e incubado a 30 °C, 100 rpm por 24 h. Se colectaron muestras en intervalos de dos horas para determinar la densidad óptica a 600 nm de longitud de onda, registrar la variación de pH, cuantificar el peso seco de la biomasa (mg/L) y DQO remanente (mg/L). Posteriormente, se estimó el rendimiento de la biomasa en función al consumo de sustrato ($Y_{x/s}$), según la ecuación 5.

$$Y_{x/s} = \frac{x_{\text{final}} - x_{\text{inicial}}}{\text{DQO}_{\text{inicial}} - \text{DQO}_{\text{final}}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Dónde:

x = biomasa

s = sustrato

La producción de estruvita fue inducida luego de las 24 h de cultivo al adicionar bischofita (5,5 g/L) y K₂HPO₄ (2,0 g/L) esterilizados por filtración. La formación de estruvita se llevó a cabo a 30 °C, 100 rpm durante 48 h. Finalmente, los cristales de estruvita purificados y caracterizados (sección 6.6), la variación de pH, la concentración fosfato remanente (mg/L) y DQO remanente

(mg/L) fueron determinados, además se evaluó el porcentaje de recuperación de P en estruvita, mediante la ecuación 4.

6.5. Separación y caracterización de cristales de estruvita

6.5.1. Separación de los cristales de estruvita

Los cristales de estruvita formados en cada experimento (sección 6.3.2 inciso e, 6.4.1 incisos 1 y 2, 6.8) se removieron de las paredes de cada matraz utilizando una espátula de plástico, los mismos fueron separados por filtración al vacío usando filtros de papel (Whatman N° 1) previamente secados a 37 °C por 2 h. Los cristales se lavaron con agua destilada alcalinizada con NaOH (1 M) ajustando el pH a 10,0 (Simoès, Vale, Stephenson, & Soares, 2018a; Simoès et al., 2018b). Los cristales recuperados fueron secados a 25 °C por 24 h, pesados y conservados en frascos de vidrio.

6.5.2. Caracterización de los cristales de estruvita

1. Microscopía

Para determinar la morfología de los cristales de estruvita, una cantidad aproximada de 0,01 g de cristales limpios y secos fue colocada sobre un portaobjetos y observada en un microscopio óptico (Olympus, Canadá) con una magnificación de 100X (Ben Omar et al., 1996, 1994).

2. Difracción de Rayos X

La identidad de los cristales de estruvita por difracción de rayos X (DRX) (Ben Omar et al., 1994; Chen et al., 2010) fue determinada por el laboratorio de Análisis Químico de YLB (Uyuni - Potosí). Los cristales se pulverizaron e irradiaron con luz monocromática de Cu ($1,5418 \text{ \AA}$, 40 kV y 35 mA) mediante un espectrofotómetro de fluorescencia de rayos X (Rigaku, Japón). Las condiciones de medición fueron: tamaño de paso de $0,02042^\circ$, escaneo de 2 a 60° para 2θ y velocidad respuesta de $2^\circ 2\theta$ por minuto (Bruker D8 Advance).

3. Espectrometría por dispersión de rayos X acoplada a microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS)

La composición de los cristales de estruvita mediante espectrometría SEM-EDS fue realizada por el laboratorio de Análisis Químico de YLB, para ello, los cristales de estruvita se depositaron sobre un adhesivo de carbón de doble cara plegado al porta muestras del equipo. El análisis se realizó a temperatura ambiente en un rango de 18 a 22 °C y una humedad relativa del 26-30 % mediante un espectrómetro fotoelectrónico de rayos X (Jeol, Japón) acoplado a un microscopio

electrónico de barrido de alta resolución con detector de electrones secundarios (Jeol, Japón). La presión de la cámara de vacío fue de $2 \cdot 10^{-2}$ Pa, con un voltaje de aceleración 10kV a 20kV.

6.6. Caracterización de la cepa bacteriana seleccionada

6.6.1. Caracterización fisiológica

6.6.1.1. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas evaluadas para la cepa bacteriana 2CANA incluyeron: **1) Oxidasa**, una tira impregnada con dicloruro de N, N-dimetil-1,4-fenilendiamonio (Oxoid, Australia) fue colocada sobre una colonia de la cepa 2CANA, el viraje del indicador azul de indofenol reveló la presencia de enzima citocromo oxidasa. Para las demás pruebas, una colonia de la cepa 2CANA fue inoculada por estría y agotamiento en los diferentes medios de cultivo que luego fueron incubados a 30 °C por 24 h. **2) Hemólisis en agar sangre**, para esta prueba se empleó placas de agar sangre, cuya composición para un litro fue: 10,0 g de infusión de corazón, 10,0 g de peptona, 5,0 g de NaCl, 15,0 g de agar y 10 % (v/v) de sangre humana adicionada al medio esterilizado a 45 °C. La formación de un halo de hemólisis alrededor de las colonias se asignó como prueba positiva. **3) Absorción de rojo congo**, para esta prueba se empleó placas de TSA suplementado con rojo congo (100µg/mL) (Yucel, Erdem, & Kaya, 2005). Las colonias de color rosado o rojo brillante fueron consideradas positivas a la captación de rojo congo. **4) Fermentación de lactosa**, para esta prueba se empleó agar Mac Conkey. La fermentación de lactosa se revela por el desarrollo de colonias de color rosado con precipitado visible al alrededor (Hantsis-zacharov & Halpern, 2007). **5) Producción de pigmentos de tipo flexirubina**, una colonia desarrollada en TSA fue depositada sobre un portaobjetos y se adicionó una gota de KOH al 20 % (p/v). La producción del pigmento tipo flexirubina se revela mediante un cambio de color inmediato de amarillo o naranja a púrpura o marrón (Bernardet, Nakagawa, & Holmes, 2002).

6.6.1.2. Perfil de sensibilidad a antibióticos

El antibiotipo de la cepa 2CANA fue determinado por el método de difusión en agar de Kirby-Bauer (Kirby, Sader, Walsh, & Jones, 2004). Una suspensión de bacteriana de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL fue inoculada por extensión y agotamiento en placas con agar Müller-Hinton empleando un hisopo estéril embebido con la suspensión bacteriana. Los discos de antibiótico se distribuyeron asepticamente y de manera equidistante, finalmente, las placas se incubaron a 30 °C por 24 h.

Los discos de antibióticos utilizados fueron: Levofloxacin (5 µg), Amoxicilina - Ac. Clavulánico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Imipenem (10 µg), Cotrimoxazol (25 µg), Cloranfenicol (30 µg), Tetraciclina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Aztreonam (30 µg) y Cefepime (30 µg). La interpretación de los halos de inhibición que determinaron la resistencia o sensibilidad a cada antibiótico evaluado se muestra en el Anexo 1.

6.6.2. Identificación genotípica

1. Extracción de ADN

Una colonia de la cepa 2CANA fue inoculada en 3,5 mL de TSB, el medio fue incubado a 30 °C, 100 rpm por 24 h. Posteriormente, 3 mL de la suspensión bacteriana fueron centrifugados a 5000 rpm por 5 min, el pellet fue resuspendido con 3mL de solución fisiológica estéril y nuevamente centrifugado (3 veces, 5000rpm por 5min). Para la extracción de ADN, se resuspendió el pellet en 1 mL de solución fisiológica estéril. El ADN fue extraído empleando el kit Promega (Wizard®) de acuerdo a especificaciones del proveedor (Lee, Kim, Liu, & Lee, 2003), la calidad del material genético extraído se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) a 100 V por 20 minutos.

2. Amplificación de la región hipervariable V1 y V2 del ADNr 16S por PCR convencional

La amplificación de la región hipervariable V1 y V2 del ADNr 16S (Gofton et al., 2015) se realizó con el primer universal 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ubicado en la posición 271-338 de la secuencia del ARNr 16S en *E. coli* (Baker, Smith, & Cowan, 2003; Yildirim et al., 2010). La reacción de amplificación se realizó con 18 µL de solución Master Mix constituida por: 0,05 U/µL de Taq polimerasa, 1x de buffer (Tris-HCl), 0,6 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs y 1,5 mM de MgCl₂ y se añadió 2 µL de ADN extraído (5 µg/mL). Las condiciones de amplificación del fragmente ADNr 16S por PCR convencional, fueron: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, 30 ciclos (95 °C por 30 s, 50 °C por 1 min, 72 °C por 40 s) y un ciclo a 72°C por 5 min. Posteriormente se realizó la corrida electroforética en geles de agarosa al 2% a 100 V por 20 minutos.

3. Secuenciación y análisis de datos

La secuenciación del producto de amplificación se realizó por el método de Sanger en un secuenciador 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) empleando los servicios de LABOGEN SRL. La secuencia obtenida fue analizada empleando BLAST del portal del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sobre la base de datos del gen 16S ADNr.

6.7. Determinaciones analíticas

6.7.1. Determinación de Fósforo

La determinación de P se realizó siguiendo el método azul de molibdato (Murphy J & Riley JP, 1962; Talboys et al., 2016). Donde 1 mL de muestra diluida (1/50 hasta 1/200) fue adicionada con 200 μ L de reactivo ácido, cuya composición fue: 125 mL de H₂SO₄ (5 N), 37,5 mL de molibdato de amonio (40 g/L), 75 mL de ácido ascórbico (0,1 M), 12,5 mL de tartrato de potasio y amonio (2,74 g/L); la mezcla fue homogenizada e incubada por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 882 nm de longitud de onda. La cantidad de P en las muestras fue estimada empleando una curva de calibración usando KH₂PO₄ como estándar, en concentraciones de: 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0 mg de P/L (Anexo 2).

6.7.2. Determinación de Nitrógeno amoniacal

La determinación de nitrógeno amoniacal se realizó por el método de Salicilato-Hipoclorito (Bower & Holm-Hansen, 1980; Krom et al., 2014). Para ello, a 1ml de la muestra diluida (1/10 hasta 1/200) se adicionó 120 μ L de solución de catálisis, cuya composición para un litro fue: 440 g de salicilato de sodio y 0,28 g de nitroprusiato de sodio. Se homogenizó la mezcla y se adicionó 200 μ L de solución alcalina-hipoclorito, compuesta por: 1 mL de hipoclorito de sodio (5 %) y 10 ml de una solución de NaOH 18,5 g/L con citrato de sodio 100 g/L. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en oscuridad por 60 min y posteriormente se determinó la absorbancia a 640 nm. La concentración de N-NH₄ en las muestras se determinó empleando una curva de calibración usando (NH₄)₂SO₄ como estándar, en concentraciones de: 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 mg amonio/ L (Anexo 3).

6.7.3. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La DQO se analizó siguiendo el método establecido por la APHA, 1985. A 2,5 mL de las muestras diluidas y dos blancos [uno digerido (BD) y otro no digerido (BND)] se adicionó 1,5 mL de Reactivo A (cuya composición para un litro fue: 4,2g de K₂Cr₂O₇, 167 mL de H₂SO₄ y

33,3 g de HgSO_4) y 3,5 mL de Reactivo B (10g de $\text{Ag}_2\text{SO}_4/\text{L H}_2\text{SO}_4$). Las muestras fueron digeridas a 150 °C por 120 min en un digestor (Thermo, China). Posterior a ello, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, y dos gotas del indicador (0,025 M de Ferroina) fueron añadidas antes de realizar la titulación con el Reactivo FAS (cuya composición para un litro fue: 39,2 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 20 mL de H_2SO_4). Posteriormente se estimó la DQO (mgO_2/L) mediante la siguiente fórmula:

$$DQO = \frac{(\text{BD} - \text{M}) \left(\frac{0,1 \cdot 1,5}{\text{BND}} \right) 8000}{2,5 \text{ mL}}$$

Dónde:

BD: volumen de titulante empleado para el blanco digerido (mL)

BND: volumen de titulante empleado para el blanco no digerido (mL)

M: volumen de titulante empleado para la muestra diluida (mL)

6.8. Proceso fisicoquímico de producción de estruvita

El proceso fisicoquímico de producción de estruvita fue evaluado para comparar su rendimiento respecto a la producción biológica. Para ello, se preparó una solución con la siguiente composición en g/L: K_2HPO_4 (Scharlau, España) 2,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (J.T. Baker, Mexico) 0,7 y bischofita 5,5 como fuente de Mg. Un volumen de 40 mL fue distribuido en matraces Erlenmeyer (125 mL) ajustando el pH a 8,0 con NaOH (1 M), los matraces fueron incubados a 30 °C, 100 rpm por 72 h. La producción de estruvita (cristales purificados y caracterizados, sección 6.6), la variación de pH y la concentración de fosfato remanente (mg/L) fueron determinados, para estimar el porcentaje de recuperación de P en estruvita, mediante la ecuación 4.

6.9. Análisis estadístico

Se utilizó el software estadístico R (versión 3.5.1) para el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y el test de Kruskal-Wallis con datos que no siguieron una distribución normal. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Bacterias mineralizadoras de estruvita

La mineralización bacteriana tiene un rol importante en los ciclos biogeoquímicos. Los microorganismos generan las condiciones para favorecer la formación de minerales mediante el incremento de la concentración de iones, la formación de estruvita es un claro ejemplo de este mecanismo (González-Muñoz et al., 2010). Las bacterias formadoras de estruvita promueven la liberación de amonio, a partir de la degradación de compuestos orgánicos nitrogenados, en el medio circundante (M. A. Rivadeneyra, Pérez-García, & Ramos-Cormenzana, 1992; Sánchez-Román et al., 2007). El incremento en la concentración de amonio repercute en el pH del (Da Silva et al., 2000; Tauch et al., 2008) que afecta la solubilidad del Mg (McClean et al., 1990) y promueve la precipitación de estruvita, estas condiciones son esenciales para la formación de estruvita. En base al fundamento descrito, se evaluó la capacidad de microorganismos para mineralizar estruvita. En ese sentido, 25 morfotipos bacterianos aislados a partir del consorcio microbiano “*BIOFOS*” (Anexo 4) fueron evaluados por su actividad ureasa, ya que se ha descrito ampliamente que el primer paso para la formación de bioestruvita es la generación de amonio a partir de la degradación de urea (Chen et al., 2010; Sachs, Kraut, Wen, Feng, & Scott, 2006). Es así que 9 cepas con actividad ureasa positiva fueron seleccionadas: 1ANA, 2CANA, 6ANA, 7ANA, 10ANA, 2AE, 5AE, 7AE y 5BAE y descritas en función a sus características fenotípicas y fisiológicas (tabla 6).

Además de la actividad ureasa se evaluó la actividad proteasa, la cual resultó positiva en 5 cepas (2CANA, 1ANA, 2AE, 7ANA y 6ANA) de las 9 con actividad ureasa. Se ha descrito que tanto la actividad ureasa como proteasa contribuyen a la liberación de NH_3 como subproducto, de $\text{NH}_4\text{-N}$ al medio y la formación de estruvita (Sadowski et al., 2014). Si bien estos efectos son similares a la actividad ureasa, también se ha demostrado que los microorganismos con actividad proteasa pueden utilizar compuestos orgánicos nitrogenados (proteínas y/o aminoácidos) como fuente de energía para su crecimiento (Leng, Colston, & Soares, 2020; Sadowski et al., 2014), para la producción biológica de estruvita representaría una ventaja para utilizar fuentes económicas de proteína como factor de crecimiento y selección de bacterias formadoras de estruvita, ya que la síntesis de estruvita por los microorganismos también depende del crecimiento microbiano y varias vías del metabolismo (Sinha et al., 2014).

En adición a la actividad ureasa, como prueba fisiológica de selección, la prueba OF (que permite determinar el metabolismo oxidativo y/o fermentativo de carbohidratos) reveló que, de las 9 cepas, 7 presentaron metabolismo oxidativo de lactosa y/o sacarosa: 1ANA, 2CANA, 7ANA, 10ANA, 2AE, 5AE y 7AE, las cuales fueron posteriormente estudiadas en función a sus parámetros cinéticos de crecimiento, producción de estruvita en medio B41 y actividad proteasa.

Diversos estudios indican que cuando los microorganismos alcanzan su fase estacionaria de crecimiento se inicia la formación de estruvita, produciendo mayores rendimientos en la fase de declinación, esto probablemente debido a que la lisis bacteriana genera amonio que induce mayor formación bioestruvita (Da Silva et al., 2000; Sánchez-Román et al., 2007; Simoes et al., 2018a). Entre los aislados que exhibieron mayor velocidad de crecimiento alcanzando fase estacionaria temprana, sobresalió la cepa 2CANA que además presentó mayor producción de estruvita ($3,55 \pm 0,11$ g/L) empleando el medio convencional B41 respecto a las demás cepas evaluadas. El análisis de ANOVA mostró una diferencia significativa en la producción de estruvita ($p < 0,001$), incluso fue ligeramente mayor que la cepa control *P. mirabilis* (Tabla 6, Anexo 5). Es posible que el inicio temprano de la fase de desaceleración de los 5 aislados evaluados (1ANA, 2CANA, 6ANA, 7ANA y 2AE) propició la formación de centros de nucleación constituyentes de los cristales de estruvita. La fase de desaceleración en periodos tempranos podría ser un criterio para seleccionar cepas formadoras de estruvita.

Tabla 6. Características fenotípicas y fisiológicas de los aislados bacterianos provenientes del consorcio “BIOFOS”.

