



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ingeniería Agrícola  
Programa de Doctorado en Recursos Hídricos y Energía para la Agricultura

**Explorando fronteras en el reúso y valorización de aguas residuales  
agrícolas mediante bacterias lácticas antárticas: hacia nuevos  
enfoques para una economía circular**

Tesis para optar al grado de Doctora en Recursos Hídricos y Energía para la  
Agricultura

OLGA DEL CARMEN HERRERA VEGA  
CHILLÁN-CHILE  
2025

Profesor Guía: Johannes de Bruijn  
Depto. de Agroindustrias  
Facultad de Ingeniería Agrícola  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Agroindustrias de la Facultad de Ingeniería Agrícola, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

---

Dr. Johannes de Bruijn  
Facultad de Ingeniería Agrícola  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora

---

Dr. Gastón Merlet Venturelli  
Facultad de Ingeniería Agrícola  
Universidad de Concepción

---

Dr. Homero Urrutia Briones  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Manuel Alarcón Vivero  
Instituto de Acuicultura  
Universidad Austral de Chile

Director de Programa

---

Dr. Sebastián Krogh Navarro  
Facultad de Ingeniería Agrícola  
Universidad de Concepción

## Agradecimientos

En primer lugar, a mis padres, Carmen y Juan Carlos, por su eterno amor, sacrificio y la entrega de herramientas necesarias para lograr desenvolverme. A mi hermana Constanza, por ser un pilar fundamental y porque definitivamente mi vida no sería igual sin ella. A Roberto, mi compañero y confidente de alegrías y momentos tristes, por su apoyo incondicional tanto en lo personal como profesional.

A Antonia, por su desinteresado apoyo y por incontables trasnoches ayudándome con los análisis de datos. A María Leonor, por tantas risas y lágrimas compartidas y porque su amistad ha sido de los mejores regalos entregados por la Universidad. A Ron y a Fergus, por acompañar de manera silenciosa las noches de estudio y hacer mucho más amenos los días.

A la Universidad de Concepción, Facultad de Ingeniería Agrícola, Laboratorio de Biotecnología Hidroambiental y a la gente que allí conocí, especialmente la Decana Dra. María Eugenia González y Dr. Sebastián Krogh, quienes me brindaron su apoyo para lograr dar término a mis estudios de posgrado.

A mi comisión evaluadora, Dr. Homero Urrutia, Dr. Manuel Alarcón y Dr. Gastón Merlet, por su dedicación y consejos. A Claudia Faúndez por su asesoría y ayuda para lograr terminar esta tesis.

A mi tutor, Dr. Johannes de Bruijn, quien no solo ha guiado este trabajo con su conocimiento y experiencia, sino que también ha sabido ver a la persona por sobre el estudiante. Su apoyo incondicional, comprensión y confianza en mí han sido fundamentales en este camino. Gracias por su paciencia, por sus consejos más allá de lo académico y por recordarme que detrás de cada logro hay un esfuerzo que merece ser valorado.

Al proyecto RT\_42-17 del Instituto Antártico Chileno y a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) a través de la beca 2020-21200950.

A todos quienes de alguna u otra forma contribuyeron con el desarrollo de esta tesis, muchas gracias.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I: Introducción .....	1
1. Introducción .....	1
1.1. Escasez hídrica y pérdida de tierras agrícolas.....	2
1.2. Implicaciones de la escasez de fertilizantes.....	5
1.3. Reutilización del agua.....	6
1.4. Bacterias como alternativa de tratamiento para valorizar residuos.....	8
1.5. Arqueas como facilitadoras de la digestión microbiana .....	12
1.6. Bacterias extremófilas como alternativa para uso en valorización.....	13
1.7. Fundamento del tratamiento residual porcino .....	14
1.8. Relevancia de las bacterias ácido lácticas .....	25
1.9. Hipótesis.....	27
1.10. Objetivos .....	28
1.11. Referencias .....	28
CAPÍTULO II: Prácticas avanzadas en la sostenibilidad: exploración de alternativas para la reutilización de aguas residuales y la recuperación de nutrientes a partir de efluentes de la producción animal, una revisión.....	45
2.1. Introducción.....	46
2.2. Características de las aguas residuales de ganado y aves de corral .....	47
2.3. Aguas residuales de ganado .....	47
2.4. Aguas residuales avícolas .....	48
2.5. Aguas residuales porcinas .....	49

2.6. Tratamientos físicos y químicos .....	49
2.7. Filtración por membrana.....	54
2.8. Tratamientos biológicos.....	55
2.9. Microalgas .....	56
2.10. Consorcios microalgas-bacterias .....	59
2.11. Retos futuros: las bacterias lácticas como alternativa de valorización de residuos.....	61
2.12. Conclusiones .....	63
2.13. Referencias .....	64
CAPÍTULO III: Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas provenientes de matrices antárticas.....	
3.1 Introducción.....	79
3.2 Materiales y métodos.....	82
3.2.1. Muestreo .....	82
3.2.2. Aislamiento.....	83
3.2.3. Caracterización bioquímica .....	84
3.2.4. Secuenciación e identificación .....	85
3.2.5. Hidrofobicidad de la superficie celular (HCS).....	85
3.2.6. Resistencia al calor, al NaCl y al pH .....	87
3.2.7. Análisis estadístico y tratamiento de datos .....	88
3.3. Resultados y discusión .....	89
3.3.1. Muestreo .....	89
3.3.2. Aislamiento.....	91
3.3.3. Caracterización bioquímica .....	94
3.3.4. Determinación molecular de los aislados bacterianos.....	97

3.3.5. Hidrofobicidad de la superficie celular (HCS).....	102
3.3.6. Resistencia al calor.....	104
3.3.7. Cloruro de sodio.....	107
3.3.8. pH inicial.....	111
3.4. Conclusiones.....	118
3.5. Referencias.....	119
CAPÍTULO IV: Evaluación del uso de bacterias ácido lácticas provenientes de Antártica en el tratamiento de aguas residuales agropecuarias.....	133
4.1. Introducción.....	134
4.2. Materiales y métodos.....	139
4.2.1. Preparación de medio de cultivo.....	139
4.2.1.1. Purín.....	139
4.2.1.2. Suero de queso.....	139
4.2.1.3. Preparación del medio purín.....	140
4.2.2. Ensayos.....	141
4.2.2.1. Ensayo de crecimiento en medio purín.....	141
4.2.2.2. Ensayo de actividad antibacteriana.....	142
4.2.2.3. Ensayo de hidrofobicidad en superficie.....	142
4.2.2.4. Medición de materia orgánica a través de demanda química de oxígeno (DQO).....	142
4.2.2.5. Análisis de exopolisacáridos (EPS).....	143
4.2.2.6. Análisis fisicoquímico del agua tratada.....	144
4.2.2.7. Análisis microbiológico del agua tratada.....	144
4.2.2.8. Ensayo de fitotoxicidad.....	145
4.2.3. Análisis estadístico de los resultados.....	146

4.3 Resultados y discusión .....	146
4.3.1. Ensayo de crecimiento en medio purín .....	146
4.3.2. Ensayo de actividad antimicrobiana .....	151
4.3.3. Ensayo de hidrofobicidad en superficie .....	155
4.3.4. Medición de materia orgánica a través de demanda química de oxígeno (DQO) .....	158
4.3.5. Análisis de exopolisacáridos (EPS) .....	162
4.3.6. Análisis fisicoquímico del agua tratada .....	166
4.3.7. Análisis microbiológico del agua tratada.....	169
4.3.8. Ensayo de fitotoxicidad .....	174
4.4. Conclusiones.....	179
4.5. Referencias .....	182
CAPÍTULO V: Discusión general .....	198
5.1 Referencias .....	204

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Compuestos de aguas residuales ganaderas sintetizados por microalgas (a) y sus aplicaciones (b). Adaptado de López-Sánchez et al. (2022a).....	58
Figura 2.2. Productos obtenidos a partir de efluentes ganaderos y avícolas mediante bacterias lácticas.....	62
Figura 2.3. Esquema del sistema de tratamiento integrado propuesto para la reutilización y valorización de las aguas residuales ganaderas y avícolas.....	63
Figura 3.1. Localización de las zonas muestreadas.....	82
Figura 3.2. Porcentaje de hidrofobicidad de la superficie celular de tres aislados antárticos al xileno, tolueno y hexadecano. ....	103
Figura 3.3. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo a 25°C para tres cepas antárticas. ....	105
Figura 3.4. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo a 35°C para tres cepas antárticas. ....	105
Figura 3.5. Cambio del pH del medio de cultivo a 25°C para tres cepas lácticas. ....	106
Figura 3.6. Cambio del pH del medio de cultivo a 35°C para tres cepas lácticas. ....	106
Figura 3.7. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo al 2% de NaCl para tres cepas antárticas.....	108
Figura 3.8. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo al 4% de NaCl para tres cepas antárticas.....	108
Figura 3.9. Cambio del pH a lo largo del tiempo para las cepas antárticas al 2% de NaCl.....	109
Figura 3.10. Cambio del pH a lo largo del tiempo para las cepas antárticas al 4% de NaCl. ...	109
Figura 3.11. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo a pH 6,0 para tres cepas antárticas.....	112

Figura 3.12. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo a pH 7,0 para tres cepas antárticas. ....	112
Figura 3.13. Cambio de pH a lo largo del tiempo para las cepas antárticas a partir de un pH inicial de 6,0.....	113
Figura 3.14. Cambio de pH a lo largo del tiempo para las cepas antárticas a partir de un pH inicial de 7,0.....	113
Figura 4.1. Variación de pH en la fermentación láctica de diversas cepas de BAL antártica en medio purín. Se presentan valores medios con su desviación estándar ( $n=3$ ). ....	147
Figura 4.2. Variación de absorbancia ( $A_{500}$ ) en la fermentación láctica de diversas cepas de BAL antártica en medio purín. Se presentan valores medios con su desviación estándar ( $n=3$ ). ....	147
Figura 4.3. Actividad antimicrobiana del cultivo en caldo para los cinco aislados (14, 43, 58, 157, 171) de BAL antártica sobre <i>Salmonella enterica</i> . ....	152
Figura 4.4. Valores de hidrofobicidad de superficie celular para aislados de BAL antártica. Valores expresados como promedio y barra de error corresponde a desviación estándar ( $n=3$ ).....	156
Figura 4.5. Demanda química de oxígeno para bacterias ácido lácticas antárticas. P: purín solo; P+S: medio purín. Valores expresados como promedio y barra de error corresponde a desviación estándar ( $n=3$ ). ....	158
Figura 4.6. Concentraciones de EPS producidas por diversas cepas de BAL antárticas y sus controles. Valores expresados como promedio y barra de error corresponde a desviación estándar.....	162
Figura 4.7. Índices de germinación para semillas de <i>R. sativus</i> sometidas a ensayo con medio purín fermentado con BAL antártica. ....	175
Figura 4.8. Longitud radicular para cada tratamiento fermentado con aislado de BAL antártica. Valores corresponden a la media con la desviación estándar ( $n=3$ ) .....	176

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Microorganismos participantes en procesos anaerobios que se adaptan a diferentes rangos de temperatura.....	10
Tabla 1.2. Microorganismos participantes en procesos anaerobios que se adaptan a diferentes rangos de pH. ....	11
Tabla 2.1. Valores de los parámetros de calidad del agua encontrados en las aguas residuales de ganado y aves de corral.....	48
Tabla 2.2. Procesos fisicoquímicos estudiados para eliminar residuos y conseguir la reutilización de aguas residuales ganaderas.....	50
Tabla 2.3. Límite máximo o rango de algunos parámetros para la descarga de residuos líquidos según la legislación ambiental chilena. ....	52
Tabla 2.4. Reutilización de las aguas residuales de las industrias ganadera, avícola y láctea, y su eficiencia de eliminación. ....	53
Tabla 2.5. Principales especies de microalgas y productos generados a partir de aguas residuales ganaderas y sus aplicaciones.....	56
Tabla 3.1. Muestras recogidas provenientes de diferentes matrices en la isla Rey Jorge. ....	89
Tabla 3.2. Aislados bacterianos seleccionados. ....	91
Tabla 3.3. Identificación de las cepas aisladas y seleccionadas según el kit API 50 CH. ....	94
Tabla 3.4. Identificación de aislados bacterianos antárticos mediante secuenciación del ARNr 16S.....	98
Tabla 4.1. Parámetros fisicoquímicos iniciales de purín de cerdo.....	141
Tabla 4.2. Actividad antibacteriana del sobrenadante y del cultivo en caldo de aislados antárticos contra patógenos comunes.....	151
Tabla 4.3. Diferencias estadísticamente significativas (*) según el test de Tukey HSD entre los valores de DQO para las cepas antárticas y los controles.....	158
Tabla 4.4. Diferencias estadísticamente significativas (*) según el test de U de Mann Whitney entre los valores de EPS para las cepas antárticas y los controles. ....	162

Tabla 4.5. Parámetros fisicoquímicos para cepas de BAL antárticas fermentadas en medio purín y criterios de calidad de agua según la norma chilena NCh 1333.....	166
Tabla 4.6. Análisis microbiológico durante el proceso de fermentación de BAL en medio purín. Valores corresponden a promedio con su respectiva desviación estándar (n=3). .....	170
Tabla 4.7. Comparación estadística con diferencia significativa (*) según test de Tukey HSD para la viabilidad a 0 horas, coliformes y E. coli.....	170
Tabla 4.8. Comparación estadística con diferencias significativas (*) según test de U de Mann Whitney entre los valores crecimiento radicular para aislados antárticos y los controles.....	176

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación (3.1) para calcular hidrofobicidad .....	86
Ecuación (4.1) para calcular porcentaje de germinación relativa de semilla .....	145
Ecuación (4.2) para calcular porcentaje de crecimiento radicular relativo.....	145
Ecuación (4.3) para calcular índice de germinación .....	145

## RESUMEN

El agua es un recurso vital no solo para la vida sino para el desarrollo sostenible. Por otro lado, el consumo de agua del sector pecuario es elevado y además produce grandes volúmenes de aguas residuales ricas en nutrientes. El reúso y valorización del agua residual pecuaria emerge como alternativa para la sostenibilidad ambiental y la preservación de los recursos naturales. En esta tesis se realizó una investigación sobre vías de tratamiento terciario de aguas residuales provenientes del sector pecuario, la reutilización del agua y la valorización de los nutrientes resultantes para diferentes aplicaciones. Los residuos concentrados obtenidos en los productos finales de este tratamiento demostraron poder ser valorizados mediante tratamientos adicionales con microorganismos, entre los cuales fue posible identificar bacterias lácticas no patógenas para el ser humano. Estas bacterias son altamente promisorias para la producción de bioproductos en la agroindustria y la industria farmacéutica, pero todavía exigen mayor investigación y desarrollo tecnológico para poder ser implementadas a nivel industrial. Como la Antártida es reconocida por albergar microorganismos adaptados a condiciones extremas, las bacterias lácticas presentes en el medio pueden tener muchas de sus aplicaciones y alcances potenciales que todavía no han sido explorados. En este estudio, se procedió al aislamiento e identificación de diferentes cepas de bacterias lácticas a partir de diversas matrices ambientales antárticas. Se identificaron especies como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella confusa*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus faecium*. En particular, *Weissella confusa* presentó un alto nivel de tolerancia ambiental, creciendo óptimamente en 2-4% NaCl, 25-35°C y pH de 6,0 a 7,0. Una alta hidrofobicidad indica su potencial uso en la remediación biológica de suelos y aguas contaminadas. Por otro lado, se evaluó el potencial de diferentes cepas para ser utilizadas en la bioconversión de purines de cerdo cuando se mezclan con suero de queso, además de su posible uso com

biofertilizante. La selección se basa en su potencial capacidad antimicrobiana, hidrofobicidad, producción de exopolisacáridos y demanda química de oxígeno. El producto de fermentación se sometió a análisis fisicoquímico y microbiológico y un ensayo de fitotoxicidad con semillas de rábano (*Raphanus sativus*). Como resultado, *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium* mostraron ser útiles para inhibir patógenos, producir exopolisacáridos y promover el crecimiento de las semillas de rábano. Los metabolitos bacterianos y la biodisponibilidad de nutrientes después de la fermentación pueden causar un efecto bioestimulante sobre las plantas, promoviendo su uso en la industria del biofertilizante. Finalmente, este estudio demostró que algunas de las bacterias lácticas presentes en la Antártida presentan alto potencial en la valorización de las aguas residuales agropecuarias. A partir de este estudio se podrían realizar más investigaciones que permitan optimizar la implementación de estas bacterias a nivel industrial para, de esta forma, poder hacer una economía circular más eficiente y sostenible.

## ABSTRACT

Water is a vital resource not only for life but also for sustainable development. On the other hand, water consumption in the livestock sector is high and also produces large amount of wastewater rich in nutrients. The reuse and valorization of livestock wastewater emerges as an alternative for environmental sustainability and the preservation of natural resources. In this thesis, research was carried out on tertiary treatment of wastewater from the livestock sector, the reuse of water and the valorization of the resulting nutrients for different applications. The concentrated residues from the final products of this treatment proved to be recoverable through additional treatments with microorganisms, among which it was possible to identify lactic bacteria that are not pathogenic for humans. These bacteria are highly promising for the production of bioproducts in the agroindustry and pharmaceutical industry, but still require much more research and technological development to be implemented at an industrial level. Antarctica is known on its own microorganisms adapted to extreme conditions; specially, the lactic acid bacteria present in the environment may have many potential applications and scopes that have not yet been explored. In this study, we proceeded to isolate and identify several strains of lactic acid bacteria from different Antarctic environmental matrices. Species such as *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella confusa*, *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecium* were identified. In particular, *Weissella confusa* showed a high level of environmental tolerance, growing optimally in 2-4% NaCl, 25-35°C and pH 6.0 to 7.0. A high hydrophobicity indicates its potential use in biological remediation of contaminated soil and water. On the other hand, the potential of different strains to be used in the bioconversion of pig slurry when mixed with cheese whey was evaluated, in addition to their potential use as a biofertilizer. The selection was based on their potential antimicrobial capacity, hydrophobicity, exopolysaccharide production and chemical oxygen demand. The fermentation product was assessed by physicochemical and microbiological analysis and a phytotoxicity test with radish (*Raphanus sativus*) seeds. As a result, *Pediococcus*

*pentosaceus* and *Enterococcus faecium* were able to inhibit pathogens, producing exopolysaccharides and promoting the growth of radish seeds. Bacterial metabolites and nutrient bioavailability after fermentation can cause a biostimulant effect on plants, promoting their use in the biofertilizer industry. Finally, this study demonstrated that some of the lactic acid bacteria present in Antarctica have a high potential for the valorization of agricultural wastewater. Based on this study, more research should be carried out to optimize the implementation of these bacteria at an industrial level in order to achieve a more efficient and sustainable circular economy.

## **CAPÍTULO I: Introducción**

### **1. Introducción**

La agroindustria en Chile es un pilar clave de la economía, representando el 11% del PIB y generando más de 800.000 empleos (Universidad Tecnológica Metropolitana, 2020). Gracias a su clima mediterráneo en la zona central, Chile posee una ventaja competitiva única, permitiendo una cosecha en contra estación que favorece la exportación. Esta condición no solo fortalece la producción interna, sino que también impulsa la diversificación de mercados y el abastecimiento constante de la industria agroalimentaria (Valenzuela, 2022).

El sector pecuario es una actividad agroindustrial relevante, ya que en los últimos treinta años se ha observado un notable crecimiento en la producción ganadera intensiva, es decir, de animales criados en confinamiento (ODEPA, 2019a). Dentro de la producción agropecuaria, uno de los sectores que más resalta es la industria porcina debido a la transformación que ha tenido. Esta producción se debe al modelo de integración vertical (Aguirre Brockway, 2021), proceso que se desarrolla en tres fases: reproducción, crianza y engorda, pudiendo realizarse en sitios separados o en un solo establecimiento. A los 130 kg, los cerdos son faenados, procesados y distribuidos según las exigencias del mercado, tanto nacional como internacional (Molinari Calle, 2021).

Al mismo tiempo, la población de animales por granja ha aumentado, dando lugar a una mayor concentración de residuos en pequeñas áreas. Esta concentración de animales produce un alto estrés ambiental debido a la generación de residuos, como lo son los purines, los cuales contienen restos alimenticios que no han sido digeridos, así como también microorganismos patógenos y residuos de drogas antimicrobianas que son administradas a los cerdos; por tanto, se componen de una fracción sólida y una líquida, la cual presenta variabilidad según la digestión, raciones, edad de los animales, cantidad de alimento perdido, volumen de agua desechada y agua usada para la limpieza del plantel (López-Pacheco *et al.*, 2021). La fracción líquida del purín contiene principalmente

nitrógeno en forma de diversos compuestos, tales como amonio, compuestos de amonio y nitratos, además de materia orgánica (He *et al.*, 2019).

Por otro lado, la fracción sólida se compone mayoritariamente por compuestos fosforados inorgánicos, además de compuestos orgánicos (Li *et al.*, 2020a). Además, se han encontrado elevados niveles de poblaciones microbianas en los purines de cerdo, incluyendo coliformes, *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. Dichos microorganismos tienen una gran importancia cuando se considera la bioseguridad humana y animal (López-Pacheco *et al.*, 2021).

A modo de ejemplo, si se tienen en consideración 5,4 millones de cabezas de cerdo en Chile, las cuales poseen una masa promedio de 101 kg (Aguirre Brockway, 2021), cada año se generarán aproximadamente 48 millones de m<sup>3</sup> de purines, los cuales contienen más del 90% de agua, lo que hace indispensable un manejo adecuado y su correcta disposición.

Al respecto, la expansión de la industria porcina en Chile ha generado serios conflictos ambientales, especialmente en la Región del Maule, debido a la contaminación del aire y el agua por desechos y emisiones de las granjas. Esto no solo deteriora el ecosistema, sino que también afecta la salud de las comunidades locales, causando enfermedades respiratorias y estrés psicológico (Muñoz-Quezada *et al.*, 2024). Según ChilePork (2022), el consumo total de agua de la industria porcina corresponde a 12,5 millones de m<sup>3</sup> al año, de los cuales 10,2 millones son utilizados en planteles de cerdo y 2,3 millones en faenadoras. Del agua extraída, el 67% se convierte en aguas residuales del proceso y solo un 33% corresponde a consumo. Además, el vertido de aguas residuales con nitrógeno y fósforo agrava la eutrofización, problema que podría mitigarse con fitorremediación, aunque su aplicación masiva aún es limitada (López-Pacheco *et al.*, 2021).

### **1.1. Escasez hídrica y pérdida de tierras agrícolas**

Desde la década de 1980, el consumo de agua ha aumentado constantemente a nivel global y se espera que continúe en ascenso hasta 2050, con una variación estimada de

entre un 20 y 30% por encima del nivel actual, impulsada principalmente por el aumento de la demanda industrial y doméstica (ONU, 2024). Actualmente, más de 2.000 millones de personas habitan en regiones con escasez severa de agua, mientras que alrededor de 4.000 millones enfrentan un déficit crítico al menos un mes al año, una problemática que podría agravarse debido al aumento en la demanda y los efectos del cambio climático (ONU, 2024). Además, se estima que 385 millones de personas dependen de sistemas hídricos sometidos a estrés (Lee y Jepson, 2020), y para 2050, más de 993 millones vivirán en ciudades con escasez permanente de agua, mientras que 3.100 millones podrían verse afectados por esta situación pese a los avances en infraestructura (Lee y Jepson, 2020; ONU, 2024).

Se prevé que la escasez mundial de agua implique riesgos grandes para la sociedad en términos económicos y sociales en los próximos años (Tong *et al.*, 2024, ONU, 2024). Lo anterior guarda relación con lo referente a desequilibrios hídricos que se producen a largo plazo, cuando el nivel de la demanda de agua se ve superado por la disponibilidad y el suministro natural de agua. Así, el incremento en el uso del recurso hídrico por causas demográficas y económicas es el principal impulsor de la escasez de esta en muchas partes del mundo (Tong *et al.*, 2024). Actualmente, factores como el crecimiento de la población, la rápida urbanización, una mayor contaminación del agua y el aumento de la demanda de esta debido al mayor crecimiento económico están ejerciendo una presión considerable sobre los recursos hídricos disponibles (Azadi *et al.*, 2025).

A nivel nacional, Chile no está exento de esta problemática global, ya que durante 12 años consecutivos las precipitaciones han estado bajo el promedio climatológico, provocando que dicho territorio se encuentre afectado por lo que se ha denominado "megasequía" (Centro de Ciencia del Clima y la Resiliencia, 2015). En 2019 se completó una década de este fenómeno, promediando un déficit de lluvias de entre el 25 y 30% en gran parte de Chile Central (Garreaud *et al.*, 2020).

Por otra parte, el inminente avance del fenómeno de sequía en Chile que se prevé para las próximas décadas, está generando un cambio en la conducta de todos los

consumidores de agua del país. Ya existe evidencia acerca de los conflictos económicos y sociales que se viven en el país en torno al tema hídrico (Urquiza y Billi, 2020).

La creciente escasez de agua en Chile, exacerbada por el cambio climático y el uso intensivo de recursos hídricos, no solo afecta la disponibilidad de agua potable, sino que también agrava los problemas de contaminación en los cuerpos de agua. Esta situación tiene consecuencias directas para la agricultura, especialmente en áreas de alta producción como la cuenca del río Aconcagua, allí la actividad agrícola ha deteriorado la calidad del agua, afectando ecosistemas acuáticos y elevando parámetros como la materia orgánica, el pH y la presencia de coliformes (Fierro *et al.*, 2021). Este deterioro impacta la fertilidad del suelo y la productividad agrícola, evidenciando cómo el uso intensivo de la tierra sin regulaciones adecuadas compromete su sostenibilidad a largo plazo.

Como ya se mencionaba anteriormente, la industria porcina en Chile, ha generado conflictos ambientales de gran magnitud debido a la contaminación del agua y el aire ocasionada por los desechos y emisiones de las granjas porcinas. No obstante, estos problemas no solo impactan negativamente la salud de las comunidades locales, sino que también afectan la sostenibilidad agrícola, ya que el uso insostenible del agua y la contaminación de los cuerpos acuáticos contribuyen a la pérdida de tierras agrícolas. La falta de prácticas sostenibles y la gestión inadecuada de los recursos naturales agravan la situación, deteriorando aún más los ecosistemas y comprometiendo la productividad agrícola de la zona (Muñoz-Quezada *et al.*, 2024). Además, en la cuenca del río Cachapoal, la presencia de pesticidas y sus productos de degradación en el agua superficial representa otro factor de riesgo para los recursos hídricos, afectando la calidad del agua utilizada en la agricultura y poniendo en peligro la disponibilidad de recursos esenciales para el riego y la producción agrícola (Climent, *et al.*, 2019).

En relación con lo anterior, el estudio del Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN, 2024) indica que más del 56% de los suelos entre las regiones de Coquimbo y Los Lagos están en estado de degradación, afectando la productividad agrícola y la seguridad alimentaria. Además, la pérdida económica asociada a la erosión de estos

suelos se estima en 42 mil millones de pesos (Fundación Terram, 2024). Estas cifras dan a entender que existe la necesidad urgente de implementar prácticas agrícolas sostenibles y políticas de conservación para proteger y restaurar los suelos en estas regiones.

## **1.2. Implicaciones de la escasez de fertilizantes**

Así como las megasequías han aumentado en severidad y duración, exacerbando la escasez de agua y acelerando la degradación del suelo (Cadena SER, 2025), la escasez de fertilizantes es otro factor que está acelerando la degradación del suelo y la pérdida de tierras agrícolas.

La escasez de fertilizantes y la pérdida de tierras agrícolas en Chile están estrechamente relacionadas a factores socioeconómicos y ambientales. Desde la Revolución Verde, la agricultura chilena ha dependido en gran medida de fertilizantes químicos, especialmente nitrógeno, lo que ha intensificado la producción, pero también ha ocasionado problemas significativos como la contaminación por nitrógeno y la degradación del suelo (San Martín, 2017). Además, la falta de fertilizantes orgánicos, como el estiércol animal, ha sido un obstáculo importante para las comunidades indígenas del sur de Chile que, al estar desplazadas en tierras de baja calidad, enfrentan dificultades para mantener prácticas agrícolas sostenibles, lo que contribuye a la pérdida de tierras agrícolas (Mariola, 2018; Muñoz-Quezada *et al.*, 2024).

También, la volatilización de amoníaco, un efecto secundario del uso de fertilizantes como la urea, representa un desafío considerable para la agricultura en Chile. Este proceso provoca una pérdida sustancial de nitrógeno, reduciendo la eficiencia de los fertilizantes y aumentando la contaminación ambiental. Como resultado, se deteriora la calidad del suelo, lo que limita su capacidad para sustentar una producción agrícola sostenible a largo plazo. La acumulación de estos problemas no solo afecta el rendimiento de los cultivos, sino que también intensifica los desafíos relacionados con la gestión de los recursos naturales en el país (Muñoz-Quezada *et al.*, 2024).