CARACTERÍSTICA		CEPA									CONTROL
		2CANA	1ANA	10ANA	7AE	2AE	7ANA	5AE	5BAE	6ANA	<i>P. mirabilis</i>
Morfología macroscópica	Color	Amarillo Pardo	Amarillo Dorado	Amarillo	Blanco	Blanco	Amarillo	Blanco	Blanco	Amarillo Pardo	Blanco
	Tamaño	Mediano	Grande	Mediano	Grande	Mediano	Mediano	Pequeño	Pequeño	Grande	Mediano
	Consistencia	Mucoide	Viscoso	Viscoso	Viscoso	Viscoso	Creimoso	Creimoso	Seco	Viscoso	Viscoso
	Forma	Circular	Circular	Circular	Irregular	Circular	Circular	Circular	Irregular	Circular	Circular (swarming)
Morfología Microscópica		Bacilos Gram (-)	Diplococos Gram (+)	Bacilos Gram (-)	Bacilos Gram (-)						
Actividad ureasa		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Actividad proteasa		+	+	-	-	+	+	-	-	+	ND
Prueba O/F	Lac	-O	-O	-O	-O	F	-O	-O	nFnO	F	ND
	Sac	-O	F	F	-O	-O	F	-O	-O	F	ND
	Glu	F	F	F	F	F	F	F	F	F	ND
Velocidad de crecimiento μ (h ⁻¹)		0,89±0,15	0,64±0,31	0,40±0,03	0,60±0,01	0,40±0,03	0,43±0,03	0,64±0,07	ND	ND	ND
Inicio de la fase de deceleración (h)		10	10	20	20	15	20	20	ND	ND	ND
Estruvita (g/L) (*)		3,55±0,11	2,74±0,65	2,56±0,34	2,40±0,19	2,37±0,31	2,31±0,19	1,87±0,73	ND	ND	3,44±0,33

Positivo (+), negativo (-), no determinado (ND)

Azucares evaluados: lactosa (Lac), sacarosa (Sac), glucosa (Glu)

Metabolismo de carbohidratos: Fermentativo (F), oxidativo (O), oxidativo lento (-O), no fermentativo - no oxidativo (nFnO)

Cristales de estruvita colectados a los 15 días de cultivo.

7.2. Bioestruvita formada a partir de subproductos industriales

La producción de bioestruvita a través de la remoción de P y N de efluentes industriales representa una alternativa tecnológica, donde subproductos industriales pueden ser empleados para la formación de bioestruvita, un fertilizante de liberación lenta y con valor agregado. Existen varios estudios que han demostrado que es posible la recuperación de P y N a partir de residuos municipales, agrícolas e industriales mediante diferentes procesos químicos y físicos tales como: 1) *Precipitación química*, requiere la adición externa de Mg y ajuste de pH para propiciar la precipitación de estruvita (Le Corre et al., 2009). 2) *Método electroquímico*, requiere un material inerte como el platino para la generación de iones que eleven el pH del medio, por lo que no se requiere la adición de otros químicos (Fischer, Bastian, Happe, Mabillard, & Schmidt, 2011; C. Wang, Hao, Guo, & Loosdrecht, 2010). 3) *Método de intercambio iónico*, se basa en el intercambio selectivo de iones, la estruvita precipita en adición del Mg a pH controlado, un ajuste de concentración de iones y selección de la resina de intercambio iónico es necesario en este proceso (Liberti, Petruzzelli, & De Florio, 2001; Mijangos, Celaya, Ortueta, & Muraviev, 2013). Una alternativa a estos métodos convencionales de estruvita es la mineralización biológica mediada por microorganismos, que emplea una diversidad de sustratos que favorecen su recuperación en condiciones operacionales sencillas y con menor impacto en la utilización de agentes químicos.

En ese sentido, la estrategia innovadora de este trabajo de investigación se basó en la producción de bioestruvita, con microorganismos nativos como la cepa 2CANA (descrita anteriormente en la sección 7.1), empleando medios de cultivo diseñados a base de subproductos como el suero lácteo (un medio favorable para el crecimiento microbiano por su elevado contenido de DQO y contenido de P y N para la producción de estruvita) y bischofita (por su contenido de Mg), por ello fue importante caracterizar estos subproductos industriales a ser empleados como materia prima.

7.2.1. Suero lácteo

La tabla 7 muestra los parámetros fisicoquímicos del suero lácteo que se caracterizó por su contenido de DQO fue 70400 mg/L, P-PO₄ de 140,0 mg/L, NT de 1010,0 mg/L, N-NH₄ de 55,2 mg/L y pH de 4,5). Los parámetros obtenidos guardan estrecha relación con aquellos característicos del suero lácteo.

Tabla 7. Parámetros fisicoquímicos del suero lácteo colectado a partir del tanque de acumulación de la empresa “Flor de Leche S.R.L.”, La Paz-Bolivia en agosto de 2018.

Parámetro	Cantidad (mg/L)	Valores de referencia (mg/L)
DQO	70400	64000-94000
P-PO ₄	140	300-379
NT	1010	1020-1462
N-NH ₄	55	60
pH	4,5	4,0-7,0

Valores de referencia extraídos de (Gelegenis et al., 2007; Malaspina, Stante, Cellamare, & Tilche, 1995; Mawson, 1994; Van den Berg & Kennedy, 1983)

En consecuencia, al ser el suero lácteo un subproducto de la industria láctea con elevado contenido de C, N y P, podría ser empleado para la recuperación de P y N a través de la formación de estruvita (Lavanya, Sri, & Thanga, 2020). La recuperación de P y N del suero lácteo por precipitación de estruvita reduce la cantidad de lodo producido por métodos convencionales de tratamiento de P y N (Demirel, Yenigun, & Onay, 2005). Para lograr la formación de estruvita empleando suero lácteo se requiere adicionar una fuente externa de Mg debido a que su disponibilidad es limitada. En ese sentido, se evaluaron diferentes fuentes de Mg.

7.2.2. Bischofita

Actualmente existen diferentes fuentes naturales ricas en contenido de Mg, las cuales representan una alternativa económica al uso de reactivos químicos puros para la producción de estruvita (Kataki et al., 2016). La bischofita, constituida por $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, es una salmuera abundante en el Salar de Uyuni-Bolivia, considerada un subproducto de bajo costo, es obtenida en el último paso de concentración para la obtención de carbonato y cloruro de litio. En la actualidad su industrialización en el mundo va en aumento, pero en Bolivia la bischofita se comercializó solo entre el 2015 y 2016 como estabilizador de carreteras por la empresa pública YLB (Gerencia Nacional de Recursos Evaporíticos, 2015-2016). Una alternativa tecnológica para la bischofita podría ser la formación de estruvita dada su composición con elevado contenido de Mg.

La composición elemental de la bischofita en fase cristal proporcionada por YLB, detallada en la tabla 8, muestra que los componentes más abundantes son (en %, p/p): H₂O (54,05 %), Cl

(19,05 %), SO_4 (14,27 %), Mg (6,36 %) y Ca (5,28 %) y los componentes minoritarios son: Li (0,33 %), B (0,33 %), Na (0,19 %) y K (0,14 %), presentando una relación molar entre los elementos mayoritarios de: 2:1 de Cl:Mg, 6:1 de H_2O :Cl, 2:1 de Mg:Ca y una relación equimolar de Ca: SO_4 , lo que sugiere que las sales presentes en la bischofita corresponden a: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y CaSO_4 en una relación 2: 1, siendo el $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ la sal más abundante. Comparando las características de la bischofita que obtuvimos del Salar de Uyuni-Bolivia y la del Salar de Atacama-Chile reportada en el estudio de (Ushak et al., 2015), el único estudio que caracterizó la bischofita, se puede observar que las principales diferencias de composición están en la proporción de Ca, SO_4 y H_2O . El estudio de (Ushak et al., 2015) no muestra en sus resultados la cantidad de agua en la bischofita, sin embargo, la suma de todos los componentes fue de 46,7 %, lo que significaría que el resto (53,3 %) es agua y corresponde a la cantidad teórica presente en la estruvita. La variación de composición iónica de la bischofita depende de varios factores, como la región geográfica y/o localización exacta dentro de una región geográfica de la cual proviene la salmuera (Perez-Fernandez et al., 2016). La composición iónica en el salar de Uyuni tiene un gradiente de concentración de Norte a Sur, siendo la región Sur donde se encontró mayor contenido de Mg según lo reportado por (Perez-Fernandez et al., 2016). Así mismo la planta de extracción de Li se encuentra en el Sur, lo que coincide con la presencia de bischofita en la región Sur (Llipi) donde fue obtenida la muestra.

Tabla 8. Composición química de bischofita en fase cristal obtenida por YLB en el Salar de Uyuni, Bolivia en agosto de 2018 y valores de referencia del Salar de Atacama.

Componente	Salar de Uyuni	Salar de Atacama
	Cantidad (% p/p)	Valores de referencia (% p/p)
Li	0,33	0,30–0,35
Mg	6,36	10,84–11,45
K	0,14	0,26–0,30
Na	0,19	0,32–0,36
Ca	5,28	0,007–0,008
SO_4	14,27	1,29–1,51
Cl	19,05	33,66–34,92
B	0,33	-
H_2O	54,05	-

Valores de referencia extraídos de (Ushak et al., 2015)

La precipitación de la estruvita está limitada por la cantidad de Mg, su adición puede elevar hasta un 75 % el costo de la estruvita (Lahav et al., 2013). Una importante forma de reducir el costo de producción de estruvita es usar fuentes alternas de bajo costo. Diversas fuentes de Mg han sido utilizadas para reducir costos de producción de estruvita, entre ellas, agua de mar y salmueras marinas, minerales como magnesia calcinada (MgO), brucita (Mg(OH)₂), magnesita (MgCO₃) y ceniza de madera (Kataki et al., 2016). Estas fuentes han sido utilizadas debido a su abundancia, disponibilidad y bajo costo. La bischofita es una fuente de Mg disponible y abundante en la región sur del Salar de Uyuni. Además, es económico al ser un subproducto en el proceso de extracción de litio. Por estas razones podría ser utilizada para la producción de estruvita.

7.2.3. Bioestruvita en proceso simultáneo de cultivo y producción

La estrategia común de obtención de bioestruvita es el proceso simultáneo de cultivo y producción. Los medios de cultivo tienen los componentes necesarios para la formación de estruvita y los microorganismos son el factor biológico que media la formación de cristales de estruvita. Cuando los microorganismos alcanzan su fase estacionaria de crecimiento se inicia la formación de estruvita (Sánchez-Román et al., 2007), es por esta razón que en la mayoría de los estudios eligen realizar el proceso simultáneo de cultivo y producción de estruvita.

7.2.3.1. Efecto de la fuente de magnesio y nitrógeno en la remoción de fósforo y formación de bioestruvita

Diferentes factores influyen en la mineralización biológica de la estruvita (Le Corre et al., 2009), uno de ellos es el Mg, limitante en la precipitación de la estruvita, un componente importante que determina la precipitación de P (Stratful et al., 2001) y además permite generar cristales más grandes y numerosos (Beavon & Heatley, 1962; Jaffer et al., 2002). El Mg se une de forma sólida al NH₄ y al P durante la formación de estruvita por lo que determina la velocidad de formación inicial de la estruvita (Le Corre, Valsami-Jones, Hobbs, & Parsons, 2007). Por tal motivo la adición de Mg es indispensable para la producción de estruvita (Rahman et al., 2014).

Las fuentes más comunes de Mg son las sales de SO₄ y Cl, por ello, el sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄•7H₂O), cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂•6H₂O) y alternativamente bischofita (MgCl₂•6H₂O) fueron evaluados junto a una fuente de N [(NH₄)₂SO₄ o urea] en 6 ensayos [1) MgSO₄•7H₂O-(NH₄)₂SO₄, 2) MgCl₂•2H₂O-(NH₄)₂SO₄, 3)

Bischofita-(NH_4) $_2$ SO_4 , **4**) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -urea, **5**) $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -urea y **6**) *Bischofita*-urea; ver diseño completo en la tabla 5]. Estos ensayos fueron establecidos para evaluar el proceso de producción de bioestruvita simultáneamente al crecimiento bacteriano. Cada medio de cultivo formulado en base a suero lácteo fue suplementado con los diferentes tipos de fuente Mg y N mencionados previamente y manteniendo constante la relación molar Mg: N: P (1,3: 1: 1). En el estudio de (Jaffer et al., 2002) se encontró que se requería una proporción de Mg: N: P de 1,3: 1: 1 para garantizar la eliminación de P como estruvita, considerando que era la relación molar más adecuada si se pretendía escalar el proceso. La relación equimolar de Mg: N: P es necesaria para la formación de la estruvita, sin embargo, se ha reportado que experimentalmente esta relación molar puede diferir debido a que en presencia las diferentes especies químicas de P y N se pueden formar subproductos secundarios a la estruvita y un ligero incremento de la relación molar Mg: N: P, puede mejorar los porcentajes de remoción de N y P como estruvita (Çelen & Türker, 2001). En ese sentido y considerando que el suero lácteo fue empleado como base del medio de cultivo, tiene en su composición especies químicas orgánicas e inorgánicas de N y P; se empleó la relación molar Mg: N: P (1,3: 1: 1).

La recuperación de P como estruvita a partir de suero lácteo es un proceso poco estudiado, los reportes muestran el uso de métodos químicos como la precipitación con un álcali, la utilización de medios sintéticos, fuentes alterativas de Mg, así como, métodos fisicoquímicos como la electrocoagulación de suero lácteo ácido a 60 °C (Lavanya et al., 2020; Prieto-García et al., 2012). Pocos estudios han reportado métodos biológicos para recuperar P como estruvita a partir de aguas residuales lácteas (Escalante et al., 2017). El agua residual láctea se ha propuesto como medio de cultivo óptimo debido a su elevado contenido en proteínas y aminoácidos en procesos aerobios de producción de bioestruvita (Leng et al., 2020). En el presente estudio se evaluó la eficiencia de remoción de P durante el proceso biológico simultáneo de cultivo y producción de estruvita a través de seis ensayos descritos en la sección 6.4.1.1., los resultados de los ensayos 6, 4 y 3 presentaron los mayores porcentajes de remoción de P, que fueron de 53, 52 y 50 %, respectivamente (figura 8, tabla 9). Los resultados de los ensayos previamente mencionados sugieren que componentes del medio de cultivo pudieron afectar el crecimiento bacteriano y por tanto la formación de estruvita, ya que las bacterias son las mediadoras de la mineralización del P como estruvita, por lo que también se afectaría la remoción de P. Ahora bien, considerando que la disponibilidad de nutrientes es uno de los factores que influyen en el crecimiento

bacteriano y a pesar de que los medios de cultivo fueron diseñados con exceso de nutrientes provenientes del suero lácteo (DQO de 70400 mg/L y NT de 1010 mg/L) es muy posible que el exceso de materia orgánica haya limitado el desarrollo de la cepa 2CANA, y por tanto la efectividad en la remoción de P.

Así mismo, la tabla 9 muestra que la DQO final en todos los ensayos presentó un rango de variación de 65,45 g/L a 83,92 g/L (ensayo 3 y 1). Los resultados de este análisis reflejan una disminución de la concentración inicial de DQO (75,52 g/L) en todos los ensayos exceptuando el ensayo 1, pero solo en el rango inferior de variación de DQO con valores de 73,85 a 65,45 g/L. Se ha reportado en otros estudios que el elevado contenido de materia orgánica limita la transferencia de oxígeno en las células bacterianas (Ozmihci & Kargi, 2007) y reduce la tasa de formación de estruvita, pero aumenta el tamaño de los cristales de estruvita (Aurélie Capdevielle, Sýkorová, Béline, & Daumer, 2015). Este hecho determina que debe evaluarse el efecto de la concentración de DQO en la formación de estruvita, que también está asociada a la disminución de la carga orgánica, para la cepa 2CANA. Kim et al., (2014) observaron que la disminución del contenido de materia orgánica en aguas residuales sucede simultáneamente a la formación de estruvita e incluso contribuye a la co-precipitación de la estruvita.

Por otro lado, se evaluaron diferentes fuentes de Mg y N para verificar su efecto sobre la remoción de P. Respecto a la fuente de Mg, empleando bischofita se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción de P de 50 y 53 % (ensayos 3 y 6).

Interesantemente, se pudo además observar que la presencia de sulfato tanto en el ensayo 3 (bischofita y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) así como en el ensayo 4 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -urea) pudo haber favorecido la remoción de P y la formación de estruvita. Saidou, Korchef, Moussa, & Amor (2015) han reportado que los iones sulfato pueden mejorar la eficacia de recuperación de P como estruvita, favoreciendo la eliminación de agua e incrementando la cantidad de estruvita precipitada al mismo tiempo.

Por otro lado, en el análisis de los ensayos respecto a la fuente de N, la urea presentó mayores porcentajes de remoción de P, de 52 y 53 % en los ensayos 4 y 6. Ello puede ser atribuido a la actividad ureasa de la cepa 2CANA. La ureasa hidroliza la urea en amonio y agua. El amonio eleva el pH del medio y de esta manera se promueve la formación de bioestruvita.