El conflicto entre Rusia y Ucrania ha afectado gravemente la disponibilidad de fertilizantes en Chile, dado que ambos países son grandes productores y exportadores de estos insumos. La interrupción de las cadenas de suministro globales ha generado un aumento significativo en los precios de los fertilizantes (Hassen y Bilali, 2022), lo que ha llevado a una reducción en su uso. Esta escasez impacta directamente en la producción agrícola, disminuyendo la eficiencia en el cultivo y reduciendo los rendimientos de los productos, lo que agrava los problemas de sostenibilidad agrícola en el país (Shahini *et al.*, 2022). Lo anterior ha traído consecuencias en los mercados de alimentos, que ya enfrentaban dificultades debido a la pandemia de COVID-19 y otros factores globales. La interrupción en la producción y suministro de fertilizantes ha generado un aumento en los precios de los alimentos, lo que pone en riesgo la seguridad alimentaria de varios países, incluido Chile (Jagtap *et al.*, 2022). Además, las restricciones a las exportaciones y la especulación en los mercados internacionales han agravado esta situación, elevando aún más los costos de los productos básicos y complicando la accesibilidad de alimentos esenciales para la población (Hassen y Bilali, 2022).

### **1.3. Reutilización del agua**

Aunque la industria ha avanzado en la implementación de plantas de tratamiento avanzadas que permiten la reutilización del agua en los procesos productivos, es fundamental continuar mejorando estas prácticas para minimizar el impacto ambiental y proteger los recursos hídricos del país. Por ejemplo, la adopción de economía circular y biodigestores permite reutilizar purines y generar energía renovable, reduciendo la huella de carbono del sector en un 32% en 20 años (ChileCarne, 2021).

Uno de los compromisos de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas es “No dejar a nadie atrás”, el cual busca que todas las personas tengan acceso al agua y al saneamiento (ONU, 2019). Debido a lo anteriormente expuesto es que la reutilización de agua se considera una alternativa asequible para muchas regiones donde esta es escasa. Existen estudios referentes al reúso de aguas residuales provenientes de distintos orígenes, pudiendo ser aguas domésticas e industriales,

además de los tratamientos posibles para lograrlo (Peña *et al.*, 2019; Tripathi *et al.*, 2019; Sarawaneeyaruk *et al.*, 2019; Marangon *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Manasfi *et al.*, 2020; Niquice-Janeiro *et al.*, 2020).

Dicha reutilización de agua, es un término común que hace referencia a la recuperación del recurso hídrico y se considera una adaptación clave para muchas ciudades que actualmente están enfrentando limitaciones climáticas en el suministro (Tortajada y Van Rensburg, 2020). El agua reutilizada es una fuente hidrológicamente independiente durante todo el año que puede amortiguar los impactos de la escasez de agua (Lee y Jepson, 2020).

Una de las ventajas de la reutilización de agua es la posibilidad de reducir la presión del consumo de esta y, por otro lado, permitir valorizar los residuos presentes en dichas aguas mediante diversas tecnologías, las cuales se están expandiendo rápidamente debido a la necesidad de reciclar adecuadamente los elementos clave de las aguas residuales para avanzar hacia una sociedad moderna verdaderamente sostenible (Robles *et al.*, 2020).

Estas aguas residuales contienen nutrientes en exceso, tales como nitrógeno y fósforo los cuales son principales causas de contaminación del agua y su remoción es una tarea desafiante (Hasan *et al.*, 2021). El poder recuperar y valorizar elementos nutritivos provenientes de las aguas residuales genera beneficios tales como cumplir con los niveles de nutrientes en los efluentes según la legislación, reducir los problemas de eutrofización y proporcionar subproductos con potencial económico de diversa índole (Melia *et al.*, 2017; Robles *et al.*, 2020), constituyéndose una estrategia prometedora para reducir el agotamiento de los recursos no renovables y el impacto ambiental vinculado a su extracción y fabricación, favoreciendo a la Economía Circular (EC).

El término EC se ha extendido rápidamente en el vocabulario de las políticas medioambientales actuales (Akerman *et al.*, 2020). La EC transforma los sistemas económicos lineales de recursos a bienes para tomar-usar-descartar, en un sistema que recicla, procesa y renueva materiales. Dicho de forma simple, la EC sienta sus bases en una economía que ejecuta ciclos de materiales de forma cerrada, para finalmente

desarticular la relación entre consumo de materiales y crecimiento económico (Akerman *et al.*, 2020). Su difusión se ha convertido en un objetivo para la Unión Europea, cuya implementación viene establecido a través del Plan de Acción de Economía Circular. La EC prevé la expectativa de un futuro más sostenible y el potencial para resolver problemas ambientales sin tener que renunciar a la prosperidad económica (Lazarevic y Valve, 2017).

Uno de los hechos que reafirma la relevancia de la EC, es que, en la actualidad, la tendencia no es precisamente solo el tratamiento de las aguas para poder reutilizarlas, sino que su valorización hacia nuevos productos, lo anterior debido al alto nivel de elementos químicos presentes que aún pueden ser aprovechados. Dentro de estos tratamientos se encuentra la digestión anaerobia para generar biogás, digestión para producción de biohidrógeno, compostaje de lodos y recuperación de nutrientes en general (Marangon *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Manasfi *et al.*, 2020; Niquice-Janeiro *et al.*, 2020).

#### **1.4. Bacterias como alternativa de tratamiento para valorizar residuos**

Una de las opciones de tratamiento para poder valorizar y aprovechar residuos es mediante bacterias, y en la actualidad son ampliamente utilizadas para la producción de energía (Diamantis *et al.*, 2021; Sganzerla *et al.*, 2021). De hecho, los procesos anaeróbicos han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de aguas residuales para estabilizar la materia orgánica y en algunos casos producir bioenergía en forma de metano (Li *et al.*, 2021). La ventaja de la utilización de bacterias para valorizar residuos radica en que estas son capaces de realizar esta transformación de manera amigable con el medioambiente (Fernández Sandoval *et al.*, 2019; Mona *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2020; Rasheed *et al.*, 2021).

Las comunidades de microorganismos involucradas en digestión anaerobia empleadas en la producción de energía (metano) se ven condicionadas por factores físicos y químicos tales como la carga de materia orgánica, ácidos grasos volátiles, temperatura, alcalinidad, nutrientes y presencia de nitrógeno y fósforo, entre otros (Bueno de Mesquita

*et al.*, 2023). Dentro de este proceso se encuentran microorganismos que depuran estas aguas residuales mediante degradación de materia orgánica e involucra cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

En la digestión anaerobia se ven involucrados una amplia diversidad de microorganismos como levaduras, bacterias y arqueas (productoras de metano). Para el caso de las bacterias, en la digestión anaerobia se pueden clasificar en varios grupos según sus funciones, tales como bacterias hidrolíticas que descomponen proteínas, celulosa, lignina y lípidos en monómeros como aminoácidos, glucosa, ácidos grasos y glicerol. Principalmente *Clostridium* y *Bacteroides* realizan esta función. Las acidogénicas transforman azúcares, aminoácidos y lípidos en ácidos orgánicos, alcoholes, cetonas, acetato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. *Clostridium* es el género dominante en este proceso, aunque *Lactobacillus* y *Bacillus* también están involucrados. Las bacterias acetogénicas generan H<sub>2</sub> y acetato a partir de propionato, ácido butírico y algunos alcoholes. *Syntrophobacter wolinii* y *Syntrophomonas wolfei* son ejemplos que participan en la producción de acetato y H<sub>2</sub>, esenciales para la metanogénesis y las arqueas metanogénicas que producen metano en la etapa final de la digestión anaerobia. Incluyen *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*, *Methanobrevibacter*, y *Methanomicrobium*, además de *Bacteroides*, *Clostridium*, y otros también involucrados en la metanogénesis (Akindolire *et al.*, 2022).

La energía libre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) es un parámetro termodinámico que permite evaluar la espontaneidad y el equilibrio de las reacciones bioquímicas, siendo particularmente relevante en el contexto del metabolismo de las arqueas productoras de metano (Yang *et al.*, 2023). Estos microorganismos, a través de procesos de metanogénesis, transforman compuestos orgánicos en metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), liberando energía en reacciones altamente exergónicas las cuales son esenciales para el crecimiento y producción de biomasa. En condiciones óptimas, se ha observado que estas arqueas pueden generar entre 0,1 y 0,5 gramos de biomasa por gramo de sustrato, dependiendo de la naturaleza del sustrato utilizado, ya sea ácidos grasos, alcoholes o

compuestos orgánicos volátiles. Este rendimiento es influenciado por diversos factores, dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura, pH y concentración de nutrientes) y de la composición de la comunidad microbiana en el medio, que pueden favorecer o limitar la actividad metabólica de las arqueas. Como el rendimiento energético de la metanogénesis suele ser bajo, con  $\Delta G^\circ$  de solo  $-33$  a  $-131$  kJ/mol  $\text{CH}_4$  dependiendo de la vía, los metanógenos pueden ser fácilmente superados por otros organismos, en la mayoría de las condiciones (Lyu *et al.*, 2018).

Así, diversos microorganismos interactúan en procesos complejos de generación de energía, adaptándose y logrando desarrollarse a diferentes temperaturas y pH (Tablas 1.1 y 1.2).

Tabla 1.1 Microorganismos participantes en procesos anaerobios que se adaptan a diferentes rangos de temperatura.

Rango de temperatura (°C)	Tipo de microorganismo	Microorganismos encontrados
10-15	Psicrófilos	<i>Bacillus</i> spp.
20-30	Psicrótrofos	<i>Clostridium</i> spp.
30-37	Mesófilos	<i>Clostridium</i> spp. <i>Methanococcus</i> spp. <i>Methanobacterium</i> spp.
42-46	Termótrofos	<i>Methanococcus</i> spp. <i>Methanobacterium</i> spp.
50-80	Termófilos	<i>Clostridium</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Thermus</i> spp. <i>Thermococcus</i> spp.

Fuente: Akindolire *et al.*, 2022

Tabla 1.2. Microorganismos participantes en procesos anaerobios que se adaptan a diferentes rangos de pH.

pH	Tipo de microorganismo	Microorganismos encontrados
1,1-5,5	Acidófilos	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Bifidobacterium bifidum</i>
5,5-8,0	Neutrófilos	<i>Clostridium perfringes</i> <i>Methanococcus</i> spp. <i>Methanobacterium</i> spp. <i>Propionibacterium acidipropionici</i>
8,5-11,5	Alcalófilos	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp.

Fuente: Akindolire *et al.*, 2022

Existen microorganismos presentes en el tratamiento de aguas residuales, cada uno con funciones específicas en el proceso de depuración. Entre ellos, se encuentran las bacterias del género *Burkholderiaceae* (Betaproteobacteria), que son desnitrificantes importantes, así como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, que oxidan el amoníaco a nitrito (Luo *et al.*, 2020). Además, las bacterias Anammox (del orden Planctomycetes) como *Candidatus brocadia* muestran gran potencial para el tratamiento de aguas residuales debido a su capacidad para eliminar nitrógeno y su presencia natural en estos sistemas (Pan *et al.*, 2020). A pesar de estos avances, la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento y valorización de residuos continúa, para lograr una economía circular más eficiente.

### 1.5. Arqueas como facilitadoras de la digestión microbiana

Las arqueas metanogénicas son microorganismos clave en la digestión anaerobia, un proceso biológico que convierte la materia orgánica en metano ( $\text{CH}_4$ ). Este proceso es fundamental para la producción de biogás, una fuente de energía renovable. Las arqueas metanogénicas pertenecen principalmente al dominio Euryarchaeota y son responsables de la última etapa de la metanogénesis, donde el metano es producido a partir de precursores como el acetato, el dióxido de carbono y el hidrógeno (Kurade *et al.*, 2019; Amin *et al.*, 2021).

Existen dos rutas principales que las arqueas metanogénicas emplean para producir metano: la acetoclástica y la hidrogenotrófica. En la metanogénesis acetoclástica, géneros como *Methanosarcina* y *Methanosaeta* juegan un papel crucial al transformar el acetato en metano y dióxido de carbono, siendo un proceso clave para la producción de biogás. Esta vía se destaca por su eficiencia en la conversión de compuestos orgánicos en energía renovable (Nakasaki *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2021). Por otra parte, en la metanogénesis hidrogenotrófica, el dióxido de carbono y el hidrógeno son utilizados para generar metano. Este proceso es llevado a cabo por géneros como *Methanobacterium* y *Methanobrevibacter*, los cuales desempeñan un papel fundamental en la conversión de estos compuestos en metano, contribuyendo significativamente a la producción de biogás en ambientes anaeróbicos (Zeb *et al.*, 2019).

Las arqueas metanogénicas son fundamentales no solo para la generación de biogás, sino también para el ciclo global del carbono, ya que participan activamente en las emisiones de metano (Mand y Metcalf, 2019). Entender sus procesos metabólicos y cómo se adaptan a diversas condiciones es clave para mejorar la eficiencia en la producción de metano y promover la sostenibilidad de los sistemas de digestión anaerobia (Guerrero-Cruz *et al.*, 2021).

Cabe mencionar que la eficiencia de la digestión anaerobia está estrechamente ligada a la composición y el estado de la comunidad que participa. Las arqueas metanogénicas deben ser capaces de adaptarse a factores ambientales como la concentración de amoníaco y salinidad, que pueden afectar negativamente su actividad (Zeb *et al.*, 2019).

Además, la transferencia directa de electrones entre bacterias y arqueas, un proceso denominado DIET, ha mostrado potenciar la eficiencia del proceso al facilitar el intercambio de equivalentes reductores (Wang *et al.*, 2021).

Cabe mencionar que, de acuerdo con Eusébio *et al.* (2021), la combinación de efluentes porcinos con otros tipos de residuos, como el agua residual de molinos de aceite de oliva, puede aumentar la eficiencia del proceso de digestión anaerobia. En particular, se observó una reducción notable en la materia orgánica y una producción elevada de metano al mezclar los efluentes porcinos con un 30% de agua residual de molino de aceite de oliva. Esto sugiere que las arqueas metanogénicas no solo son eficientes en la generación de metano, sino que también desempeñan un papel clave en la remoción de contaminantes de las aguas residuales.

#### **1.6. Bacterias extremófilas como alternativa para uso en valorización**

Existe interés científico provocado por las condiciones que se encuentran bacterias presentes en zonas extremas, debido a que estas bacterias pertenecen a un ecosistema diferente, tal como lo es Antártica, con carencia de vegetación y fauna terrestre, contando con condiciones climáticas extremas y geográficas únicas, lo cual hace que estos microorganismos estén obligados a desarrollar mecanismos adaptativos, desde la manera en la que se comportan hasta adaptaciones fisiológicas (Krishnan *et al.*, 2016).

Este continente ha sido y sigue siendo un ambiente hostil, que no posee grandes intervenciones del ser humano. En los últimos años se han asentado estaciones de investigación asociadas a la Antártica, aunque la población solo alcanza un promedio de 4.400 personas en verano y 1.100 en invierno, las cuales pasan todo o parte del año trabajando allí, dentro de este laboratorio natural (CIA,2024). La adaptación que generan los organismos que habitan la Antártica para poder sobrellevar este ambiente causa nuevas formas de vida con características únicas.

Además, las bacterias que se encuentran en la Antártica poseen un amplio potencial biotecnológico, lo que hace referencia a la utilización de organismos para la obtención de bienes y servicios (Zucconi *et al.*, 2025).

## 1.7. Fundamento del tratamiento residual porcino

La búsqueda de alternativas sostenibles para el tratamiento de los residuos procedentes de la crianza animal intensiva constituye una tarea priorizada a escala mundial (Yang *et al.*, 2020). En vista de esto, por la alta carga contaminante y nutricional que poseen los residuos porcinos, es que se resalta la importancia de prevenir impactos negativos sobre el medio ambiente y considerar el residuo como una oportunidad, brindando manejo y tratamiento adecuado.

Actualmente, estos residuos han sido valorizados y utilizados como fertilizante orgánico, mejorador de suelos, alimento para rumiantes, materia prima para generar energía mediante producción de biogás, insumo en la elaboración de compost y sustrato en lombricultura (Shen *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020).

Existen diversos estudios realizados acerca de la caracterización y tratamiento de los residuos de la industria porcina, con el propósito de disminuir sus efectos negativos para el ambiente, sobre todo a través de los patógenos. Ha sido posible concluir que los purines constituyen un buen sustrato para procesos biológicos como la fermentación, por el hecho de presentar aproximadamente un 60% de su materia orgánica total en estado biodegradable, contando con una amplia variedad de nutrientes, dentro de los cuales se tienen macronutrientes y micronutrientes tales como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, sodio, cobre, cobalto, boro, flúor y molibdeno (Pérez-Pérez *et al.*, 2016). Así mismo, diversos métodos de tratamiento ya sean físicos, químicos o biológicos, se utilizan para los residuos orgánicos con el fin de estabilizarlos, reducir la carga de patógenos y facilitar su manejo adecuado (Wang *et al.*, 2019; Varma *et al.*, 2021).

Es debido a lo anterior que los purines, además de su gran composición de agua, constituyen una oportunidad para ser valorizados, por su amplio contenido nutricional, mediante algún tipo de proceso que no solo involucre el tratamiento del agua para su posterior descarga y/o reutilización, cumpliendo así con la legislación vigente.

Existen antecedentes que indican que las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen el potencial de mejorar la productividad agrícola en cultivos, siendo utilizadas como agente de biocontrol y estimulador del crecimiento vegetal (Abdul *et al.*, 2022). Pueden

emplearse además en reemplazo de fertilizantes inorgánicos y pesticidas gracias a su capacidad para inhibir el crecimiento de otras especies bacterianas y promover el crecimiento de plantas. Las cepas de BAL suprimen los microorganismos patógenos y mejoran la salud animal a través de la nutrición, lo que las hace ventajosas (Akpogheli *et al.*, 2025). Estas nuevas tecnologías pueden impulsar la productividad y promover la sostenibilidad en la agricultura y la ganadería en el futuro.

Sin embargo, para garantizar un crecimiento y una actividad metabólica adecuados, estos microorganismos requieren medios nutricionales complejos para satisfacer sus necesidades nutricionales. La creación de medios de cultivo, la maximización y regulación de los procesos metabólicos, la investigación de las necesidades nutricionales y la disminución de la viabilidad durante el almacenamiento son solo algunas de las posibles limitaciones y dificultades del uso y aplicaciones de las BAL. Es aquí donde el purín de cerdo cobra relevancia, ya que, debido a su estructura nutricional, se posiciona como potencial sustrato en la fermentación láctica.

Estos microorganismos basan esta capacidad en sus mecanismos de acción para metabolizar diversos sustratos y generar metabolitos para el control de patógenos, donde se pueden mencionar los siguientes:

a) Metabolismo de los carbohidratos

Las células bacterianas obtienen su energía mediante la descomposición de carbohidratos por procesos catabólicos, lo que resulta en la producción de compuestos reductores y adenosín trifosfato (ATP). Entre las rutas más estudiadas para el catabolismo de azúcares en bacterias se encuentran las vías de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), Entner-Doudoroff (ED) y pentosa fosfato (PP) (Sánchez-Pascuala *et al.*, 2017). En la industria alimentaria, el metabolismo de transformación de carbohidratos por bacterias del ácido láctico juega un papel fundamental. Estas bacterias son comúnmente empleadas como cultivos iniciadores para transformar azúcares en ácido láctico, lo que no solo mejora el sabor y la textura de productos como el queso, el yogur y algunos vinos, sino que también prolonga su vida útil al establecer un entorno ácido favorable y aumentar

el valor nutricional mediante la descomposición de carbohidratos complejos (Anumudu *et al.*, 2024).

#### a.1) Microorganismos homofermentativos

El ácido láctico es el principal subproducto generado por la ruta EMP, también conocida como glucólisis, durante la fermentación de carbohidratos. Este proceso inicia con la producción de fructosa 1,6-bisfosfato, que se transforma en dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. Antes de ingresar a la glucólisis, los azúcares de seis o cinco carbonos suelen ser fosforilados y transportados a la célula mediante el sistema de fosfotransferasa de carbohidratos (PTS), que depende del fosfoenol piruvato (PEP). En los organismos homolácticos, un mol de glucosa se fermenta para producir dos moles de piruvato. Posteriormente, la oxidación de NADH convierte estos dos moles de piruvato en dos moles de ácido láctico, resultando en una ganancia neta de dos moles de ATP por cada mol de glucosa consumida (Koendjiharie *et al.*, 2021). Aunque la ruta ED se pensaba que era exclusiva de las bacterias Gram-negativas, investigaciones recientes han demostrado su presencia también en *Enterococcus faecalis* y en un amplio rango de arqueas y eucariotas (Hourigan *et al.*, 2024).

Las estructuras de las vías ED y EMP son bastante similares: la fosforilación prepara azúcares de seis carbonos, que son separados en dos intermediarios de tres carbonos por la enzima aldolasa. Dos enzimas clave en la ruta ED son la 6-fosfogluconato deshidratasa, que cataliza la formación de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPG) mediante la deshidratación del 6-fosfogluconato, y la KDPG aldolasa, que descompone el KDPG en piruvato y gliceraldehído-3-fosfato. Posteriormente, el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) y la ruta EMP se utilizan para el catabolismo adicional de estos productos (Lucius y Hageman, 2024). La fructosa 6-fosfato se emplea como sustrato por las BAL homofermentativas para la producción de manitol. En condiciones de limitación nutricional, como las que se observan en *Enterococcus faecalis*, la fermentación de manitol o glucosa puede llevar a una fermentación ácida combinada que genera etanol,

acetato, 2,3-butanodiol, diacetilo, acetoína y, ocasionalmente, manitol (Wang *et al.*, 2021b).

#### a.2) Microorganismos heterofermentativos

Las BAL heterofermentativas utilizan la ruta de las pentosas fosfato (6-fosfogluconato/fosfocetolasa) para llevar a cabo la fermentación de carbohidratos. Debido a la ausencia de la enzima fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa, el 6-fosfogluconato se produce a partir de la oxidación de glucosa 6-fosfato. En condiciones anaeróbicas, un mol de glucosa genera un mol de ácido láctico, un mol de etanol y un mol de CO<sub>2</sub>, produciendo además un mol de ATP. Adicionalmente, se puede generar ATP extra cuando el acetilfosfato se convierte en acetato en lugar de etanol (Gao *et al.*, 2019). A diferencia de las BAL homofermentativas, las heterofermentativas utilizan fructosa en lugar de fructosa 6-fosfato para la producción de manitol. A través de un proceso metabólico conocido como "derivación bífida", la fructosa 6-fosfato fosfocetolasa se encarga de la degradación de hexosas en las bifidobacterias. Este método permite a las bifidobacterias generar más energía en forma de ATP por cada molécula de glucosa, dándole un carácter distintivo frente a otras vías glucolíticas (Kelly *et al.*, 2021). Por cada mol de glucosa, se generan 2,5 moléculas de ATP, 1,5 moléculas de acetato y 1 molécula de lactato. Gracias a su contenido de  $\alpha$ -amilasa, las BAL amilolíticas pueden descomponer las moléculas de almidón en hexosas (Ng *et al.*, 2019).

#### a.3) Metabolismo de los polisacáridos (almidón)

Los polisacáridos son polímeros formados por más de diez unidades de monosacáridos, que pueden ser iguales o diferentes, y están conectados por enlaces  $\alpha$  o  $\beta$ -glicosídicos. Entre los polisacáridos presentes en las plantas se encuentran el fructano, la celulosa, el almidón y la hemicelulosa (Popoola-Akinola *et al.*, 2022). Para descomponer estos polisacáridos, las BAL requieren hidrolasas específicas. Cuando los polisacáridos en alimentos fermentados se descomponen, estas bacterias pueden generar energía y compuestos beneficiosos para los seres humanos. La capacidad de diferentes BAL para

metabolizar una variedad de polisacáridos define sus múltiples aplicaciones en la industria alimentaria (Zhao *et al.*, 2023). Durante la fermentación, las BAL descomponen los polisacáridos para producir ácido láctico, monosacáridos y otros compuestos que pueden mejorar la calidad de los alimentos. Por ejemplo, en la industria de procesamiento de bebidas, el uso de enzimas degradantes de polisacáridos derivadas de mohos ha sido reemplazado por la aplicación de BAL, gracias a su habilidad para degradar polisacáridos (Wang *et al.*, 2021). La función de estas en la descomposición de polisacáridos ha generado un interés creciente en los sectores de alimentos, fermentación y salud, investigaciones recientes han demostrado que las enzimas extracelulares de las BAL son capaces de hidrolizar el almidón. Entre las especies bacterianas más comunes utilizadas para la hidrólisis del almidón se encuentran *Levilactobacillus brevis* y *Lactiplantibacillus plantarum*. La amilasa, producida por *Lactiplantibacillus plantarum*, es capaz de hidrolizar el almidón en dextrina y, posteriormente, en glucosa. El genoma de *Weissella* contiene un gen que codifica la amilasa maltogénica (Wang *et al.*, 2021b).

#### b) Metabolismo proteolítico

La degradación de proteínas macromoleculares durante el procesamiento de alimentos es un paso crucial que afecta la seguridad alimentaria, la nutrición y la calidad (Yousefi y Abassi, 2022). Las proteasas de otras fuentes vivas o del sustrato son mucho más esenciales en las fermentaciones de alimentos que en las fermentaciones lácteas, que solo son relevantes en los casos en que se produce la descomposición de proteínas por BAL. Las bacterias del ácido láctico pueden reducir los alérgenos proteicos en los alimentos de las empresas alimentarias al descomponer las proteínas. En particular, durante el proceso de fermentación de los productos lácteos, las bacterias del ácido láctico pueden descomponer la caseína, lo que reduce la alergenicidad de los productos lácteos (Wang *et al.*, 2021b). Hay varias etapas involucradas en la proteólisis por BAL, como el catabolismo de aminoácidos, el transporte de péptidos, la descomposición de proteínas y la degradación de péptidos (Harper *et al.*, 2022). La proteinasa de la envoltura celular (CEP) en BAL inicia la proteólisis al descomponer las proteínas en oligopéptidos.

La entrada de dipéptidos, tripéptidos y oligopéptidos en las células es la segunda etapa de la descomposición de proteínas. Las BAL emplean tres tipos diferentes de sistemas de transporte: oligopéptido, dipéptido y tripéptido (Kieliszek *et al.*, 2021). Numerosas peptidasas, como aminopeptidasas, endopeptidasas, tripeptidasas, dipeptidasas y peptidasas específicas de prolina, facilitan la conversión de aminoácidos a partir de la desintegración de péptidos en las células (Nandan y Nampoothiri, 2022). Las alergias a las proteínas en los alimentos se pueden eliminar en la industria alimentaria mediante su descomposición. Las BAL pueden descomponer la caseína, particularmente durante el proceso de fermentación de productos relacionados con la leche, lo que disminuye la alergenicidad de los productos lácteos (Xu *et al.*, 2023). Por ejemplo, algunas cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del queso y la leche fermentada pueden expresar proteinasa de la envoltura celular (CEP) o metaloproteasas, que son capaces de hidrolizar eficazmente la caseína en la leche. Las BAL no solo desempeñan una función importante en el desarrollo de productos lácteos, sino que también contribuyen significativamente a otros alimentos fermentados, como productos a base de cereales y productos de frutas y verduras fermentadas. Por ejemplo, muchas cepas de BAL aisladas de la masa madre tienen la capacidad de hidrolizar albúminas, globulinas y gliadinas, entre otras proteínas del trigo (Terzić-Vidojević *et al.*, 2021). La cepa de masa madre *Lactobacillus casei* es capaz de metabolizar la totalidad del péptido inmunotóxico de 97,5 ppm que se produce a partir de la  $\alpha$ 2-gliadina. Un estudio similar descubrió que ciertas bacterias lácticas tenían la capacidad de hidrolizar los alérgenos proteicos del trigo (Zhou *et al.*, 2023).

Cuando las BAL hidrolizan proteínas en su entorno para sus propios requisitos de crecimiento, pueden crear una gama de compuestos que son ventajosos para los humanos. El valor nutricional de las proteínas de los alimentos y la capacidad de ser digeridas pueden ser facilitados por las BAL. Además, pueden acelerar la absorción de aminoácidos de los productos lácteos por el intestino humano durante el proceso de fermentación (Wang *et al.*, 2021b). Las proteínas de los alimentos pueden ser descompuestas por las BAL para crear una serie de péptidos moleculares diminutos,

también conocidos como aminoácidos libres. Por ejemplo, los lactobacilos predominantes en el cultivo de kéfir tienen un potente impacto de descomposición en la proteína de la leche. Los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) son producidos por las BAL, incluyendo *Streptococcus thermophiles*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lentilactobacillus kefiri*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lacticaseibacillus casei*.

#### c) Metabolismo lipolítico

Los lípidos se descomponen en ácidos grasos y glicerol por las lipasas extracelulares e intracelulares de las BAL. La saturación, la hidratación, la deshidratación y la isomerización se encuentran entre las reacciones especiales de transformación de ácidos grasos que las BAL pueden llevar a cabo. La industria alimentaria es donde el metabolismo lipídico de las bacterias del ácido láctico es más relevante. Estas bacterias se utilizan como cultivos iniciadores para mejorar el valor nutricional, el sabor y la textura de los alimentos fermentados alterando el perfil de ácidos grasos del alimento a través de su capacidad para descomponer y transformar lípidos, lo que afecta el sabor y prolonga la vida útil (Raman *et al.*, 2022).