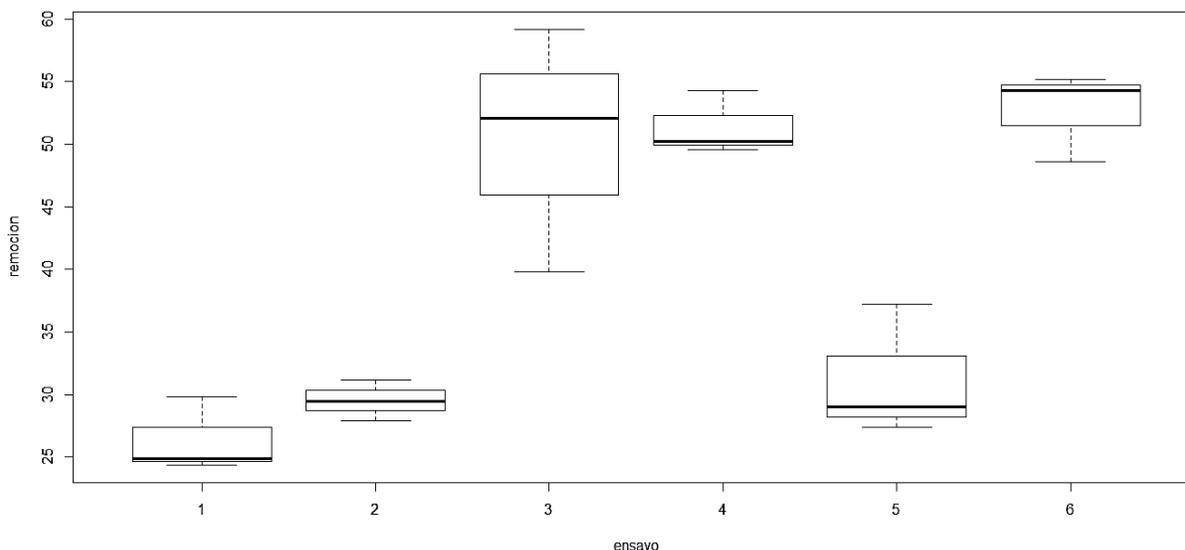


Figura 8. Porcentajes de remoción de P en medios formulados con suero lácteo de acuerdo al diseño experimental: **1)** $MgSO_4 \cdot 7H_2O - (NH_4)_2SO_4$, **2)** $MgCl_2 \cdot 2H_2O - (NH_4)_2SO_4$, **3)** *Bischofita* - $(NH_4)_2SO_4$, **4)** $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -urea, **5)** $MgCl_2 \cdot 2H_2O$ -urea y **6)** *Bischofita*-urea

El pH es otro factor importante para la formación de estruvita, debido a que la especiación de los componentes para la cristalización de estruvita depende del pH y la solubilidad la cual disminuye a medida que el pH se incrementa (Ohlinger et al., 1998). La producción biológica de estruvita puede ocurrir en un amplio rango de pH, de 7,0 a 8,4, por lo que es significativamente diferente a la precipitación química de la estruvita que ocurre a valores de pH mayores a 8,3, ello representa una ventaja en el proceso biológico (Pérez-García I., 1989; Simoes et al., 2018a). Al respecto, los resultados obtenidos mostraron un incremento del pH inicial (pH de 7,0) en todos los ensayos, el incremento de pH estuvo en un rango promedio de 0,28 a 0,75 (tabla 9). La formación de estruvita se observó en todos los ensayos y la máxima producción de estruvita ($4,57 \pm 1,08$ g/L) fue obtenido en el ensayo 6 a pH 7,28.

Tabla 9. Parámetros finales obtenidos en respuesta al efecto de la fuente de Mg y N en el proceso biológico simultáneo de cultivo y producción de estruvita a partir de suero lácteo con DQO inicial de 75,52 g/L y pH de 7,0.

Ensayo	Variación de pH	Rango de variación de DQO final (g/L)	Remoción P-PO ₄ (%)	Recuperación de P en forma de estruvita (%)	Estruvita (g/L)
1	0,75±0,08	75,52-83,92	26±3	18±3	1,99±0,29
2	0,64±0,07	73,85-78,88	30±2	18±2	2,30±0,35
3	0,48±0,05	65,45-82,24	50±10	28±6	3,76±0,68
4	0,75±0,13	70,49-80,56	52±3	20±4	5,62±1,18
5	0,44±0,08	73,85-75,52	31±5	22±3	2,04±0,25
6	0,28±0,02	68,81-77,20	53±4	26±9	4,57±1,08

En síntesis, los resultados obtenidos en este ensayo permitieron evidenciar la formación de bioestruvita en el proceso biológico simultáneo de cultivo y producción, empleando medios de cultivo diseñados a partir de suero lácteo, sin embargo, el exceso de nutrientes del suero lácteo pudo limitar la remoción de la materia orgánica por la cepa 2CANA y así mismo afectar la remoción de P como estruvita. Pese a ello, esta evaluación permitió identificar a la bischofita como una posible fuente de Mg para la formación de estruvita y así mismo a la urea como fuente de N-NH₄ debido a la actividad ureasa de la cepa 2CANA. Finalmente, el mayor rendimiento de estruvita fue obtenida a pH 7,28 en el ensayo 6 en el que se emplearon bischofita y urea.

7.2.4. Bioestruvita en proceso biológico separado de cultivo y producción

En muchos procesos naturales, la biomineralización microbiana exacta o el mecanismo de formación de cristales aún no se comprenden claramente (Sánchez-Román et al., 2011). Sin embargo, se sabe que los microorganismos crean las condiciones fisicoquímicas favorables para la formación de estruvita en medios donde se tiene componentes necesarios. En ese sentido, se consideró que es necesario brindar condiciones óptimas de crecimiento a la cepa 2CANA, en la primera fase de este proceso, antes de iniciar la segunda fase de formación de estruvita, como será descrito en esta sección.

7.2.4.1. Efecto de la DQO sobre la biomasa bacteriana

La formación de bioestruvita esta mediada por microorganismos y la densidad celular es un factor que afecta positivamente su formación (Da Silva et al., 2000). De esa manera se diseñaron

medios de cultivo a base de suero lácteo con la finalidad de incrementar la biomasa bacteriana manteniendo la relación C: N: P de 100: 5: 1, para mantener el entorno de vida microbiana aerobio (Rezakazemi, Maghami, & Mohammadi, 2018).

Considerando que la relación de C: N: P determinada en el suero lácteo fue de 100: 1,4: 0,2 (Anexo 6), existió un déficit de N y P en el suero lácteo, el cual fue compensado por la adición de urea (44, 178, 711, 2843 mg/L, respectivamente) y K_2HPO_4 (27, 111, 446, 1784 mg/L, respectivamente), de esta manera el medio a base de suero lácteo se constituyó en un componente importante para el desarrollo de la biomasa microbiana. El desarrollo de la biomasa microbiana es un factor crucial en la producción de bioestruvita puesto que cada célula microbiana puede servir como centro de nucleación primaria (Barbosa et al., 2016; González-Muñoz et al., 2008; Mclean et al., 1990).

1. Primera fase del proceso

En una primera fase del proceso biológico separado de cultivo y producción, durante el crecimiento de la cepa 2CANA, se determinó un incremento del pH concomitantemente al incremento de la biomasa en el tiempo. A las 24 h de incubación los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento y además se detectó los niveles más altos de $N-NH_4$. Diferentes estudios demuestran que la formación de estruvita inicia cuando se alcanza la fase estacionaria, esto estaría relacionado con la liberación máxima de amonio al medio, debido a la actividad ureasa, la actividad proteasa y la lisis celular que también promueven la liberación de amonio, favoreciendo así la formación de estruvita (Eisner et al., 2014; Nelson et al., 1991; Prywer & Torzewska, 2010).

La tabla 10 muestra una correlación entre el incremento del peso seco y la velocidad de crecimiento en todos los ensayos. En el ensayo 3, cuando la DQO del medio de cultivo fue de 8000 mg/L la velocidad de crecimiento (μ) fue de $0,2 h^{-1}$, el peso seco de la biomasa formada fue de 1,3 g/L y el rendimiento de la biomasa en función al consumo de sustrato $Y_{x/s}$ fue 0,5 (g/g). Este resultado es importante porque sugiere que en esas condiciones se alcanzó el máximo rendimiento esperado en condiciones de cultivo aerobio. Respecto al pH en los medios de cultivo, en todos los casos el valor incrementó en un rango de 8,1 a 9,1, esto sugiere que la cepa

2CANA tiene la capacidad de oxidar la lactosa del suero lácteo y por otro lado la liberación de iones amonio que es debida a las actividades ureasa y proteasa.

Tabla 10. Parámetros de crecimiento obtenidos en medios de cultivo diseñados C: N: P (100:5:1) durante la primera fase del proceso biológico separado de cultivo y producción.

ENSAYO	RELACIÓN DE C:N:P (100:5:1) EN EL MEDIO DE CULTIVO					PRIMERA FASE (CULTIVO BACTERIANO) PARAMETROS DE CRECIMIENTO			
	DQO inicial (mg/L)	DQO 24 h (mg/L)	P-PO ₄ inicial (mg/L)	P-PO ₄ 24 h (mg/L)	N-NH ₄ 24 h (mg/L)	μ (h ⁻¹)	Biomasa Peso seco (g/L)	pH (24 h)	Y _{x/s}
1	500	170,8±150	4,8	2,0±0,2	20,8±0,2	0,02	0,3	8,12±0,07	0,1
2	2000	1381,5±150,3	19,8	4,2±1,7	15,5±0,2	0,02	0,3	8,57±0,01	0,2
3	8000	4038,4±150,3	79,4	26,1±1,1	192,2±46,2	0,2	1,3	9,10±0,00	0,5
4	32000	19129,2±751,5	317,5	95,8±8,0	612,9±16,2	0,3	1,7	9,09±0,16	0,3

2. Segunda fase del proceso

En la segunda fase del proceso biológico separado de cultivo y producción, formación de estruvita, se evaluó la producción de bioestruvita y la remoción de N y P. La precipitación de N y P como estruvita es una alternativa al proceso convencional de remoción biológica de N y P en aguas residuales (nitrificación, eliminación biológica mediada por PAOs). Diferentes estudios investigaron el efecto del N-NH₄ en la precipitación de la estruvita, donde se ha visto que la eficiencia de eliminación de P como estruvita aumenta cuando la relación molar de N es igual o mayor a la de P, además un mayor grado de sobresaturación de N y P en solución también mejora la precipitación de la estruvita (A Capdevielle, Sýkorová, Biscans, Béline, & Daumer, 2013; J. C. Liu, 2009). En ese sentido, la precipitación de N como estruvita se evaluó mediante la remoción de N-NH₄. La tabla 11 muestra que el ensayo 3 obtuvo la máxima remoción de N-NH₄ (82 %). El ensayo 3 inició la segunda fase de producción de bioestruvita con la relación molar Mg: N: P de 1,3: 0,9: 1, esta relación molar puede explicar que se haya obtenido un alto porcentaje de remoción de N-NH₄ ya que es muy parecida a la relación molar 1,3: 1: 1, considerada como la más adecuada para garantizar la eliminación de P como estruvita. La cantidad de amonio liberada en la primera fase (45 %) contribuyó a que en el ensayo 3 se haya obtenido la relación molar Mg: N: P de 1,3: 0,9: 1. (A Capdevielle et al., 2013) ha reportado que el N-NH₄ es un factor limitante en la producción de estruvita debido a que acelera la tasa de nucleación de la estruvita y mejora la capacidad amortiguadora del medio. La remoción de

amonio en el ensayo 4 fue posible debido a que la relación molar N: P de 3:1 que también favorece la formación de estruvita.

En esta fase de producción de estruvita, los mayores porcentajes de remoción y recuperación de P como estruvita fueron obtenidos en los ensayos 3 y 4 (94 y 93 %). Así mismo, fueron los ensayos en los que se recuperó las mayores cantidades de estruvita (3,5 y 5,7 g/L).

Tabla 11. Segunda fase del proceso biológico separado de cultivo y producción de estruvita.

PARAMETROS	ENSAYO			
	1	2	3	4
DQO 72 h (mg/L)	319,5±13,6	1364,6±126	2386,3±58,2	19200±2327,4
Remoción DQO (%)	60±36	35±6	71±1	22±9
pH 72 h (final)	6,86±0,02	7,46±0,00	8,72±0,03	9,37±0,01
NH ₄ inicial 24 h (mg/L)	20,8	15,5	192,2	612,9
NH ₄ final 72 h (mg/L)	39,8±12,5	20±0,4	33,5±2,5	504,2±159,5
Remoción NH ₄ (%)	0±6	0±3	82±1	18±26
Liberación de NH ₄ 24 h (%)	79	15	45	36
P-PO ₄ 24 h (mg/L)	200,8±10,5	200,8±10,2	200,8±10	463,2±32,5
P-PO ₄ final 72 h (mg/L)	128,6±11,2	85,3±1,2	11,2±14,1	33±44,3
Remoción P (%)	36±6	58±1	94±7	93±19
Recuperación P como estruvita (%)	36±6	58±1	94±9	93±10
Relación Mg: N: P (mM)	1,3: 0,1: 1	1,3: 0: 1	1,3: 0,9: 1	1,3: 3: 1
Estruvita (g/L)	1,0±0,04	1,9±0,13	3,5±0,31	5,1±0,7

Si bien la formación máxima de bioestruvita fue de 5,1 g/L en el ensayo 4, la estruvita formada en el ensayo 3 (3,5 g/L) fue obtenida cuando se alcanzó la máxima biomasa 1,3 g/L de peso seco, lo que probablemente permitió un mayor porcentaje de remoción de DQO, P y amonio (ver tabla 11) para los fines determinados de biorremediación. Por consiguiente y de acuerdo al consenso que se persigue entre la remoción de la materia orgánica y la formación de bioestruvita, las características culturales (nutricionales y fisicoquímicas) del ensayo 3 fueron seleccionadas como la más óptima.

7.3. Características de los cristales de estruvita

La formación de cristales de estruvita depende de un conjunto de factores fisicoquímicos, a saber: pH, agitación, temperatura, tamaño de los cristales, grado de sobresaturación de los componentes y presencia de impurezas. De estos parámetros, el grado de sobresaturación de los componentes (P y N) y el pH son considerados los factores más importantes para la cristalización de estruvita (Sharma et al., 2018), ya que la actividad iónica de los iones NH_4^+ y PO_4^{3-} modifican el pH (Matynia, Koralewska, Wierzbowska, & Piotrowski, 2006; Wietelmann & Klett, 2018). Los cristales de estruvita obtenidos empleando el medio B41, observados a 100X, fueron de color blanco, aspecto brillante, geometría regular, largos y cilíndricos, semejantes a prismas agrupados (figura 9A) tal como se ha descrito por (Da Silva et al., 2000). En medios formulados con suero lácteo durante los procesos biológicos simultáneo y separado de cultivo y producción de estruvita los cristales fueron observados a 40X debido al mayor tamaño a los cristales, las características que exhibieron fueron similares a los obtenidos en medio B41, pero no agrupados (figura 9B y 9C).

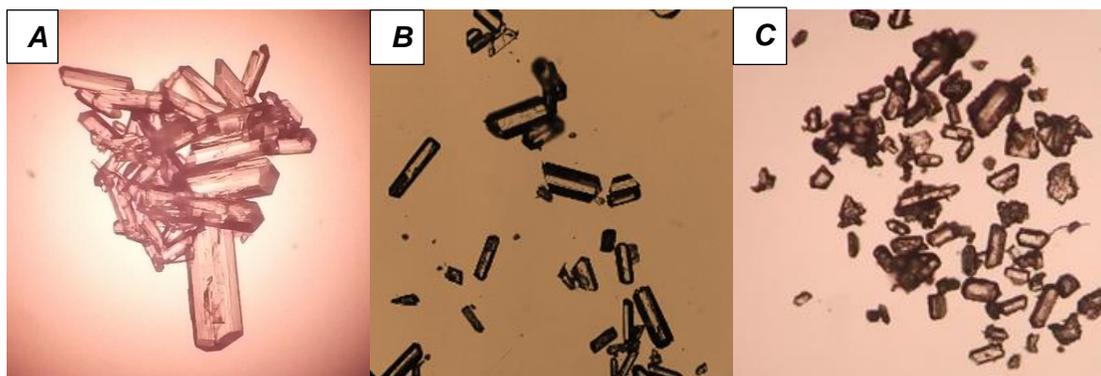


Figura 9. Cristales de bioestruvita analizados por microscopía óptica producidos por la cepa 2CANA en: **A.** medio B41 (100X) (sección 6.3.2), **B.** medio formulado con suero lácteo en proceso biológico simultáneo de cultivo y producción de estruvita (40X) (sección 6.4.1.1) y **C.** medio formulado con suero lácteo en proceso biológico separado de cultivo y producción de estruvita (40X) (sección 6.4.1.2).