#### d) Metabolismo del citrato

Un ácido orgánico prevalente en alimentos como frutas, verduras y leche es el citrato. Las BAL pueden convertir este ácido orgánico en moléculas aromáticas, como el diacetilo, que confiere a productos lácteos su aroma característico (Eicher *et al.*, 2024). Esta característica metabólica en las BAL puede explicarse por el hecho de que sus genes están codificados por plásmidos en ciertas especies (Davray *et al.*, 2021). Se ha demostrado que el citrato tiene un impacto positivo en el crecimiento de las BAL en varias investigaciones anteriores (Williams y O'Neill, 2018; Eicher *et al.*, 2024). El citrato y los azúcares pueden co-metabolizarse en bacterias heterofermentativas para ayudar en la oxidación de factores producidos por la fermentación de hexosas. Una mayor tasa de crecimiento y una biomasa final más alta son los resultados de este metabolismo. El

primero de los tres procesos principales en el metabolismo del citrato en BAL es la captación de citrato en su estado dianiónico o aniónico por una permeasa particular conocida como citrato permeasa. Citrato liasa luego descompone el citrato en acetato y oxaloacetato, mientras que oxaloacetato descarboxilasa finalmente descompone el oxaloacetato en piruvato. El citrato no puede ser metabolizado por todos los BAL (Blount *et al.*, 2020). Tal metabolismo necesita que estén presentes los genes para citrato liasa y citrato permeasa. Dependiendo de las BAL, estos genes pueden estar incorporados en el cromosoma o localizados en un plásmido (Raman *et al.*, 2022).

#### Estudios previos sobre aplicaciones agrícolas con bacterias ácido lácticas

La bioacidificación de residuos agrícolas presenta un gran potencial para reducir las emisiones de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y metano ( $\text{CH}_4$ ), al mismo tiempo que permite la recuperación de nutrientes a través de productos bioacidificados, los cuales pueden ser utilizados como fertilizantes o para la producción de energía verde mediante digestión anaeróbica en la generación de biogás (Prado *et al.*, 2020). Sin embargo, hasta la fecha, son pocos los estudios que han evaluado las reducciones de emisiones de  $\text{NH}_3$  y gases de efecto invernadero (GEI) mediante la adición de desechos agrícolas. Por ejemplo, Bastami *et al.* (2016) demostraron que la inclusión de un 7% de grano residual de cervecería y un 7,7% de leche resultó en reducciones del 70% y 31% en las emisiones de  $\text{CH}_4$ , respectivamente. Asimismo, la adición de entre el 3% y el 33% de residuos de remolacha azucarera condujo a una disminución de la volatilización de  $\text{NH}_3$  de entre el 5% y el 26%. En otro estudio, se observó que la inclusión del 50% de suero de queso redujo la volatilización de  $\text{NH}_3$  en un 68%, aunque las emisiones de GEI fueron similares a las del control (Prado *et al.*, 2020). Un estudio más reciente reportó una reducción del 67% en las emisiones de  $\text{NH}_3$  de purín de ganado modificado con un 5% de melaza de remolacha azucarera, así como reducciones de  $\text{CH}_4$  que variaron entre el 15% y el 70% con mayores inclusiones del sustrato (Kavanagh *et al.*, 2021). Es crucial establecer la dosis adecuada del sustrato para inducir el proceso de fermentación, ya que esto no solo

puede reducir las emisiones de  $\text{NH}_3$ , sino también las de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ , que podrían incrementarse si se añaden fuentes lábiles de carbono (C) en exceso. Un sustrato ideal para combinar con el purín sería una biomasa de desecho o residuo de bajo valor económico, que contenga una cantidad suficiente de carbohidratos fácilmente degradables para estimular la fermentación. Un ejemplo de este tipo de residuo es el jugo marrón, el líquido residual obtenido durante la extracción de proteínas de hierba y otra biomasa vegetal fresca (Santamaría-Fernández y Lübeck, 2020). Este jugo marrón tiene un contenido de azúcar relativamente alto y un pH bajo, lo que lo convierte en un cosustrato adecuado para plantas de digestión anaeróbica en la producción de biogás. Por lo tanto, fomentar un mejor uso de los recursos, como la valorización de residuos agrícolas para reducir las emisiones gaseosas, al mismo tiempo que se reutilizan los purines, podría disminuir la dependencia de recursos finitos, como los fertilizantes minerales, contribuyendo así a una agricultura más sostenible y a una economía circular basada en fundamentos biológicos.

## Bioensilaje

Los microorganismos desempeñan un papel vital en el proceso de bioensilaje. Numerosos estudios han indicado que varias bacterias, incluidas Proteobacteria, Actinobacteriota y Firmicutes, participan en la degradación de materia orgánica recalcitrante y la conversión de nutrientes (Wang *et al.*, 2021, Liu *et al.*, 2022). Específicamente, *Lactobacillus* puede aumentar la conversión de sustratos en ácidos grasos volátiles (Xiang *et al.*, 2022). *Clostridium spp.* y *Bacillus* participan en la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfato, respectivamente (Yang *et al.*, 2024). Para aprovechar las ventajas de cepas específicas, se suelen emplear inóculos microbianos para aumentar la eficiencia. Zhang *et al.* (2023) introdujeron *Lactobacillus lactis* y *Bacillus velezensis* en residuos de cocina para aumentar la capacidad lignocelulolítica, facilitando así la hidrólisis de macromoléculas orgánicas. Bi *et al.* (2016) informaron que un aumento en la abundancia de bacterias metanogénicas en residuos alimentarios mediante

inoculación provocó un aumento en la eficiencia y la estabilidad. Por lo tanto, los microorganismos presentan un gran potencial para facilitar el bioensilaje en la agricultura mediante el tratamiento de residuos.

### Bacterias ácido lácticas en la agricultura

La agricultura orgánica es crucial para el bienestar del planeta y la adopción de métodos agrícolas que utilizan microorganismos puede ser una solución efectiva para enfrentar los desafíos relacionados con la seguridad alimentaria, asegurando que haya suficientes recursos alimentarios para la población mundial. En este sentido, las innovadoras enmiendas al suelo y el uso de microorganismos que favorecen el crecimiento vegetal se perfilan como estrategias prometedoras para una agricultura sostenible (Wei *et al.*, 2024). Las cepas de bacterias del ácido láctico (BAL) son particularmente beneficiosas, ya que contribuyen a mejorar la fertilidad y la salud del suelo, lo que las convierte en opciones atractivas dentro de las prácticas agrícolas sostenibles. Estas bacterias tienen la capacidad de neutralizar gases perjudiciales y optimizar la fertilidad del suelo, aumentando su aireación y solubilidad, promoviendo además la germinación de semillas y ayudando a reducir diversos estresores abióticos (Yaghoubi *et al.*, 2024).

Los metabolitos generados por las BAL también juegan un papel importante en la estimulación del crecimiento de las plantas, favoreciendo el desarrollo de brotes y raíces (Raman *et al.*, 2022). Estos pueden ser utilizados como biofertilizantes, lo que incrementa la cantidad de materia orgánica en el suelo, acelera el proceso de biodegradación y produce ácidos orgánicos y bacteriocinas (Wa *et al.*, 2022). A diferencia de los fitopatógenos, las BAL ayudan a controlar las poblaciones de microorganismos bacterianos y fúngicos en la rizosfera. Se ha confirmado la efectividad de las BAL en procesos de biorremediación, así como en la desintoxicación de micotoxinas y metales pesados. Además, la manipulación genética y el uso de herramientas metabólicamente adaptadas en estos microorganismos permiten la creación de cepas eficientes, diseñadas específicamente para la generación de productos industriales y agrícolas que sean

beneficiosos (Lahlali *et al.*, 2022). En este contexto, estas cepas se posicionan como agentes de biocontrol eficaces, capaces de no solo suprimir microorganismos fitopatógenos, sino también de fomentar el crecimiento de las plantas y controlar insectos y otras plagas (Thai *et al.*, 2023).

### Bacterias del ácido láctico como biofertilizantes

Uno de los principales desafíos de la agricultura moderna es la contaminación secundaria y la disminución de la disponibilidad de nitrógeno, exacerbados por las emisiones antropogénicas de amoníaco. Los biofertilizantes, que contienen una diversidad de bacterias que promueven la biodisponibilidad de los nutrientes en las plantas, son una solución prometedora. En particular, las bacterias de nitrificación y las BAL no solo aumentan la nitrificación, sino que también ayudan a reducir las emisiones de amoníaco, mitigando así los efectos del cambio climático (Zayed *et al.*, 2023). Recientemente, se ha validado el uso de BAL y otros biofertilizantes basados en *Bacillus* en la agricultura y el medio ambiente (Raman *et al.*, 2022). Estos biofertilizantes microbianos no solo aumentan la producción de cultivos, sino que también aceleran la absorción de minerales por las raíces de las plantas y mejoran el catabolismo de sustancias orgánicas (Samantaray *et al.*, 2024).

En este contexto, el compost elaborado a partir de restos vegetales y estiércol es esencial para la agricultura orgánica y sostenible (Pajura, 2024). Las BAL contribuyen a aumentar el valor agronómico al descomponer y bioestabilizar los desechos vegetales y animales, lo que permite una mejor absorción de materia orgánica como la lignina y los componentes de celulosa. Además, estas cepas bacterianas ejercen un efecto antagónico sobre los fitopatógenos del suelo (Raman *et al.*, 2022). Por ejemplo, *Lactococcus lactis* puede solubilizar diversas fuentes de compuestos de fósforo gracias a la presencia de secuencias genéticas que codifican diferentes tipos de fosfatasa alcalina, enzimas que facilitan la mineralización del fosfato (Timofeeva *et al.*, 2022). La acidez generada por las BAL, producto de la síntesis de ácidos orgánicos, también juega

un papel crucial en la solubilización de nutrientes como el fósforo y el potasio, haciéndolos más accesibles para las plantas. Además, investigaciones recientes han identificado compuestos producidos por *L. plantarum*, que promueven el crecimiento y desarrollo del germen de trigo (Turaeva *et al.*, 2022).

### **1.8. Relevancia de las bacterias ácido lácticas**

La producción lechera es una de las actividades agropecuarias más relevantes en el sur de Chile, especialmente en las regiones de Biobío, Los Ríos y Los Lagos, que representan el 89% de las vacas lecheras y el 81% de los predios lecheros del país (ODEPA, 2019b). Sin embargo, este sector también genera grandes cantidades de residuos líquidos industriales, los cuales requieren un tratamiento específico para reducir la presencia de contaminantes, en particular aquellos que tienen una alta Demanda Biológica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) o Demanda Química de Oxígeno (DQO), como la materia grasa no emulsificable, proteínas solubles y lactosa (Li *et al.*, 2020b). En este contexto, uno de los subproductos más relevantes generados en la producción de queso es el suero de leche, o lactosuero, el cual posee una carga orgánica considerable y ha sido históricamente visto como un potencial contaminante (Li *et al.*, 2020b).

De acuerdo con datos del VI y VII Censo Agropecuario Forestal, en el primer trimestre de 2021, se produjeron en Chile más de 5 millones de kg de quesillo y casi 29 millones de kg de queso (ODEPA, 2021). A partir de las estimaciones de producción, se puede calcular que se utilizaron alrededor de 310 millones de litros de leche para la fabricación de estos productos, y que aproximadamente 265 millones de litros de suero fueron generados en el proceso. Tradicionalmente, el suero era considerado un subproducto no deseado debido a su difícil aceptación en el mercado, ya que sus características no permitían su comercialización como suero líquido. Además, su eliminación generaba riesgos ambientales, ya que un litro de lactosuero puede equivaler a la demanda biológica de oxígeno producida por las aguas negras de 450 personas (Rojas *et al.*, 2015).

Sin embargo, en la actualidad el suero de leche ha pasado a ser considerado un recurso valioso en la industria alimentaria y biotecnológica, debido a su alto contenido de lactosa.

Esta sustancia ha generado un gran interés en los procesos fermentativos, especialmente en la producción de ácido láctico, un compuesto biológico con diversas aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica (Patel *et al.*, 2021). La fermentación de lactosa por bacterias ácido lácticas, como *Lactobacillus* y *Streptococcus*, ha sido ampliamente estudiada para mejorar la productividad y eficiencia en la obtención de ácido láctico, utilizando residuos agroindustriales como el suero de leche (Rama *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2021). Estas bacterias poseen una gran capacidad metabólica para transformar la lactosa, un azúcar presente en el suero, en ácido láctico mediante un proceso conocido como fermentación láctica.

Las bacterias ácido lácticas desempeñan un papel fundamental en la conversión de la lactosa en ácido láctico, aprovechando su capacidad para realizar una fermentación anaerobia, un proceso en el que se produce ácido láctico como principal metabolito. Este proceso es fundamental no solo para la producción de ácido láctico, sino también para la valorización del suero, ya que las bacterias lácticas son capaces de tolerar y adaptarse a las condiciones del medio, como las altas concentraciones de lactosa y otros compuestos presentes en el suero (Patel *et al.*, 2021). Además, la fermentación de lactosa por estas bacterias también ayuda a reducir la carga orgánica del suero, de esta manera, se reduce su impacto ambiental al convertir un residuo potencialmente contaminante en un recurso valioso.

A nivel global, la búsqueda de formas más eficientes y económicas para obtener ácido láctico a través de medios fermentativos ha impulsado el interés en el uso de residuos agroindustriales como el lactosuero. Esto ha llevado a la investigación de diferentes condiciones de cultivo para optimizar el proceso y aumentar el rendimiento del ácido láctico, utilizando sustratos alternativos y modificando las condiciones de fermentación para maximizar la actividad de las bacterias ácido lácticas (Rama *et al.*, 2019). A través de estos avances, se han logrado mejorar tanto los costos como la eficiencia de la producción de ácido láctico, lo que favorece su utilización en diversas industrias.

La implementación de tecnologías que permitan el reúso del agua proveniente de la industria porcina y la valorización de residuos agroindustriales, como el suero, es fundamental para fomentar la sostenibilidad en el sector agropecuario de Chile. El aprovechamiento de estos subproductos no solo ayuda a reducir la carga contaminante en el medio ambiente, sino que también permite la recuperación de la carga nutricional presente en las aguas residuales. La valorización de estos residuos es una estrategia clave en el desarrollo de una economía circular, donde los residuos se transforman en recursos útiles, contribuyendo a la sostenibilidad y a la creación de nuevos productos.

A partir de lo hasta aquí mencionado, la presente tesis doctoral se centra en el tratamiento de aguas residuales del sector pecuario, específicamente a través del tratamiento biológico de purines de cerdo, los cuales serán fermentados con bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas desde Antártica debido a sus propiedades metabólicas, además de un co-sustrato como es el suero de queso, donde se espera mejorar la calidad de este residuo líquido para fertirriego, además de poder valorizar el residuo y de este modo contribuir a la mitigación de los efectos negativos que provocará la actual crisis hídrica en nuestro país y el mundo.