Así mismo, el tamaño y la composición de los cristales de estruvita obtenidos fueron corroborados por el análisis SEM-EDS, el tamaño promedio de los cristales formados en medio B41 fue de 350 – 400 μm de longitud (sección 6.3.2), los cristales formados en medio formulado con suero lácteo empleando el proceso biológico simultáneo de cultivo y producción fueron de 400 – 450 μm de longitud y los cristales obtenidos en medio formulado con suero lácteo en el

proceso biológico separado de cultivo y producción fueron de 250 – 450 μm de longitud. El tamaño de los cristales obtenidos en este estudio es mayor respecto a cristales obtenidos en medios sintéticos reportados, de 100–300 μm de longitud (Cerrillo, Palatsi, Comas, Vicens, & Bonmatí, 2015; Da Silva et al., 2000). La figura 10A muestra los principales componentes de los cristales de estruvita, formados por la cepa 2CANA en medio formulado a partir de suero lácteo empleando el proceso biológico separado de cultivo y producción, expresado en porcentaje (% p/p) fueron: O (51,9 %), P (24,3 %), Mg (16,7 %), N (5,9 %) y K (1,4 %), siendo el O, Mg y P los elementos mayoritarios que conforman el cristal de estruvita y el N y K los elementos minoritarios, al no encontrarse otros elementos extraños se confirma la pureza de los cristales formados. Los anexos 7 y 8 muestran características en tamaño y composición de los cristales de estruvita analizados en medio B41 y medio formulado a partir de suero lácteo mediante el proceso biológico simultáneo de cultivo y producción.

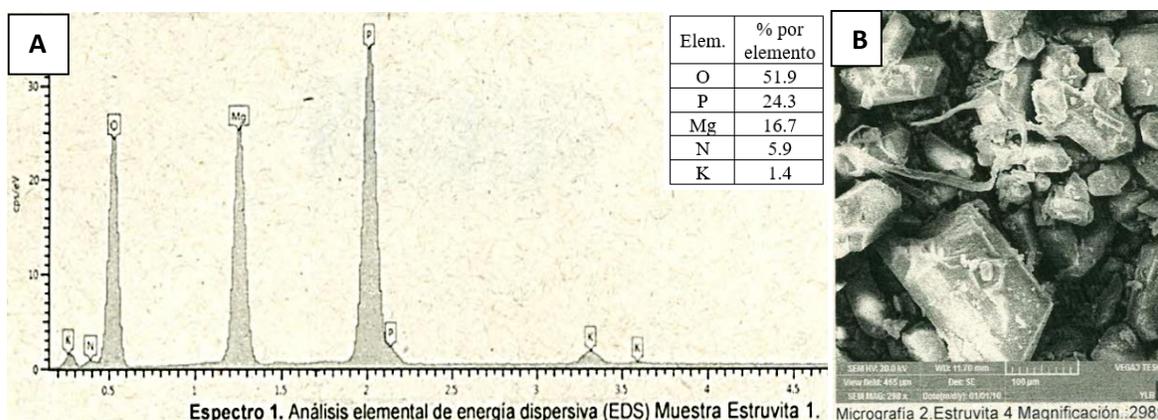


Figura 10. A. Elementos principales en muestras de cristales de estruvita **B.** Morfología de los cristales de estruvita observadas por EDS, formada por la cepa 2CANA en el proceso biológico separado de cultivo y producción.

La figura 11 y los anexos 9 y 10 muestran que la identidad de los cristales obtenidos en todos los ensayos, determinados mediante DRX, corresponde a los picos de difracción a (2θ) en 15° , 27° , y 30° del patrón de DRX estruvita No: 15-0762 reportado por (Prywer & Torzewska, 2010).

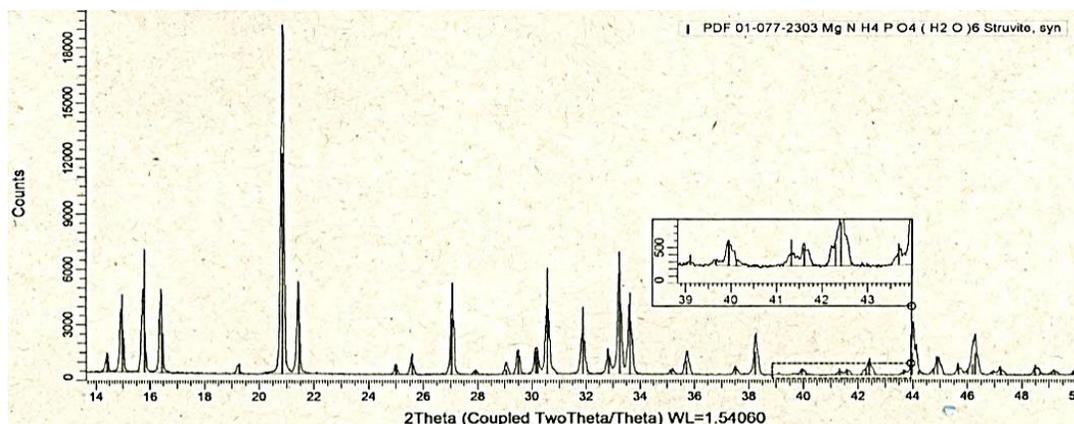


Figura 11. Patrón de difracción de rayos X correspondiente a cristales de estruvita formados en medios formulados a base de suero lácteo para el cultivo y producción separada.

EN general, las características morfológicas y composición los cristales de estruvita en medio B41 y medios formulados con suero lácteo para el cultivo y producción simultánea y separada fueron similares, no se identificaron impurezas ni subproductos diferentes a la estruvita.

En síntesis, estos ensayos permitieron evidenciar la formación de bioestruvita por la cepa 2CANA en medios de cultivo formulados con suero lácteo mediante los procesos simultáneo y separado de cultivo y producción. El proceso biológico simultáneo de cultivo y producción reveló que la bischofita puede ser empleada como fuente de Mg y la urea como fuente de N-NH₄ para la formación de estruvita. El proceso biológico separado de cultivo y producción se incrementó la producción de estruvita a 5,1 g/L en 3 días. Se alcanzaron máximos porcentajes de remoción y recuperación de P (94 %), remoción de amonio (82 %) y remoción de DQO de hasta 72 %. El proceso biológico separado de cultivo y producción permitió identificar la función de la cepa 2CANA en la nucleación de la estruvita y así mismo el efecto de la biomasa en la formación de estruvita y la remoción de DQO del suero lácteo. En ese sentido, este proceso constituye un método de remoción y recuperación de P y N del suero lácteo y una alternativa innovadora para la valorización del suero lácteo y la bischofita, subproductos industriales abundantes y de bajo costo, para la formación de estruvita.

7.4. Identidad de la cepa seleccionada 2CANA

7.5.1. Características morfológicas

La caracterización fenotípica de la cepa 2CANA respecto a las colonias observadas en medio TSA fueron: forma circular, aspecto liso, textura mucoide, color amarillo - naranja, diámetro de

1-2 mm y de aroma “dulzón” (Figura 12A). El color amarillo - naranja de las colonias podría deberse a la producción de pigmentos de tipo flexirubina y el aroma dulzón a la producción de ésteres. Las flexirubinas son el único tipo de pigmentos bacterianos con una sustitución de alquilo terminal que consiste en ácido ω -fenil octaénico cromóforo esterificado con resorcinol (Venil, Zkaria, Usha, & Ahmad, 2014). La producción de flexirubina se ha descrito en *Flexibacter elegans*, *Cytophaga sp*, *Sporocytophaga sp*, *Flavobacterium sp.* y *Chryseobacterium sp*, cada género produce especies modificadas de flexirrubina, las cuales han servido como excelentes marcadores quimiosistemáticos (Reichenbach & Kleinig, 1974). La flexirrubina producida por el género *Chryseobacterium* tiene aplicación en la producción de biopigmentos debido a sus propiedades físicas y químicas (Venil et al., 2014). La morfología microscópica muestra que se trataba de bacilos con respuesta negativa a la tinción de Gram (Figura 12B). El estudio de (Sánchez-Román et al., 2007) menciona que la mayoría de las bacterias capaces de inducir la formación de estruvita son Gram negativas, resultado que coincide con este estudio.

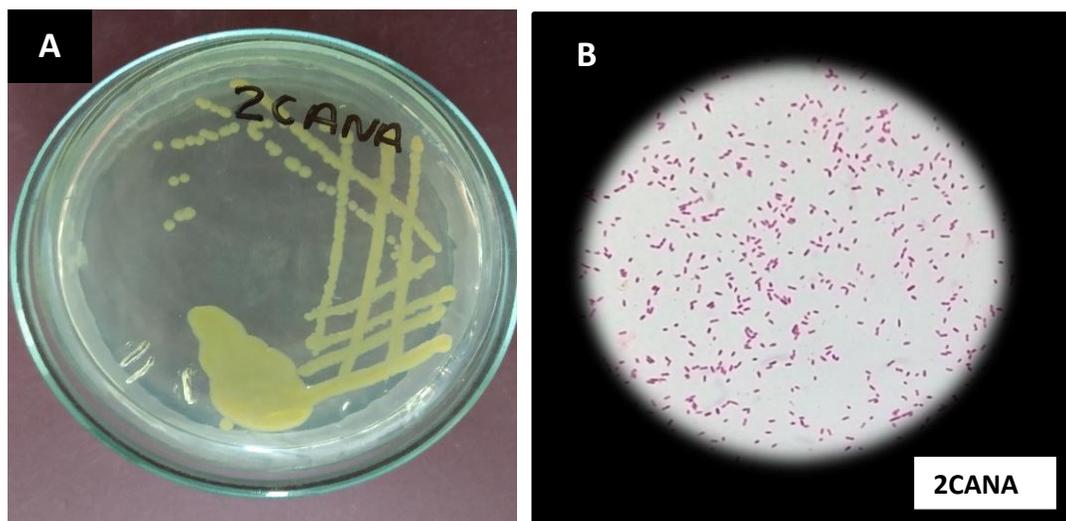


Figura 12. A) Características fenotípicas de la cepa 2CANA en medio TSA. B) Morfología microscópica de la cepa 2CANA observada con tinción Gram a 1000X

7.4.2. Características fisiológicas

Respecto a la evaluación del metabolismo de la cepa 2CANA, la actividad oxidasa fue positiva empleando lactosa (10 g/L) y sacarosa (10 g/L). La producción de enzimas citocromo oxidasa es una característica propia de bacterias aerobias que utilizan metabolismo oxidativo de carbohidratos mediante la prueba O/F.

En este estudio se determinó que la cepa 2CANA exhibe actividad ureasa y proteasa, parámetros que fueron evaluados para seleccionar cepas productoras de estruvita. Estas enzimas desempeñan una importante función en la mineralización del N del suelo, proceso que regula la cantidad de N disponible para el crecimiento de las plantas (Gousterova et al., 2011). Por otro lado, la producción de enzimas también puede estar asociada a mecanismos de patogenicidad en diversos grupos bacterianos, por ejemplo las hemolisinas que son consideradas factores de virulencia en varias especies bacterianas Gram negativas (Brenden & Janda, 1987), por tal motivo se evaluó la actividad hemolítica de la cepa 2CANA en agar sangre, que resultó negativa por lo que se descarta su patogenicidad por este mecanismo. Así mismo, algunos estudios han relacionado la prueba positiva de absorción de rojo congo como factor de virulencia de varios géneros bacterianos, ya que estructuralmente el rojo congo es análogo al grupo Hemo de la hemoglobina y citocromos, y forma complejos con proteínas y carbohidratos (Crump & Kay, 2008; Osman, Orabi, Elbehiry, Hanafy, & Ali, 2019). Por tal motivo se ensayó la absorción de rojo congo para la cepa 2CANA, dando un resultado negativo. El estudio de (Crump & Kay, 2008) determinó que la presencia del colorante en el medio inhibe el crecimiento de *Flavobacterium psychrophilum*, otros estudios realizados con *Pseudomonas* y *Vibrio* demostraron que especies de ambos géneros tienen la capacidad de absorber rojo congo (Arslan, Eyi, & Özdemir, 2011; Khuntia, Das, Samantaray, & Kanta, 2008) y bacterias del género *Chryseobacterium* no absorben el rojo congo (Behrendt, Ulrich, & Schumann, 2008; Loch & Faisal, 2014). De manera similar a la cepa 2CANA algunas especies del género *Chryseobacterium* no se observó crecimiento en agar MacConkey (F. Shen, Ka, Young, Lai, & Arun, 2005).

El antibiograma de la cepa 2CANA demuestra resistencia a los antibióticos: *Ampicilina* (10 µg), *Amoxicilina + Ac. Clavulanico* (30 µg), *Imipenem* (10 µg), *Cloranfenicol* (30 µg), *Tetraciclina* (30 µg), *Gentamicina* (10 µg) y *Aztreonam* (30 µg) y sensibilidad a: *Levofloxacin* (5 µg), *Cotrimoxazol* (25 µg) y *Cefepime* (30 µg). El perfil de resistencia y sensibilidad es similar a especies del género *Chryseobacterium*.

Otros estudios reportados con *Chryseobacterium spp.* demostraron resistencia a los aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, β-lactámicos y teicoplanina (Bloch, Nadarajah, & Jacobs, 1997; Kirby et al., 2004).

Por los resultados obtenidos en los ensayos realizados, como se muestra en la tabla 12, la cepa 2CANA presentó características morfológicas y metabólicas similares a *Chryseobacterium sp.*

Tabla 12. Características morfológicas, fisiológicas y antibiograma de la cepa 2CANA.

Prueba		Cepa 2CANA	<i>Chryseobacterium spp.</i>	Referencia
Morfología y tinción de Gram		Bacilo Gram (-)	Bacilo Gram (-)	(Garg, Appannanavar, Mohan, & Taneja, 2015)
Colonia	Morfología	Circular liso y mucoso	Circular liso y mucoso	
	Color	Amarillo naranja	Amarillo naranja	
	Diámetro	1-2 mm	1-2 mm	(F. Shen et al., 2005)
Pigmentación flexirubina		+	+	(Reichenbach & Kleinig, 1974)
Oxidasa		+	+	(Garg et al., 2015)
Ureasa		+	+	
Proteasa		+	+	(S. Wang, Yang, Liang, & Yen, 2008)
Glucosa OF		F	F	(Vaneechoutte, Ka, & Baere, 2007)
Lactosa OF		-O	-O	(Spencer, Spitznogle, Borjan, & Aitken, 2020)
Sacarosa OF		-O	F	(Vaneechoutte et al., 2007)
Hemólisis en agar sangre		-	-	(Srinivasan, Muthusamy, Raveendran, & Joseph, 2016)
Absorción de rojo congo		-	-	(Behrendt et al., 2008; Loch & Faisal, 2014)
Crecimiento en agar MacConkey		-	-	(F. Shen et al., 2005)
Levofloxacina (5 µg)		S	S	(Bloch et al., 1997; Hendaus & Zahraldin, 2013; Kirby et al., 2004; Velásquez, Santillán, Mendoza, & Soza, 2008)
Ampicilina (10 µg)		R	R	
Amoxicilina + Ac. Clavulanico (30 µg)		R	R	
Imipenem (10 µg)		R	R	
Cotrimoxazol (25 µg)		S	S	
Cloranfenicol (30 µg)		R	R	
Tetraciclina (30 µg)		R	R	
Gentamicina (10 µg)		R	R	
Aztreonam (30 µg)		R	R	
Cefepime (30 µg)		S	S	

Positivo (+), Negativo (-); Resistente (R), Sensible (S); Metabolismo de carbohidratos: Fermentativo (F), oxidativo (O), oxidativo lento (-O)

7.4.3. Identidad molecular de la cepa 2CANA

La identificación de los fragmentos consenso de la región hipervariable V1 y V2 del gen ADN_r 16S fue realizada mediante análisis BLAST en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El análisis de la secuencia del amplicón de la cepa 2CANA presentó homología del 97.6 % con *Chryseobacterium bernardetii* cepa H4638, miembro de la familia *Flavobacteriaceae*. Por esta razón y además por los resultados obtenidos de la caracterización morfológica, fisiológica y del antibiograma se incluye a la cepa 2CANA como miembro del género *Chryseobacterium*, sin embargo, la asignación de especie permanece pendiente para un estudio molecular más detallado.

Las especies del género *Chryseobacterium* se pueden encontrar en suelo y sedimentos, agua (Kim, Lee, Oh, & Lee, 2008), lodo activado (Kampfer, Dreyer, Neef, Dott, & Busse, 2003), muestras clínicas y lácteas. *Chryseobacterium defluvii* sp. nov. fue aislado a partir de lodo activado proveniente de un biorreactor donde se estudiaba el tratamiento mejorado de P en aguas residuales (Kampfer et al., 2003), similar a la muestra biológica que fue empleada en este estudio para el aislamiento de cepas mineralizadoras de estruvita. Por otro lado, *Chryseobacterium bernardetii* fue descrito previamente por Holmes (2013) tiene características morfológicas y fisiológicas (células Gram (-), colonias circulares, convexas, enteras, opacas, brillantes, lisas y pigmentadas de amarillo, producción de oxidasa, metabolismo oxidativo en la prueba de Hugh y Leifson OF para lactosa y producción de gelatinasa) similares a la cepa 2CANA.