### **1.9. Hipótesis**

La aplicación de cepas de bacterias ácido-lácticas aisladas de ambientes antárticos en el tratamiento de aguas residuales porcinas incrementa la biodisponibilidad de nutrientes, medidos a través de la demanda química de oxígeno, nitratos y fosfatos. Este proceso no solo optimiza la recuperación de nutrientes, sino que también favorece la producción de exopolisacáridos, lo cual contribuye a la formación de biopelículas y mejora la estabilidad del sistema microbiano, además de permitir su viabilidad, lo cual permite considerar estas cepas como potenciales biofertilizantes.

## 1.10. Objetivos

### Objetivo general

Estudiar el potencial de las bacterias ácido lácticas provenientes de la Antártida para su aplicación en el tratamiento y valorización de aguas residuales porcinas.

### Objetivos específicos

OE1: Evaluar el perfil taxonómico, bioquímico y de tolerancia fisiológica de cepas bacterianas ácido lácticas aisladas de matrices antárticas, con miras a su potencial uso en ambientes agroindustriales.

OE2: Evaluar el potencial de los aislados bacterianos para la recuperación y aprovechamiento de nutrientes presentes en aguas residuales porcinas (purines).

OE3: Caracterizar los aislados bacterianos en función de su potencial aplicación como biofertilizante.

## 1.11. Referencias

Abdul Aziz, M., Brini, F., Rouached, H., & Masmoudi, K. 2022. Genetically engineered crops for sustainably enhanced food production systems. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1027828. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1027828>.

Aguirre Brockway, R. 2021. Situación del mercado nacional e internacional de la carne de cerdo. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/articulos/situacion-del-mercado-nacional-e-internacional-de-la-carne-de-cerdo>

Akerman, M., Humalisto, N. y Pitzen, S. 2020. Material politics in the circular economy: The complicated journey from manure surplus to resource. *Geoforum; Journal of Physical, Human, and Regional Geosciences*, 116, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2020.07.013>

Akindolire, M., Rama, H, A. Roopnarain. 2022. Psychrophilic anaerobic digestion: A critical evaluation of microorganisms and enzymes to drive the process. *Renewable*

- and Sustainable Energy Reviews. 161(112394).  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112394>
- Akpogheli, P. O., Edo, G. I., Ali, A. B. M., Yousif, E., Zainulabdeen, K., Owheru, J. O., Isoje, E. F., Igbuku, U. A., Essaghah, A. E. A., Makia, R. S., Ahmed, D. S., Umar, H., & Alamiery, A. A. 2025. Lactic acid bacteria: Nature, characterization, mode of action, products and applications. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 152, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.02.010>.
- Amin, F. R., Khalid, H., El-Mashad, H. M., Chen, C., Liu, G., & Zhang, R. 2021. Functions of bacteria and archaea participating in the bioconversion of organic waste for methane production. *The Science of the Total Environment*, 143007. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143007>.
- Anumudu, C. K., Miri, T., & Onyeaka, H. 2024. Multifunctional Applications of Lactic Acid Bacteria: Enhancing Safety, Quality, and Nutritional Value in Foods and Fermented Beverages. *Foods*, 13(23), 3714. <https://doi.org/10.3390/foods13233714>.
- Azadi, Y., Yaghoubi, J., Gholizadeh, H., Gholamrezai, S., & Rahimi-Feyzabad, F. 2025. Social barriers to water scarcity adaptation: A grounded theory exploration in arid and semi-arid regions. *Agricultural Water Management*, 309(109338), 109338. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2025.109338>
- Bastami, M. S. B., Jones, D. L., & Chadwick, D. R. 2016. Reduction of methane emission during slurry storage by the addition of effective microorganisms and excessive carbon source from brewing sugar. *Journal of Environmental Quality*, 45(6), 2016–2022. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.11.0568>.
- Blount, Z. D., Maddamsetti, R., Grant, N. A., Ahmed, S. T., Jagdish, T., Baxter, J. A., Sommerfeld, B. A., Tillman, A., Moore, J., Slonczewski, J. L., Barrick, J. E., & Lenski, R. E. 2020. Genomic and phenotypic evolution of *Escherichia coli* in a novel citrate-only resource environment. *eLife*, 9, e55414. <https://doi.org/10.7554/eLife.55414>.
- Bueno de Mesquita, C. P., Wu, D., & Tringe, S. G. 2023. Methyl-based methanogenesis: An ecological and genomic review. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 87(1), e0002422. <https://doi.org/10.1128/mمبر.00024-22>.

- Cadena SER. 2025. Las megasequías son más largas y severas desde hace 40 años. Cadena SER. <https://cadenaser.com/nacional/2025/01/16/las-megasequias-son-mas-largas-y-severas-desde-hace-40-anos-cadena-ser/>
- Central Intelligence Agency, 2024. The world factbook. Antarctica. <https://www.cia.gov/the-world-factbook/countries/antarctica/#people-and-society> (Consulta: 12 agosto 2024).
- Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN). 2024. 56% de los suelos entre las regiones de Coquimbo y Los Lagos se encuentran en estado de degradación. <https://www.ciren.cl/noticias/56-de-los-suelos-entre-las-regiones-de-coquimbo-y-los-lagos-se-encuentran-en-estado-de-degradacion/>
- Centro del Clima y la Resiliencia. 2015. La megasequía 2010-2015: Una lección para el futuro. (CR)2, Chile. [en línea]. <<http://www.forestal.uach.cl/manejador/resources/2015informe-a-la-nacinla-megasequia-2010-2015una-leccion-para-el-futuro-1.pdf>>.
- Climent, M. J., Herrero-Hernández, E., Sánchez-Martín, M. J., Rodríguez-Cruz, M. S., Pedreros, P., & Urrutia, R. 2019. Residues of pesticides and some metabolites in dissolved and particulate phase in surface stream water of Cachapoal River basin, central Chile. *Environmental Pollution*, 251, 90-101. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.117>.
- Comisión Europea, 2014. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: Towards a circular economy: A zero waste programme for Europe. COM(2014) 398.
- Corrales, L.C., Antolinez Romero, D.M., Bohórquez Macías, J. A., Corredor Vargas, A.M. 2015. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova* 13(24), 55-81. <https://doi.org/10.22490/24629448.1717>.
- Chen, W., Oldfield, T. L., Patsios, S. I., & Holden, N. M. 2020. Hybrid life cycle assessment of agro-industrial wastewater valorisation. *Water Research*, 170(115275), 115275. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115275>.

- ChileCarne. 2021. Economía circular, eficiencia en la producción y sustentabilidad de la industria porcina en Chile. ChileCarne. <https://www.chilecarne.cl/economia-circular-eficiencia-en-la-produccion-y-sustentabilidad-de-la-industria-porcina-en-chile>.
- ChilePork. 2022. Empresas ChilePork reutilizan y recirculan más de un 67% del total de agua empleada en sus procesos de producción. <https://www.chilepork.com/es/empresas-chilepork-reutilizan-y-recirculan-mas-de-un-67-del-total-de-agua-empleada-en-sus-procesos-de-produccion/>.
- Davray, D., Deo, D., & Kulkarni, R. 2021. Plasmids encode niche-specific traits in Lactobacillaceae. *Microbial Genomics*, 7(3). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000472>.
- Diamantis, V., Eftaxias, A., Stamatelatos, K., Noutsopoulos, C., Vlachokostas, C., & Aivasidis, A. 2021. Bioenergy in the era of circular economy: Anaerobic digestion technological solutions to produce biogas from lipid-rich wastes. *Renewable Energy*, 168, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.12.034>.
- Eicher, C., Coulon, J., Favier, M., Alexandre, H., Reguant, C., & Grandvalet, C. 2023. Citrate metabolism in lactic acid bacteria: is there a beneficial effect for *Oenococcus oeni* in wine? *Frontiers in Microbiology*, 14, 1283220. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1283220>.
- Eusébio, A., Neves, A., & Marques, I. P. 2021. Structure of microbial communities when complementary effluents are anaerobically digested. *Applied Sciences (Basel, Switzerland)*, 11(3), 1293. <https://doi.org/10.3390/app11031293>.
- Feng, K., Wang, Q., Li, H., Du, X., & Zhang, Y. 2021. Microbial mechanism of enhancing methane production from anaerobic digestion of food waste via phase separation and pH control. *Journal of Environmental Management*, 288, 112460. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112460>.
- Fernández-Sandoval, M. T., Galíndez-Mayer, J., Bolívar, F., Gosset, G., Ramírez, O. T., & Martínez, A. 2019. Xylose–glucose co-fermentation to ethanol by *Escherichia coli* strain MS04 using single- and two-stage continuous cultures under micro-aerated conditions. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1191-0>.

- Fierro, P., Valdovinos, C., Lara, C., & Saldías, G. S. 2021. Influence of intensive agriculture on benthic macroinvertebrate assemblages and water quality in the Aconcagua River basin (Central Chile). *Water*, 13(4), 492. <https://doi.org/10.3390/w13040492>.
- Fundación Terram, 2024. Más del 56% de los suelos entre las regiones de Coquimbo y Los Lagos están degradados. <https://www.terram.cl/mas-del-56-de-los-suelos-entre-las-regiones-de-coquimbo-y-los-lagos-estan-degradados/>.
- Gao, X., Zhao, L., Liu, S., Li, Y., Xia, S., Chen, D., Wang, M., Wu, S., Dai, Q., Vu, H., Zacharias, L., DeBerardinis, R., Lim, E., Metallo, C., Boggon, T. J., Lonial, S., Lin, R., Mao, H., Pan, Y., Shan C., Chen, J. 2019.  $\Gamma$ -6-phosphogluconolactone, a byproduct of the oxidative pentose phosphate pathway, contributes to AMPK activation through inhibition of PP2A. *Molecular Cell*, 76(6), 857-871.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.007>.
- Garreaud, R.D., Boisier, J.P., Rondanelli, R., Montecinos, A., Sepúlveda, H.H., Veloso-Águila, D. 2020. The Central Chile Mega Drought (2010-2018): A climate dynamics perspective. *International Journal of Climatology* 40, 421-439. <https://doi.org/10.1002/joc.6219>.
- Guerrero-Cruz, S., Vaksmaa, A., Horn, M., Niemann, H., Pijuan, M., & Ho, A. 2021. Methanotrophs: Discoveries, environmental relevance, and a perspective on current and future applications. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678057>.
- Harper, A. R., Dobson, R. C. J., Morris, V. K., & Moggré, G.-J. 2022. Fermentation of plant-based dairy alternatives by lactic acid bacteria. *Microbial Biotechnology*, 15(5), 1404–1421. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14008>.
- Hasan, M.N., Altaf, M.M., Khan, N.A., Kahn, A.H., Kahn, A.A., Ahmed, S., Kumar, P.S., Naushad, M., Rajapaksha, A.U., Iqbal, J., Tirth, V., Islam, S. 2021. Recent technologies for nutrient removal and recovery from wastewaters: A review. *Chemosphere*, 130328, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130328>.

- Hassen, T., & Bilali, H. 2022. Impacts of the Russia-Ukraine war on global food security: Towards more sustainable and resilient food systems?. *Foods*, 11. <https://doi.org/10.3390/foods11152301>.
- He, L.-Y., He, L.-K., Liu, Y.-S., Zhang, M., Zhao, J.-L., Zhang, Q.-Q., & Ying, G.-G. 2019. Microbial diversity and antibiotic resistome in swine farm environments. *The Science of the Total Environment*, 685, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.369>.
- Hourigan, D., Stefanovic, E., Hill, C., & Ross, R. P. 2024. Promiscuous, persistent and problematic: insights into current enterococcal genomics to guide therapeutic strategy. *BMC Microbiology*, 24(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03243-2>.
- Jagtap, S., Trollman, H., Trollman, F., Garcia-Garcia, G., Parra-López, C., Duong, L., Martindale, W., Munekata, P., Lorenzo, J., Hdaifeh, A., Hassoun, A., Salonitis, K., & Afy-Shararah, M. 2022. The Russia-Ukraine Conflict: Its Implications for the global food supply chains. *Foods*, 11. <https://doi.org/10.3390/foods11142098>.
- Kavanagh, I., Fenton, O., Healy, M. G., Burchill, W., Lanigan, G. J., & Krol, D. J. 2021. Mitigating ammonia and greenhouse gas emissions from stored cattle slurry using agricultural waste, commercially available products and a chemical acidifier. *Journal of Cleaner Production*, 294(126251), 126251. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126251>.
- Kelly, S. M., Munoz-Munoz, J., & van Sinderen, D. 2021. Plant glycan metabolism by bifidobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12, 609418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.609418>.
- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., & Kot, A. M. 2021. Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules*, 26(7), 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>.
- Krishnan, A., Convey, P., Gonzalez-Rocha, G., Alias, S.A. 2016. Production of extracellular hydrolase enzymes by fungi from King George Island. *Polar Biology* 39(1), 65-76. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1606-7>.