En este estudio se describe que la cepa 2CANA identificada como miembro de género *Chryseobacterium* puede mediar la formación de estruvita en medio B41 con rendimientos comparables a los obtenidos en este estudio empleando la cepa clínica de *P. mirabilis* y en medios formulados con suero lácteo mediante los procesos biológicos simultáneo y separado de cultivo y producción. Diversos estudios han reportado que el género *Chryseobacterium* tiene características metabólicas interesantes como la producción de antioxidantes, pigmentos, formación de biofilm que media la colonización de raíces en las plantas, producción de una variedad de enzimas como ureasas, proteasas, fosfatasas, pectinasas, entre otras (Hantsiszacharov & Halpern, 2007; Kampfer et al., 2003; Suzina et al., 2011; S. Wang et al., 2008). Se ha descrito que las enzimas fosfatasas ácida y alcalina participan en procesos más eficientes de recuperación de P mediante la mineralización de P orgánico para la formación de estruvita

(Piveteau, Picard, Dabert, & Daumer, 2017). La producción de enzimas por especies del género *Chryseobacterium* se ha relacionado con su capacidad de mediar la solubilización y mineralización del P en el suelo y promover su biodisponibilidad para las plantas (Sang, Jeong, Kim, & Kim, 2018), ya que la capacidad solubilizadora y mineralizadora de P puede ser simultánea (Guang-can, Shu-jun, Miao-ying, & Guang-hui, 2008). En ese sentido, el género *Chryseobacterium* cuenta con las características metabólicas para mineralizar el P, sin embargo, aún no existen reportes respecto a la mineralización de P como estruvita.

7.5. Comparación de los procesos biológico y fisicoquímico en la producción de estruvita

Por muchos años la cristalización de N y P ha sido ampliamente empleada para el tratamiento de aguas residuales como un proceso rentable en comparación a los tratamientos convencionales que generan abundante cantidad de lodos lo que implica un costo adicional de operación en estos procesos (Shu et al., 2006). Actualmente la recuperación de P y N mediante la precipitación de cristales de estruvita se realiza usando procesos fisicoquímicos, que si bien es altamente eficiente, su implementación es costosa debido a que requiere el empleo de reactivos y equipos especializados (Cerrillo et al., 2015; Suzuki et al., 2002). Una alternativa promisoriosa al proceso fisicoquímico es la producción biológica de estruvita, la cual aprovecha características de ciertos microorganismos para inducir la precipitación de cristales (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). Los resultados (tabla 13) muestran que la remoción y recuperación de P como estruvita mediante el proceso fisicoquímico, fue del 88 %, la producción de estruvita fue de 2,34 g/L y se alcanzó una remoción máxima de amonio de 74 %, P de 88 %, en un tiempo de 3 días. En comparación con el proceso biológico simultáneo de cultivo y producción los porcentajes de remoción y recuperación de P alcanzaron del 54 y 52 % en un tiempo de 15 días; con el proceso biológico separado de cultivo y producción se alcanzó un 84 % de remoción de amonio y un 94 % de remoción y recuperación de P, en 3 días. Por lo que fue este último proceso el que presentó mayor porcentaje de remoción y recuperación de P.

Tabla 13. Producción de estruvita obtenida por: proceso biológico simultáneo y separado, y proceso fisicoquímico.

Proceso	pH final	Estruvita (g/L)	Remoción NH ₄ (%)	Disminución DQO (%)	Remoción P (%)	Tiempo (días)	Recuperación P (%)	Costo de producción (Bs/kg)	Costo de producción (\$US/kg)
Biológico ¹	7,28	4,57±1,08	ND	4±5,6	54	15	52	1705,7	243,7
Biológico ²	8,72	3,5±0,31	84	71±1	94	3	94	347,6	49,7
Fisicoquímico	8,20	2,34±0,06	74	ND	88	3	88	414,0	59,1

¹Proceso biológico simultáneo de cultivo y producción

²Proceso biológico separado de cultivo y producción

ND: No Determinado

Una aproximación a los costos de producción de estruvita obtenida por procesos biológicos y fisicoquímico empleados en este estudio fueron realizados considerando sólo los insumos necesarios, electricidad y salario de personal (Anexo 11) para la producción. Se determinó que un menor costo de producción de estruvita fue obtenido empleando el proceso biológico de cultivo y producción separada (49,7 \$US/kg), ligeramente menor al costo de la estruvita en países europeos (53 \$US/kg) donde solo consideraron los costos de producción, similar a los parámetros tomados en este estudio (Yetilmmezsoy, Ilhan, Kocak, & Akbin, 2017). La exportación a mercados extranjeros como Reino Unido, Japón y Canadá, donde el precio es mucho mayor (330-670 \$US/kg), podría generar posibilidades excepcionales, por su amplia aceptación al ser un producto amigable con el medio ambiente, eficiente, completo y por su mayor precio en el mercado. En Brasil y Argentina se distribuye fertilizantes tipo MAP (fosfato monoamónico), de composición similar a la estruvita por un costo menor (1,14 y 3,5 \$US/kg, respectivamente) (Conde et al., 2009; Econoagro, 2012). La importación del fertilizante MAP en países latinoamericanos como Bolivia es cada vez mayor, sin embargo los costos de importación varían dependiendo del costo de los insumos, el costo de otros fertilizantes y los nichos de mercado (Conde et al., 2009; Llanos, 2019). En ese sentido, este estudio representa un primer intento de producción estruvita a partir de suero empleando insumos de bajo costo, lácteo y bischofita, que puede incentivar otros investigadores a realizar más estudios dirigidos a reducir los costos de producción para que sea asequible al mercado interno.

Una alternativa para producir fertilizantes MAP como la estruvita y reducir los costos de producción es evaluar otras fuentes económicas de P, los huesos de animales, la orina humana y de animales, el estiércol y las aguas residuales son una fuente económica y práctica que podría

ser evaluada en el país y la región. Esto reduciría aún más los costos de producción, sin embargo, investigaciones futuras son necesarias para analizar esta alternativa.

8. CONCLUSIONES

- A partir del consorcio acumulador de P “*BIOFOS*” se aislaron y seleccionaron 9 cepas bacterianas con actividad ureasa y capacidad de producir estruvita en medio B41, siendo la cepa 2CANA la que presentó mayor producción de estruvita ($3,55 \pm 0,11$ g/L) respecto a las demás cepas evaluadas.
- La producción biológica de estruvita y la recuperación de P y N por la cepa 2CANA fue demostrada empleando medios de cultivo formulados en base a suero lácteo (DQO 75,52 g/L), bischofita, $MgCl_2 \cdot 2H_2O$ y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ como fuentes de Mg y urea, $(NH_4)_2SO_4$ como fuentes de N, a través de un diseño experimental. En estas condiciones, mayor producción de estruvita (4,57 g/L) y remoción de P (53 %) fue obtenida empleando urea (0,35 g/L) y bischofita (5,5 g/L).
- Se optimizó la producción de bioestruvita, la remoción de P y N mediante el proceso biológico separado de cultivo y producción empleando suero lácteo (DQO de 8 g/L) suplementado con urea (711 mg/L) como fuente de N y bischofita (5,5 g/L) como fuente de Mg. Con estos ajustes se obtuvo 3,5 g/L de estruvita, se alcanzó un porcentaje de remoción de DQO del 71 %, una remoción y recuperación de P del 94 % y una remoción de N de 82 %.
- La cepa 2CANA presentó una máxima capacidad de mineralizar P en estruvita en medio B41 y medios formulados a partir de suero lácteo. Esta cepa fue identificada como *Chryseobacterium sp.* por sus características morfológicas, fisiológicas y moleculares.
- Comparando los resultados obtenidos por los procesos biológicos y fisicoquímico, se observó que los máximos rendimientos de producción de estruvita y remoción de P se obtuvieron con el proceso biológico separado de cultivo y producción (3,5 g/L estruvita y 94 % P) comparado al método fisicoquímico (2,34 g/L estruvita y 84 % P). Además, con el proceso biológico separado de cultivo y producción se pudo reducir el tiempo del proceso de 15 a 3 días y de acuerdo al análisis económico realizado es el método que presenta el menor costo de producción de estruvita (49,7 \$US/kg).

9. BIBLIOGRAFIA

- Ahn, Y. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, *41*, 1709–1721. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.033>
- Albuquerque, M., Torres, C., & Reis, 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*(11), 3419–3433. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.021>
- Alexander, T., Vonlanthen, P., & Seehausen, O. (2017). Does eutrophication-driven evolution change aquatic ecosystems? *Phil. Trans. R. Soc. B*, *372*, 1–10.
- Alfaro, A., Crespo, C., & Alvarez, M.-T. (2019). *Producción de estruvita a partir de orina mediante el uso de bacterias de la microbiota intestinal de murciélagos*. Universidad Mayor de San Andrés.
- Appels, L., Baeyens, J., Degre, J., & Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, *34*, 755–781. <https://doi.org/10.1016/j.peccs.2008.06.002>
- Arias, D., Cisternas, L. A., & Rivas, M. (2017). Biomineralization of calcium and magnesium crystals from seawater by halotolerant bacteria isolated from Atacama Salar (Chile). *Desalination*, *405*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2016.11.027>
- Arslan, S., Eyi, A., & Özdemir, F. (2011). Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. *Journal of Dairy Science*, *94*(12), 5851–5856. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4676>
- Babić-Ivančić, V., Kontrec, J., Kralj, D., & Brečević, L. (2002). Precipitation diagrams of struvite and dissolution kinetics of different struvite morphologies. *Croatica Chemica Acta*, *75*(1), 89–106.
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, *55*, 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Barbosa, S. G., Peixoto, L., Meulman, B., Alves, M. M., Pereira, M. A., Madalena, M., & Alcina, M. (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*, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.148>
- Battistoni, P., Pavan, P., Prisciandaro, M., & Cecchi, F. (2000). Struvite crystallization: A feasible and reliable way to fix phosphorus in anaerobic supernatants. *Water Research*, *34*(11), 3033–3041. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00045-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00045-2)
- Beavon, J., & Heatley, N. G. (1962). The Occurrence of Struvite (Magnesium Ammonium Phosphate Hexahydrate) in Microbial Cultures. *Journal of General Microbiology*, *31*(1), 167–169. <https://doi.org/10.1099/00221287-31-1-167>
- Behrendt, U., Ulrich, A., & Schumann, P. (2008). *Chryseobacterium gregarium* sp. nov., isolated from decaying plant material. *International Journal of Systematic and*

- Evolutionary Microbiology*, 2, 1069–1074. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65544-0>
- Ben Omar, N., Entrena, M., González-Muñoz, M., Arias, J., Huertas, F., & Rodríguez-Gallego, M. (1996). Morphological diversity of Struvite crystals produced by *Myxococcus Coralloides* and *Myxococcus Xanthus*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 53(1–4), 209–217. <https://doi.org/10.1080/02772249609358285>
- Ben Omar, N., Entrena, M., González-Muñoz, M., Arias, J., & Huertas, F. (1994). Effects of pH and phosphate on the production of struvite by *Myxococcus xanthus*. *Geomicrobiology Journal*, 12(2), 81–90. <https://doi.org/10.1080/01490459409377974>
- Bernardet, J. F., Nakagawa, Y., & Holmes, B. (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1049–1070. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02136-0.02136>
- Bloch, K. C., Nadarajah, R., & Jacobs, R. (1997). *Chryseobacterium meningosepticum*: an emerging pathogen among immunocompromised adults. *Medicine*, 76(1), 30–41.
- Bower, C., & Holm-Hansen, T. (1980). A Salicylate–Hypochlorite Method for Determining Ammonia in Seawater. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(5), 794–798. <https://doi.org/10.1139/f80-106>
- Brenden, R., & Janda, J. M. (1987). Detection, quantitation and stability of the p haemolysin of *Aeromonas* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 24(3), 247–251.
- Bridger, G., Salutsky, M., & Starostka, R. (1962). Metal Ammonium Phosphates as Fertilizers. *Micronutrient Sources*, 10(3), 181–188.
- Burbank, M. B., Weaver, T. J., Williams, B. C., & Crawford, R. L. (2012). Urease Activity of Ureolytic Bacteria Isolated from Six Soils in which Calcite was Precipitated by Indigenous Bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 29(4), 389–395. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.575913>
- Capdevielle, A., Sýkorová, E., Biscans, B., Béline, F., & Daumer, M. (2013). Optimization of struvite precipitation in synthetic biologically treated swine wastewater - Determination of the optimal process parameters. *Journal of Hazardous Materials*, 244–245(1), 357–369.
- Capdevielle, Aurélie, Sýkorová, E., Béline, F., & Daumer, M. (2015). Effects of organic matter on crystallization of struvite in biologically treated swine wastewater, 3330(October). <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1088580>
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the Total Environment*, 445–446, 385–396. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>
- Celen, I., Buchanan, J., Burns, R., Robinson, R., & Raman, D. (2007). Using a chemical equilibrium model to predict amendments required to precipitate phosphorus as struvite in liquid swine manure. *Water Research*, 41, 1689–1696. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.018>
- Çelen, I., & Türker, M. (2001). Recovery of Ammonia as Struvite from Anaerobic Digester

- Effluents. *Environmental Technology*, 22(11), 1263–1272. <https://doi.org/10.1080/09593332208618192>
- Cerrillo, M., Palatsi, J., Comas, J., Vicens, J., & Bonmatí, A. (2015). Struvite precipitation as a technology to be integrated in a manure anaerobic digestion treatment plant - removal efficiency, crystal characterization and agricultural assessment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(6), 1135–1143. <https://doi.org/10.1002/jctb.4459>
- Chauhan, C., Joseph, K., Parekh, B., & Joshi, M. (2008). Growth and characterization of struvite crystals Chetan. *Indian Journal of Pure & Applied Physics*, 46, 507–512.
- Chen, L., Shen, Y., Xie, A., Huang, F., Zhang, W., & Liu, S. (2010). Seed-mediated synthesis of unusual struvite hierarchical superstructures using bacterium. *Crystal Growth and Design*, 10(5), 2073–2082. <https://doi.org/10.1021/cg900974n>
- Christensen, W. (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.
- Cölfen, H., & Antonietti, M. (2005). Mesocrystals: Inorganic superstructures made by highly parallel crystallization and controlled alignment. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(35), 5576–5591. <https://doi.org/10.1002/anie.200500496>
- Conde, M., Nava, A., Saab, A., Espinoza, J., Moriya, K, Tomasino, H., & García, A. (2009). *La situación regional de los fertilizantes: Argentina, Brasil Bolivia, Chile, Paraguay, Uruguay*. Santiago: IICA, CAS, REDPA.
- Cordell, D., Drangert, J., & White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19, 19, 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>
- Crump, E., & Kay, W. (2008). Short Communication Congo red inhibition as a convenient diagnostic for *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 31, 553–557. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00883.x>
- Czichos, H., & Saito, T. (2006). Biogenic impact on materials. In *Springer handbook of materials measurement methods* (pp. 769–844).
- Da Silva, S., Bernet, N., Delgenès, J. P., & Moletta, R. (2000). Effect of culture conditions on the formation of struvite by *Myxococcus xanthus*. *Chemosphere*, 40(12), 1289–1296. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00224-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00224-6)
- Dareioti, M., & Kornaros, M. (2015). Bioresource Technology Anaerobic mesophilic co-digestion of ensiled sorghum, cheese whey and liquid cow manure in a two-stage CSTR system: Effect of hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 175, 553–562. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.102>
- De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2007). Fertilizer potential of phosphorus recovered from wastewater treatments. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, 179–184. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_27
- Delgado, G., Párraga, J., Martín-García, J., Rivadeneyra, M., Sánchez-Marañón, M., & Delgado,

- R. (2013). Carbonate and Phosphate Precipitation by Saline Soil Bacteria in a Monitored Culture Medium. *Geomicrobiology Journal*, 30(3), 199–208. <https://doi.org/10.1080/01490451.2012.665148>
- Demirel, B., Yenigun, O., & Onay, T. T. (2005). Anaerobic treatment of dairy wastewaters : a review. *Process Biochemistry*, 40(8), 2583–2595. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.015>
- Downey, J. A., Nickel, J. C., Clapham, L., & McLean, J. C. (1992). In vitro Inhibition of Struvite Crystal Growth by Acetohydroxamic Acid. *British Journal of Urology*, 70(5), 355–359. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.1992.tb15787.x>
- Econoagro. (2012). Costo del nutriente puesto en el campo.
- Eisner, B. H., Deshmukh, S. M., & Lange, D. (2014). Struvite Stones. In *Urinary Stones: Medical and Surgical Management* (pp. 48–56). <https://doi.org/10.1002/9781118405390.ch5>
- Escalante, H., Castro, L., Amaya, M. P., Jaimes, L., & Jaimes-Estévez, J. (2017). Anaerobic digestion of cheese whey: Energetic and nutritional potential for the dairy sector in developing countries. *Waste Management*, 71, 711–718. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.026>
- Escalera, S. (2014). Producción de Fertilizantes NPK en Bolivia. *ResearchGate*, 0–3.
- Fischer, F., Bastian, C., Happe, M., Mabillard, E., & Schmidt, N. (2011). Bioresource Technology Microbial fuel cell enables phosphate recovery from digested sewage sludge as struvite. *Bioresource Technology*, 102(10), 5824–5830. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.089>
- Flores, M., Carrasco, C., & Álvarez, M. (2017). *Estudio básico de un sistema de biodegradación proteolítico-lipolítico para el tratamiento de aguas residuales de la industria láctea “Flor de Leche S.R.L.”* Universidad Mayor de San Andres.
- Garg, S., Appannanavar, S., Mohan, B., & Taneja, N. (2015). Pyonephrosis due to *Chryseobacterium gleum*: A first case report. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(2), 311–314.
- Gelegenis, J., Georgakakis, D., Angelidakic, I., & Mavris, V. (2007). Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure. *Renewable Energy*, 32(13), 2147–2160. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2006.11.015>
- Gofton, A., Oskam, C., Lo, N., Beninati, T., Wei, H., Mccarl, V., ... Irwin, P. (2015). Inhibition of the endosymbiont “*Candidatus Midichloria mitochondrii*” during 16S rRNA gene profiling reveals potential pathogens in Ixodes ticks from Australia. *Parasites & Vectors*, 8(345), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0958-3>
- Goli, A., Shamiri, A., Khosroyar, S., Talaiekhosani, A., & Sanaye, R. (2019). A Review on Different Aerobic and Anaerobic Treatment Methods in Dairy Industry Wastewater. *Journal of Enviromental Treatment Techniques*, 6(1), 113–141.
- Gonzalez-Martinez, A., Leyva-Díaz, J., Rodriguez-Sanchez, A., Muñoz-Palazon, B.,

- Rivadeneira, A., Poyatosa, J., & Martínez-Toledo, M. (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. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1040006>
- González-Muñoz, M., De Linares, C., Martínez-Ruiz, F., Morcillo, F., Martín-Ramos, D., & Arias, J. (2008). Ca-Mg kutnahorite and struvite production by *Idiomarina* strains at modern seawater salinities. *Chemosphere*, *72*(3), 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.010>
- González-Muñoz, M., Rodríguez-Navarro, C., Martínez-Ruiz, F., Arias, J., Merroun, M., & Rodríguez-Gallego, M. (2010). Bacterial biomineralization: new insights from *Myxococcus*-induced mineral precipitation. *Geological Society*, *336*(1), 31–50. <https://doi.org/10.1144/SP336.3>
- Gonzalez, M. I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, *57*(1), 1–11.
- Gousterova, A., Nustorova, M., Paskaleva, D., Naydenov, M., Neshev, G., & Vasileva-Tonkova, E. (2011). Assessment of Feather Hydrolysate From Thermophilic Actinomycetes for Soil Amendment and Biological Control Application. *International Journal of Environmental Research*, *5*(4), 1065–1070.
- Guang-can, T., Shu-jun, T., Miao-ying, C., & Guang-hui, X. (2008). Phosphate-Solubilizing and -Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils. *Pedosphere*, *18*(4), 515–523.
- Gutierrez, A., Ushak, S., Galleguillos, H., Fernandez, A., Cabeza, L., & Grágeda, M. (2015). Use of polyethylene glycol for the improvement of the cycling stability of bischofite as thermal energy storage material. *Applied Energy*, *154*, 616–621. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.05.040>
- Hantsis-zacharov, E., & Halpern, M. (2007). *Chryseobacterium haifense* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(1), 2344–2348. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65115-0>
- Hendaus, M. A., & Zahraldin, K. (2013). *Chryseobacterium indologenes* Meningitis in a Healthy Newborn: A Case Report. *Oman Medical Journal*, *28*(2), 133–134.
- Hjorth, M., Christensen, K. V., Christensen, M. L., & Sommer, S. G. (2011). *Solid – Liquid Separation of Animal Slurry in Theory and Practice* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1051/agro>
- Huang, H., Xiao, D., Zhang, Q., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.06.021>
- Hugh, R., & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, *66*(1), 24–26.
- Itelima, J., Bang, W., Onyimba, I., Sila, M., & Egbere, O. (2018). Bio-fertilizers as key player in enhancing soil fertility and crop productivity: A Review. *Direct Research Journal of*

- Agriculture and Food Science*, 6(3), 73–83.
- Jaffer, Y., Clark, T. A., Pearce, P., & Parsons, S. A. (2002). Potential phosphorus recovery by struvite formation. *Water Research*, 36(1), 1834–1842.
- Janczukowicz, W., Rodziewicz, J., Thornton, A., & Czaplicka, K. (2012). Effect of fermented wastewaters from butter production on phosphates removal in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 120, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.020>
- Jasko, J., Skripsts, E., Dubrovskis, V., Zabarovskis, E., & Kotelenecs, V. (2011). Biogas production from cheese whey in two phase anaerobic digestion. *Engineering for Rural Development*, 373–376.
- Kabdash, I., Tünay, O., & Özcan, P. (2009). Application of struvite precipitation coupled with biological treatment to slaughterhouse wastewaters. *Environmental Technology*, 30(10), 1095–1101. <https://doi.org/10.1080/09593330903136856>
- Kampfer, P., Dreyer, U., Neef, A., Dott, W., & Busse, H.-J. (2003). *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 93–97. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02073-0>
- Karak, T., Sonar, I., Rani, J., Kumar, R., Das, S., Kumar, R., ... Das, K. (2015). Bioresource Technology Struvite for composting of agricultural wastes with termite mound: Utilizing the unutilized. *Bioresource Technology*, 187, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.070>
- Karray, F., Ben, M., Najwa, A., Manel, K., Manel, H., & Sami, F. (2018). Extracellular hydrolytic enzymes produced by halophilic bacteria and archaea isolated from hypersaline lake. *Molecular Biology Reports*, 45(5), 1297–1309. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4286-5>
- Kasapgil, B., Anderson, G., & Ince, O. (1994). An investigation into the pre-treatment of dairy wastewater prior to aerobic biological treatment. *Water Science and Technology*, 29(9), 205–212.
- Kataki, S., West, H., Clarke, M., & Baruah, D. C. (2016). Phosphorus recovery as struvite : Recent concerns for use of seed , alternative Mg source , nitrogen conservation and fertilizer potential. *Resources, Conservation & Recycling*, 107, 142–156. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2015.12.009>
- Khuntia, C. P., Das, B. K., Samantaray, B. R., & Kanta, S. (2008). Characterization and pathogenicity studies of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diseased freshwater prawn , *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 39(3), 301–310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01888.x>
- Kim, K., Lee, K., Oh, H., & Lee, J. (2008). *Chryseobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from a water reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 533–537. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.65491-0>
- Kirby, J., Sader, H., Walsh, T., & Jones, R. (2004). Antimicrobial Susceptibility and Epidemiology of a Worldwide Collection of *Chryseobacterium* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997 – 2001). *Journal of Clinical*

- Microbiology*, 42(1), 445–448. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.445>
- Kondakov, D. F., & Danilov, V. P. (2007). Manufacturing of Magnesium Hydroxide from Natural Magnesium Chloride Sources, 41(5), 572–576. <https://doi.org/10.1134/S0040579507050193>
- Krom, M. D., David, A. Ben, Ingall, E. D., Benning, L. G., Clerici, S., Bottrell, S., ... Rijn, J. Van. (2014). Bacterially mediated removal of phosphorus and cycling of nitrate and sulfate in the waste stream of a “ zero-discharge ” recirculating mariculture system. *Water Research*, 56, 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.049>
- Lahav, O., Telzhensky, M., Zewuhn, A., Gendel, Y., Gerth, J., & Calmano, W. (2013). Struvite recovery from municipal-wastewater sludge centrifuge supernatant using seawater NF concentrate as a cheap Mg (II) source. *Separation and Purification Technology*, 108, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.002>
- Latifian, M. (2015). *Nutrient recovery from waste streams through struvite formation*. Lund University.
- Lavanya, A., Sri, R., & Thanga, K. (2020). Effective removal of phosphorous from dairy wastewater by struvite precipitation : process optimization using response surface methodology and chemical equilibrium modeling. *Separation Science and Technology*, 00(00), 1–16. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1709080>
- Le Corre, K. S., Valsami-Jones, E., Hobbs, P., & Parsons, S. A. (2005). Impact of calcium on struvite crystal size, shape and purity. *Journal of Crystal Growth*, 283(3), 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2005.06.012>
- Le Corre, K. S., Valsami-Jones, E., Hobbs, P., & Parsons, S. A. (2007). Kinetics of Struvite Precipitation : Effect of the Magnesium Dose on Induction Times and Precipitation Rates. *Environmental Technology*, 28(12), 1317–1324. <https://doi.org/10.1080/09593332808618891>
- Le Corre, K. S., Valsami-Jones, E., Hobbs, P., & Parsons, S. A. (2009). Phosphorus recovery from wastewater by struvite crystallization: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39(6), 433–477. <https://doi.org/10.1080/10643380701640573>
- Lee, Y. K., Kim, H. W., Liu, C. L., & Lee, H. K. (2003). A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. *Journal of Microbiological Methods*, 52, 245–250.
- Leng, Y., Colston, R., & Soares, A. (2020). Chemosphere Understanding the biochemical characteristics of struvite bio-mineralising microorganisms and their future in nutrient recovery. *Chemosphere*, 247, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125799>
- Li, B., Boiarkina, I., Yu, W., Huang, H. M., Munir, T., Wang, G. Q., & Young, B. R. (2019). Phosphorous recovery through struvite crystallization: Challenges for future design. *Science of the Total Environment*, 648(1), 1244–1256. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.166>
- Liberti, L., Petruzzelli, D., & De Florio, L. (2001). REM NUT Ion Exchange Plus Struvite Precipitation Process. *Environmental Technology*, 22(11), 1313–1324.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/09593330409355443>

- Liu, J. C. (2009). Recovery of phosphate and ammonium as struvite from semiconductor wastewater. *Separation and Purification Technology*, 64(3), 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.10.040>
- Liu, Y., Kwag, J., Kim, J., & Ra, C. (2011). Recovery of nitrogen and phosphorus by struvite crystallization from swine wastewater. *Desalination*, 277(1–3), 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.04.056>
- Llanos, J. (2019). *Plan nacional de fertilización y nutrición vegetal 2019-2025*. INIAF, ANAPO, CIAB.
- Loch, T. P., & Faisal, M. (2014). *Chryseobacterium aahli* sp. nov., isolated from lake trout (*Salvelinus namaycush*) and brown trout (*Salmo trutta*), and emended descriptions of *Chryseobacterium ginsenosidimutans* and *Chryseobacterium gregarium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1573–1579. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052373-0>
- Majorova, A., Sysuev, B., Soldatov, V., Hanalieva, I., Puchenkova, O., & Bystrova, N. (2018). Effects of bischofite gel on reparative processes in wound healing, 2018(4), 1278–1281.
- Malaspina, F., Stante, L., Cellamare, C., & Tilche, A. (1995). Cheese whey and cheese factory wastewater treatment with a biological anaerobic-aerobic process. *Water Science and Technology*, 32(12), 59–72.
- Matynia, A., Koralewska, J., Wierzbowska, B., & Piotrowski, K. (2006). The influence of process parameters on struvite continuous crystallization kinetics. *Chemical Engineering Communications*, 193(2), 160–176. <https://doi.org/10.1080/009864490949008>
- Maurer, M., Pronk, W., & Larsen, T. A. (2006). Treatment processes for source-separated urine. *Water Research*, 40(17), 3151–3166. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.07.012>
- Mawson, A. J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology*, 47(3), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90180-5)
- McDonough, F. E., Hargrove, R. E., Mattingly, W. A., Posati, L. P., & Alford, J. A. (1974). Composition and Properties of Whey Protein Concentrates from Ultrafiltration. *Journal of Dairy Science*, 57(12), 1438–1443. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(74\)85086-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(74)85086-1)
- Mclean, R. J. C., Downey, J., Clapham, L., & Nickel, J. C. (1990). A simple technique for studying struvite crystal growth in vitro. *Urological Research*, 18(1), 39–43.
- Mijangos, F., Celaya, A., Ortueta, M., & Muraviev, D. (2013). Analysis of Ion Exchange Isothermal Supersaturation Process for Struvite Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(30), 10276–10283.
- Mirza, M. S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., & Malik, K. A. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, 237(1), 47–54.
- Mogollón, J. M., Beusen, A. H. W., Grinsven, H. J. M. Van, Westhoek, H., & Bouwman, A. F. (2018). Future agricultural phosphorus demand according to the shared socioeconomic

- pathways. *Global Environmental Change*, 50(March), 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2018.03.007>
- Molinos-Senante, M., Hernández-Sancho, F., Sala-Garrido, R., & Garrido-Baserba, M. (2011). Economic Feasibility Study for Phosphorus Recovery Processes. *Ambio*, 40(4), 408–416. <https://doi.org/10.1007/s13280-010-0101-9>
- Montes, C. alberto. (2010). *Estabilización química de carreteras no pavimentadas en el Perú y ventajas comparativas del cloruro de magnesio (bischofita) frente al cloruro de calcio*. Universidad Ricardo Palma.
- Moreno, J., & Albarracín, V. (2012). Aislamiento , cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)*, 5(5), 79–93.
- Morse, G. K., Brett, S. W., Guy, J. A., & Lester, J. N. (1998). Review : Phosphorus removal and recovery technologies. *The Science of the Total Environment*, 212, 69–81.
- Munch, E. V, Barr, K., & Münch, E. V., & Barr, K. (2001). Controlled struvite crystallisation for removing phosphorus from anaerobic digester sidestreams. *Water Research*, 35(1), 151–159. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00236-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00236-0)
- Murphy J, & Riley JP. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemistry Acta*, 27(1), 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Nelson, B., Struble, J., Mccarthy, G., Szh, O., Parmer, C., T-max, K., & Dialux, L. W. (1991). In vitro production of struvite by *Bacillus pumilus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 37(12), 978–983. <https://doi.org/10.1139/m91-169>
- Ohlinger, K., Young, T., & Schroeder, E. (1998). Predicting struvite formation in digestion. *Water Research*, 32(12), 3607–3614.
- Olajuyigbe, F. M., & Ajele, J. O. (2005). Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 776–779.
- Osman, K., Orabi, A., Elbehiry, A., Hanafy, M. H., & Ali, A. M. (2019). *Pseudomonas* species isolated from camel meat : quorum sensing-dependent virulence , biofilm formation and antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 14(7), 609–622.
- Outlook, F. (2017). *Biannual report on global food markets, 2016*.
- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2007). Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.12.016>
- Ozturk, I., Eroglu, V., Ubay, G., & Demir, I. (1993). Hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor (HUASBR) treatment of dairy effluents. *Water Science and Technology*, 28(2), 77–85.
- Pacheco, L., & Alvarez, M. (2016). Optimización del proceso de remoción biológica de fosforo de un lodo activado, 1–13.
- Peng, L., Dai, H., Wu, Y., Peng, Y., & Lu, X. (2018). A comprehensive review of phosphorus

- recovery from wastewater by crystallization processes. *Chemosphere*, 197, 768–781. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.098>
- Perez-Fernandez, C. A., Iriarte, M., Hinojosa-, W., Veizaga-salinas, A., Cano, R. J., Rivera-Perez, J., & Toranzos, A. (2016). First insight into microbial diversity and ion concentration in the Uyuni salt flat, Bolivia. *Caribbean Journal of Science*, 49(1), 57–75.
- Pérez-García I., & R. M. A. (1989). The influence of pH on struvite formation by bacteria. *Chemosphere*, 18(7–8), 1633–1638.
- Piveteau, S., Picard, S., Dabert, P., & Daumer, M. (2017). Dissolution of particulate phosphorus in pig slurry through biological acidification: A critical step for maximum phosphorus recovery as struvite. *Water Research*, 124, 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.017>
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Prieto-García, F., Callejas-Hernández, J., Reyes-Cruz, V. E., & Marmolejo-Santillán, Y. (2012). Electrocoagulación: una alternativa para depuración de lactosuero residual. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales*, 5(3), 51–77.
- Prywer, J., & Torzewska, A. (2009). Bacterially induced struvite growth from synthetic urine: Experimental and theoretical characterization of crystal morphology. *Crystal Growth and Design*, 9(8), 3538–3543. <https://doi.org/10.1021/cg900281g>
- Prywer, J., & Torzewska, A. (2010). Biomineralization of struvite crystals by *Proteus mirabilis* from artificial urine and their mesoscopic structure. *Crystal Research and Technology*, 45(12), 1283–1289. <https://doi.org/10.1002/crat.201000344>
- Prywer, J., & Torzewska, A. (2012). Effect of curcumin against *proteus mirabilis* during crystallization of struvite from artificial urine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(3), 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/862794>
- Prywer, J., Torzewska, A., & Płociński, T. (2012). Unique surface and internal structure of struvite crystals formed by *Proteus mirabilis*. *Urological Research*, 40(6), 699–707. <https://doi.org/10.1007/s00240-012-0501-3>
- Rahman, M., Amran, M., Salleh, M., Rashid, U., Ahsan, A., Mujaffar, M., & Six, C. (2014). Production of slow release crystal fertilizer from wastewaters through struvite crystallization – A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(1), 139–155. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.007>
- Rajkowska, K., Otlewska, A., Koziróg, A., Piotrowska, M., Nowicka-Krawczyk, P., Hachułka, M., & Żydzik-Białek, A. (2014). Assessment of biological colonization of historic buildings in the former Auschwitz II-Birkenau concentration camp. *Annals of Microbiology*, 64(2), 799–808. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0716-8>
- Ramlogan, M. V., & Rouff, A. A. (2016). An investigation of the thermal behavior of magnesium ammonium phosphate hexahydrate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123(1), 145–152. <https://doi.org/10.1007/s10973-015-4860-1>

- Reichenbach, H., & Kleinig, H. (1974). The Pigments of *Flexibacter elegans*: Novel and Chemosystematically Useful Compounds. *Archives Microbiology*, *101*(1), 131–144.
- Rezazakemi, M., Maghami, M., & Mohammadi, T. (2018). Wastewaters treatment containing phenol and ammonium using aerobic submerged membrane bioreactor. *Chemistry Central Journal*, *12*(79), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0450-1>
- Riggio, V. A., Comino, E., & Rosso, M. (2015). Above ground part of common reed to enhance anaerobic co-digestion of farm biomasses: Potential, monitoring and efficiency. *Ecological Engineering*, *79*, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.01.015>
- Rivadeneira, A., Gonzalez-Martinez, A., Gonzalez-Lopez, J., Martin-Ramos, D., Martinez-Toledo, M., & Rivadeneira, M. (2014). Precipitation of Phosphate Minerals by Microorganisms Isolated from a Fixed-Biofilm Reactor Used for the Treatment of Domestic Wastewater. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *11*(4), 3689–3704. <https://doi.org/10.3390/ijerph110403689>
- Rivadeneira, M. A., Pérez-García, I., & Ramos-Cormenzana, A. (1992). Influence of ammonium ion on bacterial struvite production Influence of Ammonium Ion on Bacterial Struvite Production. *Geomicrobiology Journal*, *10*(2), 125–137. <https://doi.org/10.1080/01490459209377912>
- Rivadeneira, M. A., Ramos-Cormenzana, A., & García-Cervigón, M. A. (1983). Bacterial formation of struvite. *Geomicrobiology Journal*, *3*(2), 151–163. <https://doi.org/10.1080/01490458309377792>
- Rivadeneira, M., Pérez-García, I., & Ramos-Cormenzana, A. (1992). Struvite Precipitation by Soil and Fresh Water Bacteria. *Current Microbiology*, *24*(6), 343–347. <https://doi.org/10.1007/BF01571105>
- Rivadeneira, M., Pérez-García, I., & Ramos-Cormenzana, A. (1993). The effect of incubation temperature on struvite formation by bacteria. *Folia Microbiologica*, *38*(1), 5–9.
- Robinson, R., Dickie, A., Rose, T., & Stapleton, A. (1995). Struvite renal calculi caused by *Corynebacterium* group D2. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, *65*(4), 294–295. <https://doi.org/10.1177/0284185157048s15023>
- Ronteltap, M., Maurer, M., Hausherr, R., & Gujer, W. (2010). Struvite precipitation from urine – Influencing factors on particle size. *Water Research*, *44*(6), 2038–2046. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.015>
- Sachs, G., Kraut, J. A., Wen, Y., Feng, J., & Scott, D. R. (2006). Urea Transport in Bacteria: Acid Acclimation by Gastric *Helicobacter* spp. *Journal of Membrane Biology*, *212*(2), 71–82. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0867-7>
- Sadowski, R. R., Prywer, J., & Torzewska, A. (2014). Morphology of struvite crystals as an evidence of bacteria mediated growth, *489*(7), 478–489. <https://doi.org/10.1002/crat.201400080>
- Saidou, H., Korchef, A., Moussa, S. Ben, & Amor, M. Ben. (2015). Ions Influence on Struvite Precipitation from Synthetic Water by Dissolved CO₂ Degasification Technique, (July), 41–51.

- Sánchez-Navas, A., Martín-Algarra, A., Rivadeneyra, M. A., Melchor, S., & Martín-Ramos, J. D. (2009). Crystal-growth behavior in Ca-Mg carbonate bacterial spherulites. *Crystal Growth and Design*, 9(6), 2690–2699. <https://doi.org/10.1021/cg801320p>
- Sánchez-Román, M., Rivadeneyra, M. A., Vasconcelos, C., & McKenzie, J. A. (2007). Biomineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(2), 273–284. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00336.x>
- Sánchez-Román, M., Romanek, C. S., Fernández-Remolar, D. C., Sánchez-Navas, A., McKenzie, J. A., Pibernat, R. A., & Vasconcelos, C. (2011). Aerobic biomineralization of Mg-rich carbonates: Implications for natural environments. *Chemical Geology*, 281(3–4), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2010.11.020>
- Sang, M. K., Jeong, J., Kim, J., & Kim, K. D. (2018). Growth promotion and root colonisation in pepper plants by phosphate-solubilising *Chryseobacterium* sp. strain ISE14 that suppresses *Phytophthora* blight. *Annals of Applied Biology*, 172(2), 208–223. <https://doi.org/10.1111/aab.12413>
- Schink, B., Thiemann, V., Laue, H., & Friedrich, M. W. (2002). *Desulfotignum phosphitoxidans* sp. nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes phosphite to phosphate. *Archives of Microbiology*, 177(5), 381–391. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0402-x>
- Sharma, A., Angulo-bejarano, P., Fierros-Romero, G., Vallejo, R., Gomez-García, K., & Ruiz, G. (2018). Struvite production by *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(1), 812–814. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.8.2.812-814>
- Shen, F., Ka, P., Young, C., Lai, W., & Arun, A. B. (2005). *Chryseobacterium taichungense* sp. nov., isolated from contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1301–1304. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63514-0>
- Shen, J., Chen, J., Jensen, P. R., & Solem, C. (2019). Development of a novel, robust and cost-efficient process for valorizing dairy waste exemplified by ethanol production. *Microbial Cell Factories*, 18(51), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1091-3>
- Shimamura, K., Tanaka, T., Miura, Y., & Ishikawa, H. (2003). Development of a high-efficiency phosphorus recovery method using a fluidized-bed crystallized phosphorus removal system. *Water Science and Technology*, 48(1), 163–170.
- Shu, L., Schneider, P., Jegatheesan, V., & Johnson, J. (2006). An economic evaluation of phosphorus recovery as struvite from digester supernatant. *Bioresource Technology*, 97(1), 2211–2216. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.005>
- Sigurdarson, J. J., Svane, S., & Karring, H. (2018). The molecular processes of urea hydrolysis in relation to ammonia emissions from agriculture. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 17Ammonia(2), 241–258. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9466-1>
- Simoës, F., Vale, P., Stephenson, T., & Soares, A. (2018a). The role of pH on the biological struvite production in digested sludge dewatering liquors. *Scientific Reports*, 8(1), 7225. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25431-7>
- Simoës, F., Vale, P., Stephenson, T., & Soares, A. (2018b). Understanding the growth of the

- bio-struvite production *Brevibacterium antiquum* in sludge liquors. *Environmental Technology*, 39(17), 2278–2287. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1411399>
- Sinha, A., Singh, A., Kumar, S., & Khare, S. K. (2014). ScienceDirect Microbial mineralization of struvite: A promising process to overcome phosphate sequestering crisis. *Water Research*, 54, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.039>
- Soares, A., Veeram, M., Simoes, F., Wood, E., Parsons, S. A., & Stephenson, T. (2014). Bio-Struvite: A new route to recover phosphorus from wastewater. *Clean - Soil, Air, Water*, 42(7), 994–997. <https://doi.org/10.1002/clen.201300287>
- Song, Y. H., Qiu, G. L., Yuan, P., Cui, X. Y., Peng, J. F., Zeng, P., ... Qian, F. (2011). Nutrients removal and recovery from anaerobically digested swine wastewater by struvite crystallization without chemical additions. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1–3), 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.015>
- Soriano, F., Ponte, C., Santamaria, M., Castilla, C., & Fernandez Robla, 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.
- Spencer, H. K., Spitznogle, S. L., Borjan, J., & Aitken, S. L. (2020). An Overview of the Treatment of Less Common Non – Lactose-Fermenting Gram-Negative Bacteria. *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 40(9), 936–951. <https://doi.org/10.1002/phar.2447>
- Srinivasan, G., Muthusamy, S., Raveendran, V., & Joseph, N. M. (2016). Unforeseeable presentation of *Chryseobacterium indologenes* infection in a paediatric patient. *BMC Research Notes*, 212(9), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2022-6>
- Stolzenburg, P., Capdevielle, A., Teychené, S., & Biscans, B. (2015). Struvite precipitation with MgO as a precursor: Application to wastewater treatment. *Chemical Engineering Science*, 133, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.03.008>
- Stratful, I., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2001). Conditions Influencing the Precipitation of Magnesium Ammonium Phosphate. *Water Research*, 35(17), 4191–4199. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00143-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00143-9)
- Suzina, N., Duda, V., Esikova, T., Shorokhova, A., Gafarov, A., Oleinikov, R., ... Boronin, A. (2011). Novel Ultramicrobacteria, Strains NF4 and NF5, of the Genus *Chryseobacterium*: Facultative Epibionts of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 80(4), 535–548. <https://doi.org/10.1134/S0026261711040187>
- Suzuki, K., Tanaka, Y., Osada, T., & Waki, M. (2002). Removal of phosphate, magnesium and calcium from swine wastewater through crystallization enhanced by aeration. *Water Research*, 36, 2991–2998.
- Talboys, P., Heppell, J., Roose, T., Healey, J., Jones, D., & Withers, P. (2016). Struvite: a slow-release fertiliser for sustainable phosphorus management? *Plant and Soil*, 401(1–2), 109–123. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2747-3>
- Tansel, B., Lunn, G., & Monje, O. (2018). Struvite formation and decomposition characteristics for ammonia and phosphorus recovery: A review of magnesium-ammonia- phosphate

- interactions. *Chemosphere*, *194*, 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.004>
- Tauch, A., Trost, E., Tilker, A., Ludewig, U., Schneiker, S., Goesmann, A., ... Pühler, A. (2008). The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing. *Journal of Biotechnology*, *136*(1–2), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.02.009>
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Casey, P., Muster, T., Gill, H., & Adhikari, B. (2014). Enhanced efficiency fertilisers: a review of formulation and nutrient release patterns. *Society of Chemical Industry*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6812>
- Uludag-Demirer, S., Demirer, G. N., & Chen, S. (2005). Ammonia removal from anaerobically digested dairy manure by struvite precipitation. *Process Biochemistry*, *40*(12), 3667–3674. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.02.028>
- Ushak, S., Gutierrez, A., Galleguillos, H., Fernandez, A. G., Cabeza, L. F., & Grágeda, M. (2015). Solar Energy Materials & Solar Cells Thermophysical characterization of a by-product from the non-metallic industry as inorganic PCM. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, *132*, 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2014.08.042>
- Van-Loosdrecht, M., Hooijmans, C., Brdjanovic, D., & Heijnen, J. (1997). Biological phosphate removal processes. *Appl Microbiol Biotechnol (1997)*, *48*, 289–296.
- Van den Berg, L., & Kennedy, K. J. (1983). Dairy waste treatment with anaerobic stationary fixed film reactors. *Water Science and Technology*, *15*, 359–368.
- Vaneechoutte, M., Ka, P., & Baere, T. De. (2007). *Chryseobacterium hominis* sp. nov., to accommodate clinical isolates biochemically similar to CDC groups II-h and II-c. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(1), 2623–2628. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65158-0>
- Velásquez, C., Santillán, M., Mendoza, E., & Soza, G. (2008). Sepsis neonatal por *Chryseobacterium meningosepticum*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *25*(4), 439–441.
- Venil, C., Zkaria, Z., Usha, R., & Ahmad, W. (2014). Isolation and characterization of flexirubin type pigment from *Chryseobacterium* sp. UTM-3T. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *3*(4), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.006>
- Wang, C., Hao, X., Guo, G., & Loosdrecht, M. C. M. Van. (2010). Formation of pure struvite at neutral pH by electrochemical deposition. *Chemical Engineering Journal*, *159*(1–3), 280–283. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.02.026>
- Wang, S., Yang, C.-H., Liang, T.-W., & Yen, Y.-H. (2008). Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001. *Bioresource Technology*, *99*(1), 3700–3707. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.036>
- Wassif, C., Cheek, D., & Belas, R. (1995). Molecular Analysis of a Metalloprotease from *Proteus mirabilis* †. *Journal of Bacteriology*, *177*(20), 5790–5798.
- Wietelmann, U., & Klett, J. (2018). 200 Years of Lithium and 100 Years of Organolithium

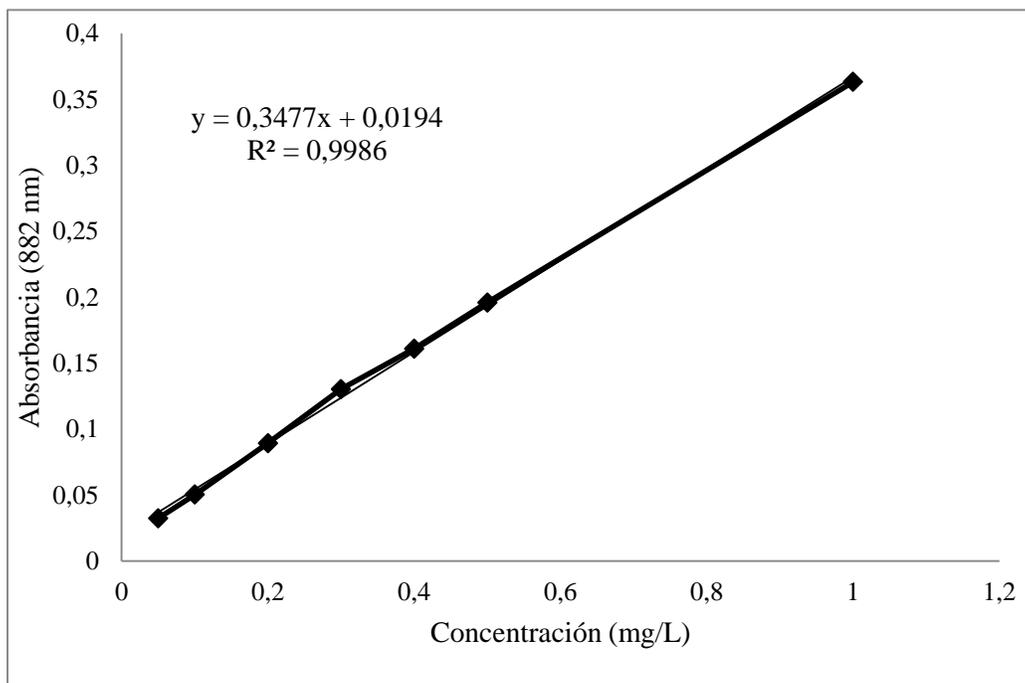
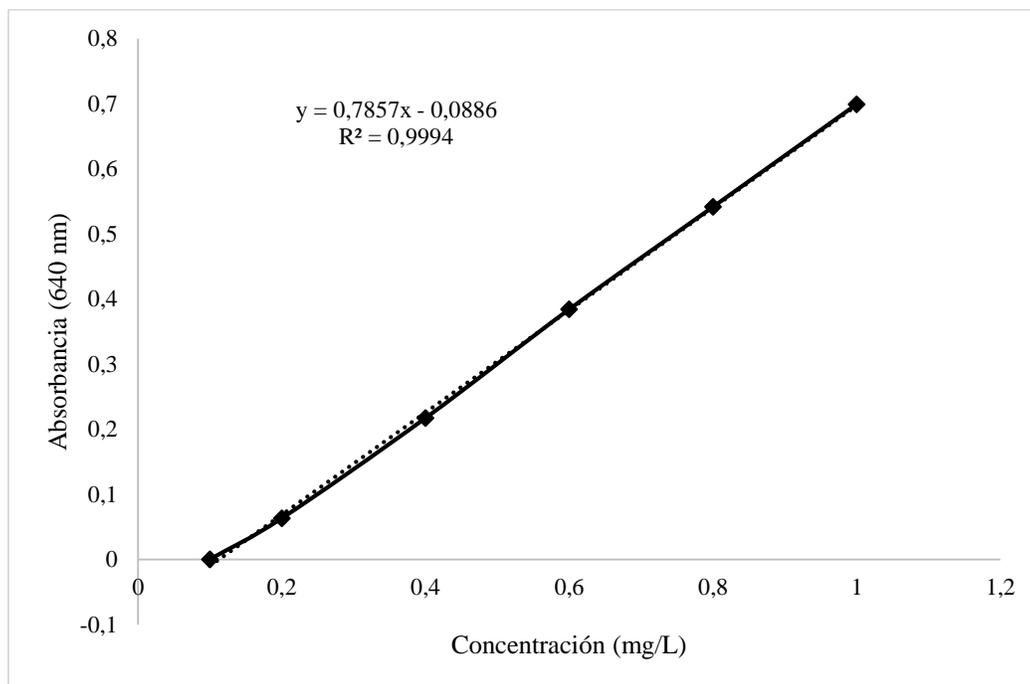
-
- Chemistry. *Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie*, 644(4), 194–204. <https://doi.org/10.1002/zaac.201700394>
- Yetilmezsoy, K., Ilhan, F., Kocak, E., & Akbin, H. M. (2017). Feasibility of struvite recovery process for fertilizer industry : A study of fi nancial and economic analysis. *Journal of Cleaner Production*, 152, 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.106>
- Yildirim, S., Yeoman, C. J., Sipos, M., Torralba, M., Wilson, B. A., Tony, L., ... Nelson, K. E. (2010). Characterization of the Fecal Microbiome from Non- Human Wild Primates Reveals Species Specific Microbial Communities. *Plos One*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013963>
- Yucel, N., Erdem, B., & Kaya, D. (2005). Some virulence properties and characterization of motile Aeromonas species from milk and white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 58(2), 106–110.
- Zainab, R., Vijayaraghavalu, S., Prasad, H., & Kumar, M. (2019). Treatment and Recycling of Wastewater from Dairy Industry. In *Springer* (pp. 91–115). <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1468-1>
- Zammit, G., Sánchez-Moral, S., & Albertano, P. (2011). Bacterially mediated mineralisation processes lead to biodeterioration of artworks in Maltese catacombs. *Science of the Total Environment*, 409(14), 2773–2782. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.03.008>
- Zhu, H., Sun, X., Lu, J., Wang, M., Fang, Y., & Ge, W. (2012). The effect of plum juice on the prevention of struvite calculus formation in vitro. *BJU International*, 110(8), E362–E367. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11090.x>

10. ANEXOS

Anexo I. Antibiotipo para Enterobacterias y *Escherichia coli* ATCC 25922 empleada como cepa de referencia

Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			<i>E. coli</i> ATCC 25922 Intervalo
		Resistente	Intermedio	Sensible	
<i>Levofloxacin</i>	5	≤13	14-16	≥17	29-37
<i>Amoxicilina - Ac. Clavulánico</i>	30	≤13	14-17	≥18	19-25
<i>Ampicilina</i>	10	≤13	14-16	≥17	16-22
<i>Imipenem</i>	10	≤13	14-15	≥16	26-32
<i>Cotrimoxazol</i>	25	≤10	11-16	≥17	24-32
<i>Cloranfenicol</i>	30	≤12	13-17	≥18	21-27
<i>Tetraciclina</i>	30	≤14	15-18	≥19	18-25
<i>Gentamicina</i>	10	≤12	13-14	≥15	19-26
<i>Aztreonam</i>	30	≤15	16-21	≥22	28-36
<i>Cefepime</i>	30	≤14	15-17	≥18	29-35

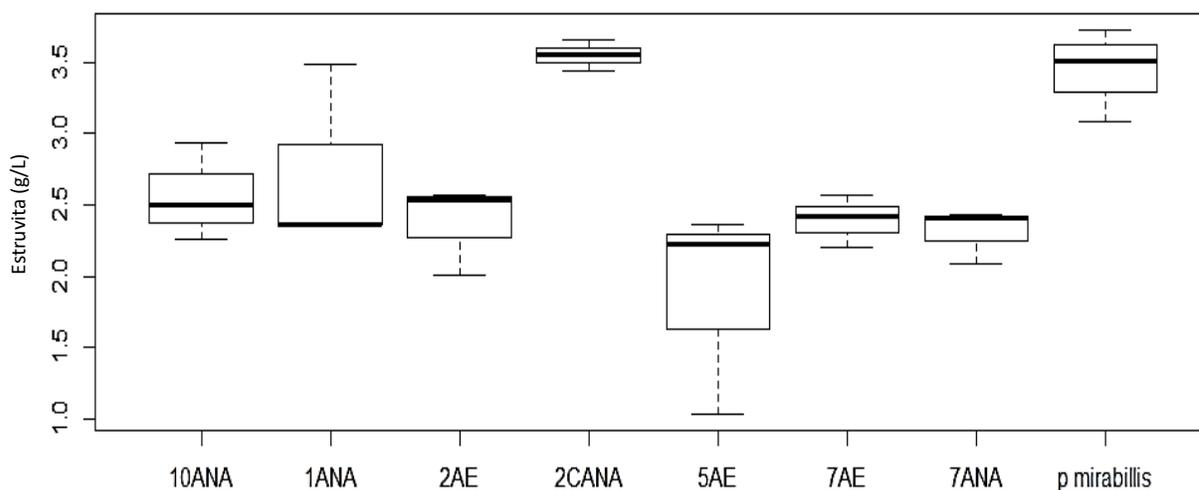
Fuente: Adaptado de NCCLS, 2000

Anexo 2. Curva de calibración de fósforo - Método del ácido ascórbico**Anexo 3.** Curva de calibración de N-NH₄ - Método salicilato – hipoclorito

Anexo 4. Cepas aisladas a partir del consorcio microbiano “BIOFOS”

Nº	Código	Actividad Ureasa	Morfología de la colonia			
			Color	Tamaño	Consistencia	Forma
1	1BANA	Negativo	Amarillo Pardo	Mediano	Viscoso	Circular
2	2ANA	Negativo	Blanco	Pequeño	Viscoso	Circular
3	1ANA	Positivo	Amarillo Dorado	Grande	Viscoso	Circular
4	2CANA	Positivo	Amarillo Pardo	Mediano	Mucoide	Circular
5	2BANA	Negativo	Amarillo Pardo	Pequeño	Cre moso	Circular
6	3ANA	Negativo	Transparente	Pequeño	Mucoide	Circular
7	4ANA	Negativo	Transparente	Mediano	Mucoide	Circular
8	5ANA	Negativo	Amarillo	Mediano	Viscoso	Circular
9	6ANA	Positivo	Amarillo Pardo	Grande	Viscoso	Circular
10	7ANA	Positivo	Amarillo	Mediano	Cre moso	Circular
11	8ANA	Negativo	Amarillo Crema	Mediano	Cre moso	Circular
12	9ANA	Negativo	Amarillo	Mediano	Cre moso	Irregular
13	10ANA	Positivo	Amarillo	Mediano	Viscoso	Circular
14	1AE	Negativo	Amarillo	Mediano	Viscoso	Irregular
15	2AE	Positivo	Blanco	Mediano	Viscoso	Circular
16	3AE	Negativo	Transparente	Mediano	Viscoso	Circular
17	4AE	Negativo	Amarillo	Pequeño	Cre moso	Circular
18	5AE	Positivo	Blanco	Pequeño	Cre moso	Circular
19	5BAE	Positivo	Blanco	Pequeño	Seco	Irregular
20	6AE	Negativo	Transparente	Grande	Mucoide	Circular
21	7AE	Positivo	Blanco	Grande	Viscoso	Irregular
22	8AE	Negativo	Transparente	Mediano	Mucoide	Circular
23	9AE	Negativo	Transparente	Pequeño	Mucoide	Circular
24	10AE	Negativo	Transparente	Grande	Mucoide	Irregular
25	10BAE	Negativo	Amarillo	Mediano	Mucoide	Irregular

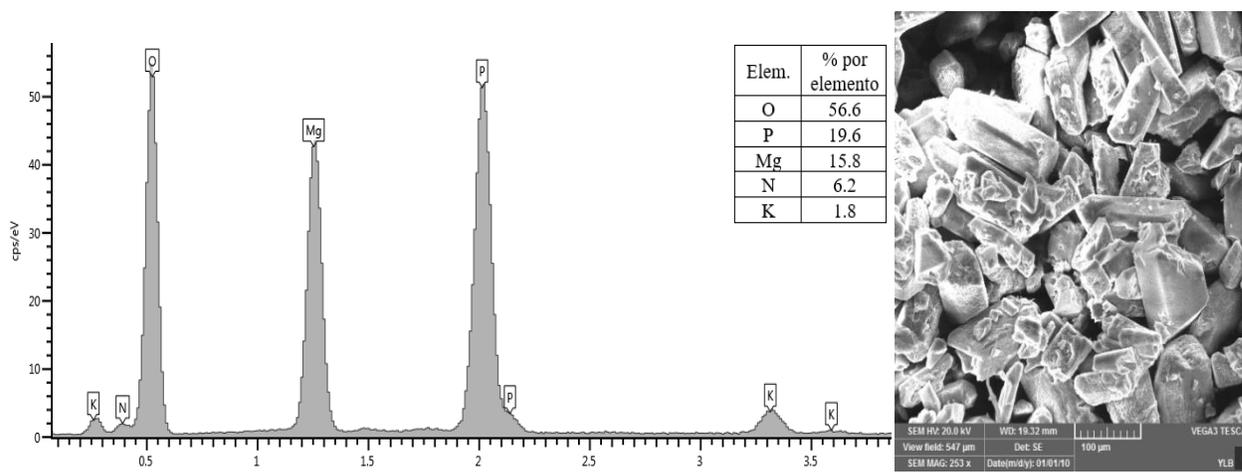
Anexo 5. Producción de bioestruvita en medio B41 por las cepas aisladas seleccionadas a partir del consorcio microbiano “BIOFOS”



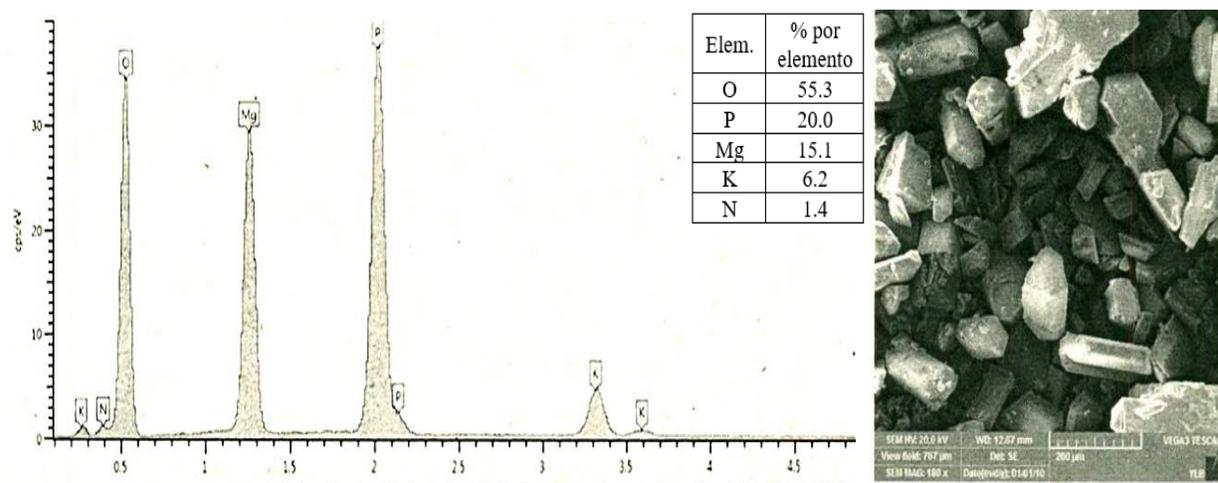
Anexo 6. Contenido de carbono (DQO), nitrógeno total (N-total) y fósforo (P-PO₄) del suero lácteo proveniente de la empresa “Flor de Leche S.R.L.” y proporción de N y P, considerando una concentración de DQO (70400,0 mg/L) que representa 100 partes. La Paz-Bolivia, agosto de 2018.

Elemento	Concentración (mg/L)	Proporción
Carbono	70400,0	100
Nitrógeno	1010	1,4
Fósforo	140,03	0,2

Anexo 7. A. Elementos principales en muestras de cristales de estruvita **B.** Morfología de los cristales de estruvita formada por la cepa 2CANA en medio B41 observadas por EDS.



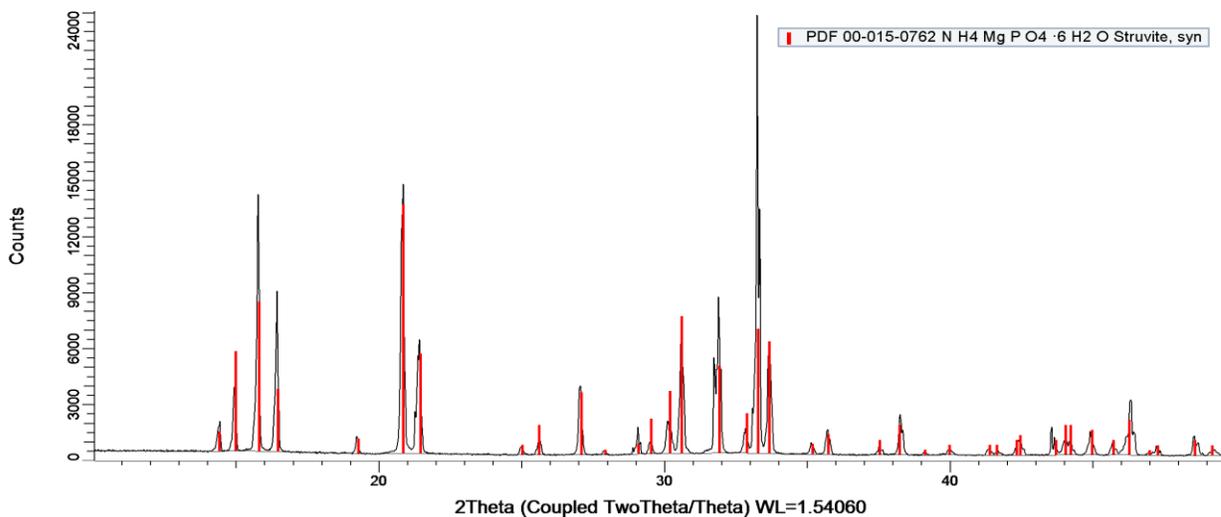
Anexo 8. A. Elementos principales en muestras de cristales de estruvita **B.** Morfología de los cristales de estruvita observadas por EDS, formada por la cepa 2CANA mediante el proceso biológico simultáneo de cultivo y producción.



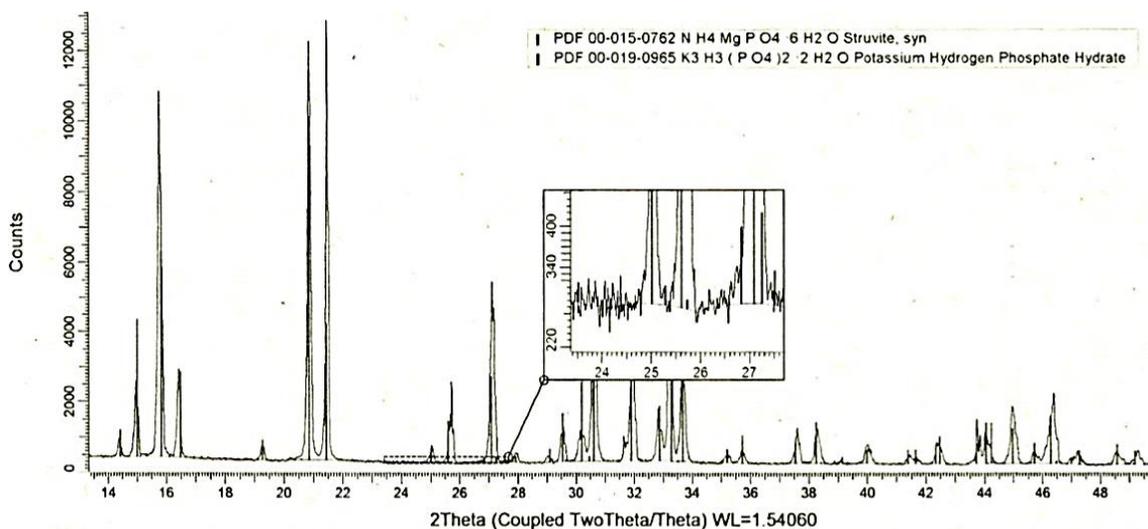
Espectro 5. Análisis elemental y su porcentaje obtenido por EDS.

Micrografía: 5

Anexo 9. Patrón de difracción de rayos X correspondiente a cristales de estruvita formados por la cepa 2CANA en medio B41.



Anexo 10. Patrón de difracción de rayos X correspondiente a cristales de estruvita formados por la cepa 2CANA en medios formulados a base de suero lácteo mediante el proceso biológico simultáneo de cultivo y producción.



Espectro 6. Análisis realizado por DRX con la identificación de fases presentes en la muestra.

Anexo II. Estimación de costos para la producción de estruvita mediante procesos fisicoquímico y biológicos

TIPO DE GASTO	PROCESO FISICOQUÍMICO	PROCESO BIOLÓGICO SEPARADO	PROCESO BIOLÓGICO SIMULTÁNEO
Fuente de Mg (bischofita) (Bs/kg estruvita)	0,92	0,60	0,46
Fuente de N (urea) (Bs/kg estruvita)	-	6,44	2,47
Fuente de N (cloruro de amonio) (Bs/kg estruvita)	7,00	-	-
Fuente de P (K ₂ HPO ₄) (Bs/kg estruvita)	0,01	0,01	0,01
Suero lácteo (Bs/kg estruvita)	0,0	0,0	0,0
NaOH (grado técnico) (Bs/kg estruvita)	65,54	-	-
Electricidad (13,52 Bs/día) ¹	40,55	40,55	202,75
Salario del personal (100 Bs/día) ²	300,0*	300,0*	1500,0**
TOTAL (Bs/kg)	414,0	347,6	1705,7
TOTAL (Sus/kg)	59,1	49,7	243,7

¹ (0.88 Bs/KWH) Obtenido de la autoridad de Electricidad <https://t.co/yXwudnSyQB> en abril de 2019. Se consideró el costo de la energía por el uso del equipo que requiere 0.64 KW para la agitación de muestras.

² Se consideró el Salario Mínimo Nacional establecido por el Ministerio de Economía.

*El tiempo total del proceso es de 3 días.

** El tiempo total del proceso es de 15 días.