- Koendjiharie, J. G., van Kranenburg, R., & Kengen, S. W. M. 2021. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node: variation at the heart of metabolism. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(3). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa061>.
- Kurade, M., Saha, S., Salama, E., Patil, S., Govindwar, S., & Jeon, B. 2019. Acetoclastic methanogenesis led by *Methanosarcina* in anaerobic co-digestion of fats, oil and grease for enhanced production of methane. *Bioresource Technology*, 272, 351-359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.047>.
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmael, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. 2022. Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*, 10(3), 596. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>.
- Lazarevic, D., Valve, H. 2017. Narrating expectations for the circular economy: Towards a common and contested European transition. *Energy Research & Social Science*, 31, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.erss.2017.05.006>.
- Lee, K., Jepson, W. 2020. Drivers and barriers to urban water reuse: A systematic review. *Water Security*, 11(5), 100073. <https://doi.org/10.1016/j.wasec.2020.100073>.
- Li, R., Peng, K., Li, Y., Liu, Y., & Wang, Z. 2020a. Exploring tet(X)-bearing tigecycline-resistant bacteria of swine farming environments. *The Science of the Total Environment*, 733(139306), 139306. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139306>.
- Li, W., Ren, M., Duo, L., Li, J., Wang, S., Sun, Y., Li, M., Ren, W., Hou, Q., Yu, J., Sun, Z., Sun, T. 2020b. Fermentation characteristics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from naturally fermented dairy products and screening of potential starter isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11:1794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01794>.
- Li, J., Peng, Y., Zhang, Q., Li, X., Yang, S., Li, S., Zhang, L. 2021. Rapid enrichment of anammox bacteria linked to floc aggregates in a single-stage partial nitrification-anammox process: Providing the initial carrier and anaerobic microenvironment. *Water Research*, 191. 116807. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116807>.
- Liu, A., Xu, R., Zhang, S., Wang, Y., Hu, B., Ao, X., Li, Q., Li, J., Hu, K., Yang, Y., & Liu, S. 2022. Antifungal mechanisms and application of lactic acid bacteria in bakery

- products: A review. *Frontiers in Microbiology*, 13, 924398. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.924398>.
- López-Pacheco, I. Y., Silva-Núñez, A., García-Perez, J. S., Carrillo-Nieves, D., Salinas-Salazar, C., Castillo-Zacarías, C., Afewerki, S., Barceló, D., Iqbal, H. N. M., & Parra-Saldívar, R. 2021. Phyco-remediation of swine wastewater as a sustainable model based on circular economy. *Journal of Environmental Management*, 278, 111534. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111534>.
- Lucius, S., & Hagemann, M. 2024. The primary carbon metabolism in cyanobacteria and its regulation. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1417680. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1417680>.
- Lyu Z, Shao N, Akinyemi T, Whitman WB. 2018. Methanogenesis. *Curr Biol* 28: R727–R732.
- Mand, T., & Metcalf, W. 2019. Energy conservation and hydrogenase function in methanogenic archaea, in particular the genus *Methanosarcina*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-19>.
- Marangon, B.B., Silva, T.A., Calijuri, M.L., Alves, S.C., dos Santos, V.J., De Sousa, A.P. 2020. Reuse of treated municipal wastewater in productive activities in Brazil's semi-arid regions. *Journal of Water Process Engineering*, 37, 101483. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101483>.
- Mariola, M. 2018. Limited fertility, limited land: Barriers to sustainability in a Chilean agrarian community. *Sustainability of Agroecosystems*. [https://doi: 10.5772/intechopen.75210](https://doi.org/10.5772/intechopen.75210).
- Melia, P.M., Cundy, A.B., Sohi, S.P., Hooda, P.S., Busquets, R., 2017. Trends in the recovery of phosphorus in bioavailable forms from wastewater. *Chemosphere* 186, 381–395. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.089>.
- Molinari Calle, R. 2021. Evaluación de la factibilidad técnica, estratégica y económica para la implementación del modelo de aparcería en la producción de carne de cerdo en Chile [Tesis de maestría]. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Industrial.

<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/184514/Evaluacion-de-la-factibilidad-tecnica-estrategica-y-economica-para-la-implementacion-del-modelo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

- Mona, S., Kumar, S.S., Kumar, V., Parveen, K., Saini, N., Deepak, B., Pugazhendhi, A. 2020. Green technology for sustainable biohydrogen production (waste to energy): A review. *Science of the Total Environment* 728, 138481. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138481>.
- Mukherjee, C., Denney, J., Mbonimpa, E., Slagley, J., Bhowmik, R. 2020. A review on municipal solid waste-to-energy trends in the USA. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109512. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109512>.
- Muñoz-Quezada, M. T., Pasten, P., Landeros, N., Valdés, C., Zúñiga-Venegas, L., Castillo, B., Lucero, B., Castillo, A., & Buralli, R. J. 2024. Bioethical analysis of the socio-environmental conflicts of a pig industry on a Chilean rural community. *Sustainability*, 16(13), 5457. <https://www.mdpi.com/2071-1050/16/13/5457>.
- Nakasaki, K., Nguyen, K., Ballesteros, F., Maekawa, T., & Koyama, M. 2020. Characterizing the microbial community involved in anaerobic digestion of lipid-rich wastewater to produce methane gas. *Anaerobe*, 102082. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102082>.
- Nandan, A., & Nampoothiri, K. M. 2020. Therapeutic and biotechnological applications of substrate specific microbial aminopeptidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(12), 5243–5257. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10641-9>.
- Ng, C. Y., Wang, L., Chowdhury, A., & Maranas, C. D. 2019. Pareto optimality explanation of the glycolytic alternatives in nature. *Scientific Reports*, 9(1), 2633. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38836-9>.
- Niquice-Janeiro, C. Marques-Arsenio, A., Brito, R.M.C.L., van Lier, J.B. 2020. Use of (partially) treated municipal wastewater in irrigated agriculture; potentials and constraints for sub-Saharan Africa. *Physics and Chemistry of the Earth* 118–119:102906. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2020.102906>.

- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. 2019a. Panorama de la Agricultura Chilena. Ministerio de Agricultura. <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2019/09/panorama2019Final.pdf>.
- Oficina de Políticas Agrarias 2019b. La industria porcina en Chile: Oportunidades y desafíos para su sustentabilidad. [https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2019/04/articulo-industria\\_porcina.pdf](https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2019/04/articulo-industria_porcina.pdf).
- Oficina de Políticas Agrarias. 2021. Boletín de la leche: avance de recepción y producción de la industria láctea. [https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2021/04/Leche\\_abril-2021.pdf](https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2021/04/Leche_abril-2021.pdf).
- Organización de Naciones Unidas, 2019. Informe de los Objetivos de Desarrollo Sostenible 2019. (n.d.). Cepal.org. Retrieved August 12, 2024, from <https://dds.cepal.org/redesoc/publicacion?id=5067>.
- Organización de Naciones Unidas (ONU), 2024. The United Nations World Water Development Report 2024: Water for Prosperity and Peace (n.d.). Retrieved March 01, 2025, from [https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000391195\\_](https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000391195_)
- Pajura, R. 2024. Composting municipal solid waste and animal manure in response to the current fertilizer crisis - a recent review. *The Science of the Total Environment*, 912(169221), 169221. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169221>.
- Pan, Z., Dai, R., Liao, J., Lin, J., Hong, Y., Ling, J., Xu, Y., Li, Y., Peng, J. 2020. Spontaneous formation and mechanism of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria in swine wastewater treatment system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 154, 105058. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105058>.
- Patel, M., Prasad W., Naithani H., Nataraj B.H., Arora S., Behare P.V. 2021. Comparative evaluation of in situ and ex-situ iron-complexing ability of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria in whey medium. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie (Food Science and Technology)*, 147(111598), 111598. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111598>.
- Prado, J., Chieppe, J., Raymundo, A., Fangueiro, D. 2020. Bio-acidification and enhanced crusting as an alternative to sulphuric acid addition to slurry to mitigate ammonia and

- greenhouse gases emissions during short term storage. *Journal of Cleaner Production*, 263(121443), 121443. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121443>.
- Peña, M., Nascimento, T., Gouveia, J., Escudero, J., Gómez, A., Letona, A., Arrieta, J., Fdz-Polanco, F. 2019. Anaerobic submerged membrane bioreactor (AnSMBR) treating municipal wastewater at ambient temperature: Operation and potential use for agricultural irrigation. *Bioresource Technology*, 282, 285-293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.019>.
- Pérez-Pérez, T., Pereda-Reyes, I., Oliva-Merencio, D., Zaiat, M. 2016. Anaerobic digestion technologies for the treatment of pig wastes. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(3), 343-354. <https://www.redalyc.org/pdf/6537/653768178015.pdf>.
- Popoola-Akinola, O. O., Raji, T. J., & Olawoye, B. 2022. Lignocellulose, dietary fibre, inulin and their potential application in food. *Heliyon*, 8(8), e10459. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10459>.
- Rama, G., Kuhn, D., Beux, S., Jachetti Maciel, M., Volken de Souza, C.F. 2019. Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *International Dairy Journal*, 98, 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.012>.
- Raman, J., Kim, J.-S., Choi, K. R., Eun, H., Yang, D., Ko, Y.-J., & Kim, S.-J. 2022. Application of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Sustainable Agriculture: Advantages and Limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7784. <https://doi.org/10.3390/ijms23147784>.
- Rasheed, T., Anwar, M.T., Ahmad, N., Sher, F., Khan, S.U.D., Ahmad A., Khan, R., Wazeer, I. 2021. Valorisation and emerging perspective of biomass based waste-to-energy technologies and their socio-environmental impact: A review. *Journal of Environmental Management*, 287, 112257. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112257>.
- Robles, A., Aguado García, D., Barat, R., Borrás, L., Bouzas, A., Gimenez, J., Martí, N., Ribes, J., Ruano, M., Serralta, J., Ferrer, J. 2020. New frontiers from removal to recycling of nitrogen and phosphorus from wastewater in the Circular Economy. *Bioresource Technology*, 300, 122673. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122673>.

- Rojas, A.M., Montaña, L.P., Bastidas, M.J. 2015. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Colombiana de Química*, 44(3), 5-10. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309044719001>.
- Samantaray, A., Chattaraj, S., Mitra, D., Ganguly, A., Kumar, R., Gaur, A., Mohapatra, P. K. D., Santos-Villalobos, S. de L., Rani, A., & Thatoi, H. 2024. Advances in microbial based bio-inoculum for amelioration of soil health and sustainable crop production. *Current Research in Microbial Sciences*, 7(100251), 100251. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100251>.
- Sánchez-Pascuala, A., de Lorenzo, V., & Nikel, P. I. 2017. Refactoring the Embden-Meyerhof-Parnas pathway as a whole of portable GlucoBricks for implantation of glycolytic modules in gram-negative bacteria. *ACS Synthetic Biology*, 6(5), 793–805. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00230>.
- San Martín, W., 2017. Nitrogen, science, and environmental change: the politics of the Green Revolution in Chile and the global nitrogen challenge. *Journal of Political Ecology*, 24(1), 777-796. <https://doi.org/10.2458/v24i1.20966>
- Santamaría-Fernández, M., & Lübeck, M. 2020. Production of leaf protein concentrates in green biorefineries as alternative feed for monogastric animals. *Animal Feed Science and Technology*, 268(114605), 114605. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114605>.
- Sarawaneeyaruk, S., Lorliam, W., Krajangsang, S., Pringsulaka, O. 2019. Enhancing plant growth under municipal wastewater irrigation by plant growth promoting rhizospheric *Bacillus* spp. *Journal of King Saud University - Science* 31 (3), 384-389. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.027>.
- Sganzerla, W., Buller, L.S., Mussatto, S.I., Forster-Carneiro, T. 2021. Techno-economic assessment of bioenergy and fertilizer production by anaerobic digestion of brewer's spent grains in a biorefinery concept. *Journal of Cleaner Production* 297, 126600. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126600>.

- Shahini, E., Skuraj, E., Sallaku, F., & Shahini, S. 2022. The Supply Shock in Organic Fertilizers for Agriculture Caused by the Effect of Russia-Ukraine War. *Scientific Horizons*. [https://doi.org/10.48077/scihor.25\(2\).2022.97-103](https://doi.org/10.48077/scihor.25(2).2022.97-103).
- Shen, J., Zhao, C., Liu, Y., Zhang, R., Liu, G., Chen, C. 2019. Biogas production from anaerobic co-digestion of durian shell with chicken, dairy, and pig manures. *Energy Conversion and Management* 98, 110535. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.06.099>.
- Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Popović, N., Tolinački, M., & Golić, N. 2021. Enterococci from Raw-Milk Cheeses: Current Knowledge on Safety, Technological, and Probiotic Concerns. *Foods*, 10(11), 2753. <https://doi.org/10.3390/foods10112753>.
- Thai, T. D., Lim, W., & Na, D. 2023. Synthetic bacteria for the detection and bioremediation of heavy metals. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1178680. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1178680>.
- Timofeeva, A., Galyamova, M., & Sedykh, S. 2022. Prospects for Using Phosphate-Solubilizing Microorganisms as Natural Fertilizers in Agriculture. *Plants*, 11(16), 2119. <https://doi.org/10.3390/plants11162119>.
- Tong, S., Xia, R., Chen, J., Li, W., Chen, Y., & Xu, C.-Y. 2024. A diagnostic framework to reveal future clean water scarcity in a changing climate. *Journal of Hydrology. Regional Studies*, 56(102040), 102040. <https://doi.org/10.1016/j.ejrh.2024.102040>.
- Tortajada, C., van Rensburg, P. 2020. Drink more recycled wastewater. *Nature* 577, 26-28. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-03913-6>.
- Tripathi, V. K., Rajput, T. B. S., Patel, N., & Nain, L. 2019. Impact of municipal wastewater reuse through micro-irrigation system on the incidence of coliforms in selected vegetable crops. *Journal of Environmental Management*, 251(109532), 109532. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109532>.
- Turaeva, B. I., Fo qizi, K. K., Soliev, A. B., & Kutlieva, G. J. 2022. Gibberellic and indole acetic acids producing features of bacteria from the genus *Lactobacillus* and their effect on plant development. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 681–686. <https://doi.org/10.5530/ajbls.2021.10.91>.

- Universidad Tecnológica Metropolitana. 2020. La importancia de la agroindustria. Admisión UTEM. <https://admisión.UTEM.cl/2020/11/19/la-importancia-de-la-agroindustria/#:~:text=El%20enorme%20potencial%20de%20Chile,se%20trabaja%20con%20recursos%20naturales%E2%80%9D>.
- Urquiza, A., Billi, M. 2020. Water markets and social-ecological resilience to water stress in the context of climate change: an analysis of the Limarí basin, Chile. *Environment, Development and Sustainability*, 22, 1929-1951. <https://doi.org/10.1007/s10668-018-0271-3>.
- Valenzuela, L. 2022. Competitividad y agroindustria. *Trilogía (Santiago)*, 37(48), 66-79. Santiago de Chile: Ediciones UTEM. <https://repositorio.UTEM.cl/bitstream/handle/30081993/1460/trilogia-37-48-valenzuela-ensayo-1.pdf?sequence=1>.
- Varma, V., Parajuli, R., Scott, E., Canter, T., Lim, T.T., Popp, J., Thoma, G. 2021. Dairy and swine manure management – Challenges and perspectives for sustainable treatment technology. *Science of the Total Environment* 778, 146319. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146319>.
- Wa, Y., Zhang, C., Sun, G., Qu, H., Chen, D., Huang, Y., & Gu, R. 2022. Effect of amino acids on free exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* 937 in chemically defined medium. *Journal of Dairy Science*, 105(8), 6460–6468. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21814>.
- Wang, L., Addy, M., Liu, J., Nekich, C., Zhang, R., Peng, P., Cheng, Y., Cobb, K., Liu, Y., Wang, H., Ruan, R. 2019. Integrated process for anaerobically digested swine manure treatment. *Bioresource Technology* 273, 506-514. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.050>.
- Wang, Z., Wang, T., Si, B., Watson, J., & Zhang, Y. 2021. Accelerating anaerobic digestion for methane production: Potential role of direct interspecies electron transfer. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2021.111069>.

- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. 2021b. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>.
- Wei, X., Xie, B., Wan, C., Song, R., Zhong, W., Xin, S., & Song, K. 2024. Enhancing Soil Health and Plant Growth through Microbial Fertilizers: Mechanisms, Benefits, and Sustainable Agricultural Practices. *Agronomy*, 14(3), 609. <https://doi.org/10.3390/agronomy14030609>.
- Williams, N., & O'Neill, L. 2018. A role for the Krebs cycle intermediate citrate in metabolic reprogramming in innate immunity and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 9, 141. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00141>.
- Xiang, S., Liu, Y., Lu, F., Zhang, Q., Wang, Y., Xiong, J., Huang, Z., Yu, Z., Ruan, R., & Cui, X. 2022. The combination of aerobic and microaerobic promote hydrolysis and acidification of rice straw and pig manure: Balance of insoluble and soluble substrate. *Bioresource Technology*, 350(126880), 126880. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126880>.
- Xu, Y., Wang, H., Mu, G., & Zhu, X. 2023. Allergenicity evaluation of fermented milk prepared by co-fermentation of *Lactobacillus plantarum* 7-2 and commercial starters after in vitro digestive. *Food Chemistry: X*, 20(100911), 100911. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100911>.
- Yaghoubi Khanghahi, M., Strafella, S., Filannino, P., Minervini, F., & Crecchio, C. 2024. Importance of Lactic Acid Bacteria as an Emerging Group of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Sustainable Agroecosystems. *Applied Sciences*, 14(5), 1798. <https://doi.org/10.3390/app14051798>.
- Yang, Y., Awasthi, M., Du, W., Ren, X., Lei, T., Lv, J. 2020. Compost supplementation with nitrogen loss and greenhouse gas emissions during pig manure composting. *Bioresource Technology*, 297, 122435. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122435>.
- Yang, W.-T., Shen, L.-D., & Bai, Y.-N. 2023. Role and regulation of anaerobic methane oxidation catalyzed by NC10 bacteria and ANME-2d archaea in various ecosystems.

- Environmental Research, 219(115174), 115174.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115174>.
- Yang, X., Hong, J., Wang, L., Cai, C., Mo, H., Wang, J., Fang, X., & Liao, Z. 2024. Effect of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Plant-Based Products. *Fermentation*, 10(1), 48. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010048>.
- Yousefi, N., & Abbasi, S. 2022. Food proteins: Solubility & thermal stability improvement techniques. *Food Chemistry Advances*, 1(100090), 100090. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100090>.
- Zayed, O., Hewedy, O. A., Abdelmoteleb, A., Ali, M., Youssef, M. S., Roumia, A. F., Seymour, D., & Yuan, Z.-C. 2023. Nitrogen Journey in Plants: From Uptake to Metabolism, Stress Response, and Microbe Interaction. *Biomolecules*, 13(10), 1443. <https://doi.org/10.3390/biom13101443>.
- Zhang, D., Zhang, J., Kalimuthu, S., Liu, J., Song, Z.-M., He, B.-B., Cai, P., Zhong, Z., Feng, C., Neelakantan, P., & Li, Y.-X. 2023. A systematically biosynthetic investigation of lactic acid bacteria reveals diverse antagonistic bacteriocins that potentially shape the human microbiome. *Microbiome*, 11(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01540-y>.
- Zhao, X., Tang, F., Cai, W., Peng, B., Zhang, P., & Shan, C. 2023. Effect of fermentation by lactic acid bacteria on the phenolic composition, antioxidant activity, and flavor substances of jujube–wolfberry composite juice. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 184(114884), 114884. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114884>.
- Zhou, Y., Yu, S., She, X., & Zhou, X. 2023. Study on the reduction of Tartary buckwheat allergenicity during *Pediococcus pentosaceus* fermentation by HPLC-MS/MS analysis. *Food Chemistry: X*, 19(100773), 100773. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100773>.
- Zeb, I., J., Mehboob, F., Kafle, G., Amin, B., Nazir, R., Ndegwa, P., & Frear, C. 2019. Kinetic and microbial analysis of methane production from dairy wastewater anaerobic digester under ammonia and salinity stresses. *Journal of Cleaner Production*, 797-808. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.295>.

Zucconi, L., Fierro-Vásquez, N., Antunes, A., Bendia, A. G., Lavin, P., González-Aravena, M., Sani, R. K., & Banerjee, A. 2025. Advocating microbial diversity conservation in Antarctica. *Npj Biodiversity*, 4(1), 5. <https://doi.org/10.1038/s44185-025-00076-8>.

## **CAPÍTULO II: Prácticas avanzadas en la sostenibilidad: exploración de alternativas para la reutilización de aguas residuales y la recuperación de nutrientes a partir de efluentes de la producción animal, una revisión**

Este capítulo ha sido publicado como: Herrera, O., and de Bruijn, J. .2025. Advanced sustainable practices: Exploring alternatives for wastewater reuse and nutrient recovery from animal production effluents, a review. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 25:147-160. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392025000100147>.

### **Resumen**

El agua es un recurso vital para la supervivencia humana, siendo el centro del desarrollo sostenible. Por otro lado, el sector ganadero emerge como un gran consumidor de agua, produciendo un volumen sustancial de aguas residuales ricas en nutrientes. En consecuencia, la viabilidad de reutilizar aguas residuales y recuperar sus nutrientes se hace necesaria para promover una mayor sostenibilidad de los recursos hídricos. El objetivo de este estudio fue generar conocimiento sobre el tratamiento terciario de las aguas residuales proveniente de la industria ganadera y avícola, la reutilización del agua y la recuperación de sus nutrientes, y sus posibles aplicaciones. Una revisión bibliográfica sistemática mediante búsquedas en las plataformas ScienceDirect y Web of Science permite explorar las tecnologías que facilitan la reutilización del agua y la recuperación de sus nutrientes a partir de agua residual de la ganadería y la avicultura, incluida la filtración por membrana. Como resultado, el flujo de residuos concentrado procedente de la filtración por membrana puede aprovecharse mediante un tratamiento adicional con microalgas, bacterias o consorcios sinérgicos de microalgas y bacterias, en particular bacterias lácticas inoñas para el ser humano. Por último, la integración de estas tecnologías presenta una vía prometedora para producir valiosos productos biotecnológicos con aplicaciones versátiles en la industria farmacéutica y alimentaria. Sin embargo, la aplicación de estas tecnologías a escala industrial requiere más investigación.

Palabras clave: aguas residuales, aves de corral, ganadería, reutilización del agua, valorización de residuos.

## 2.1. Introducción

El agua, como piedra angular de la vida y recurso vital para las actividades humanas, sigue siendo el máspreciado de nuestros bienes naturales (Unfried *et al.*, 2022). En la actualidad, factores como el crecimiento demográfico, la urbanización y el desarrollo económico están ejerciendo una presión significativa sobre los recursos hídricos disponibles, lo que afecta a la calidad y disponibilidad del agua (Lee y Jepson, 2020; Unfried *et al.*, 2022). La reutilización del agua se erige como una valiosa herramienta para la valorización de las aguas residuales por su potencial reincorporación en los sectores doméstico, industrial y agrícola. Entre los paradigmas emergentes, el marco de la economía circular (EC) ha ganado protagonismo (Åkerman *et al.*, 2020; Robles *et al.*, 2020). Este enfoque fomenta un cambio transformador de los sistemas lineales tradicionales de tomar-hacer-usar-eliminar a sistemas más sostenibles de tomar-hacer-usar-reutilizar, facilitando así la transición hacia una sociedad sostenible (Åkerman *et al.*, 2020). Los sectores ganadero y avícola, como importantes consumidores de agua, son un desafío especial para el tratamiento de las aguas residuales dentro del paradigma de la EC (López-Sánchez *et al.*, 2022a; Vaishnav *et al.*, 2023). Este desafío surge debido a la intrincada combinación de residuos animales y químicos, elevadas concentraciones de nutrientes, microorganismos y contaminantes inherentes a los efluentes ganaderos y avícolas. Dependiendo de las aplicaciones específicas, se hace evidente el imperativo del tratamiento de las aguas residuales para garantizar la calidad requerida del agua, adoptando sistemas no convencionales, solos o combinados, para facilitar la reutilización del agua y la recuperación de nutrientes (Thapa *et al.*, 2022; Yhaashikaa *et al.*, 2022; Khanal *et al.*, 2023). Al elevar la calidad de las aguas residuales mediante tratamientos terciarios se obtiene agua apta para aplicaciones en el riego o para su reintegración en los procesos de producción. Simultáneamente, se pueden recuperar compuestos valiosos y transformarlos posteriormente en productos, como biogás y biohidrógeno

(Sarawaneeyaruk *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020; Niquice-Janeiro *et al.*, 2020; Manasfi *et al.*, 2021). Este paradigma concuerda con los principios de la EC que proporcionan respeto por los límites ecológicos (Patwa *et al.*, 2021). Este estudio tiene como objetivo determinar las tendencias mundiales en el tratamiento terciario de las aguas residuales de la industria ganadera y avícola, la reutilización del agua y la recuperación de sus nutrientes, incluidas sus posibles aplicaciones, en los últimos siete años (2018-2024).

## **2.2. Características de las aguas residuales de ganado y aves de corral**

La producción de aguas residuales puede ser una fuente importante de contaminación del ecosistema si no se trata, ya que contiene grandes cantidades de materia orgánica, nutrientes, patógenos y compuestos farmacéuticos (Vaishnav *et al.*, 2023). Otro problema es la contaminación de las aguas subterráneas, que pueden verse afectadas por los efluentes ganaderos al filtrarse a través del suelo. Las aguas residuales pueden clasificarse según su origen, que se describe a continuación.

## **2.3. Aguas residuales de ganado**

La producción de ganado era de aproximadamente 1.600 millones de cabezas en 2018 en todo el mundo, lo que produce 37 kg de aguas residuales por cabeza por año (Shen *et al.*, 2018). Además del gran volumen de aguas residuales producidas, el panorama es bastante complicado debido a su amplio rango de pH, alta temperatura, alta carga orgánica medida como concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y demanda química de oxígeno (DQO) (Tabla 2.1). De Matos Nascimento *et al.* (2020) evaluaron la composición de las aguas residuales bovinas para comprender el impacto de este efluente en el medio ambiente, identificando que la reutilización de aguas residuales ofrece beneficios ambientales y económicos como una alternativa sostenible para la gestión de residuos líquidos, recomendando tratar las aguas residuales antes de su reutilización.

Tabla 2.1. Valores de los parámetros de calidad del agua encontrados en las aguas residuales de ganado y aves de corral.

Tipo de agua residual	pH	NT <sup>a)</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	FT <sup>a)</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	NH <sub>3</sub> -N <sup>a)</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	DQO <sup>a)</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Referencias
Ganado	7,1-8,1	95-1230	41-86	498-660	2900-10400	de Mendonça <i>et al.</i> , 2018; Lv <i>et al.</i> , 2018; Daneshvar <i>et al.</i> , 2019.
Aves de corral	7,1-7,3	49-80	7.5-55	123-150	350-4000	Ferreira <i>et al.</i> , 2018; Hülsen <i>et al.</i> , 2018; Zheng <i>et al.</i> , 2019; Artukmetov <i>et al.</i> , 2021.
Cerdo	6,4-6,8	200-2050	100-620	110-1600	2000-37000	Cheng <i>et al.</i> , 2019; López-Pacheco <i>et al.</i> , 2019; Oliveira <i>et al.</i> , 2020.

a) NT: nitrógeno total; FT: fósforo total; NH<sub>3</sub>-N: nitrógeno amoniacal; DQO: demanda química de oxígeno.

#### 2.4. Aguas residuales avícolas

La población de pollos de engorda se estimó en 66.500 millones en 2020 en todo el mundo, donde se requerían casi 26,5 L de agua para producir un pollo de esta categoría (Goswami y Pugazhenthii, 2020).

Estas aguas residuales son una fuente importante de contaminación del ecosistema. Al igual que los efluentes anteriores, contienen materia orgánica y nutrientes (Artukmetov *et al.*, 2021). Se componen principalmente de heces, plumas, restos de pienso y agua. También contienen grasas, proteínas, sólidos en suspensión, macronutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio, por lo que el mayor peligro de estas aguas residuales para el medio ambiente está relacionado con la eutrofización de los acuíferos. Por otra parte,

las concentraciones pueden variar en función del tipo de aves de corral, la cantidad de heces y las prácticas de gestión (Oueslati *et al.*, 2021). La Tabla 2.1 muestra los rangos de concentración de los parámetros de calidad del agua según la literatura.

## **2.5. Aguas residuales porcinas**

La carne de cerdo es la segunda más consumida en el mundo, correspondiendo a 118,8 millones de toneladas en 2018 (Tsai, 2018; FAO, 2021). La producción de 770.000 millones de cerdos en todo el mundo en 2018, con 4-8 L de efluentes por animal y día, genera una enorme cantidad de aguas residuales (Tsai, 2018; Vaishnav *et al.*, 2023). La composición de estas aguas residuales varía en función del sistema de producción, la fisiología de los animales y los procedimientos de manejo realizados en las explotaciones. El efluente generado contiene altos niveles de materia orgánica, incluyendo orina, residuos de piensos, aguas residuales de piensos, agua de limpieza de las granjas y otros compuestos como hormonas y antibióticos, con alrededor de un 10% de sólidos (Zhang *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2020a). En el caso de las heces, contienen fósforo, cobre, zinc y nitrógeno (sobre todo amoníaco) porque estos nutrientes se incorporan a su dieta para mejorar la eficiencia alimentaria y la salud en general (Zhou *et al.*, 2019). Según la Tabla 2.1, las aguas residuales porcinas contienen las mayores concentraciones de contaminantes, por lo que se requiere un tratamiento adecuado.

## **2.6. Tratamientos físicos y químicos**

Para producir 200 kg de carne, el sector ganadero consume 15.000 litros de agua, lo que se traduce en la generación de importantes cantidades de purines con abundantes nutrientes recuperables (Xie *et al.*, 2020). Anualmente se generan unos 3.000 litros de purines por animal, incluidos los segmentos bovino, porcino y avícola. Constituidos principalmente por heces, orina, restos de piensos y efluentes de limpieza de las instalaciones de animales, estos residuos presentan variabilidad debido a la especie, la edad, la composición de los piensos y las condiciones de cría (Nagarajan *et al.*, 2020; López-Sánchez *et al.*, 2022a). Debido a su composición, los indicadores clave de la calidad de las aguas residuales, como la demanda química de oxígeno (DQO), el

nitrógeno total (NT), el fósforo total (PT), el nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>-N) y el pH, requieren un seguimiento para evitar consecuencias medioambientales perjudiciales (López-Sánchez *et al.*, 2022a).

Las aguas residuales, una reserva inestimable de agua, poseen el potencial de producir nutrientes y energía. Sin embargo, para gestionar las aguas residuales de acuerdo con el concepto de economía circular, es necesario introducir cambios en los sistemas de tratamiento actuales, incluida la reutilización de los purines de ganado. La factibilidad de aplicar tales tratamientos depende de factores como el flujo de material a tratar y el contenido de materia orgánica en el efluente.

Existen varias tecnologías físicas y químicas para la reutilización del agua y la recuperación de residuos, incluyendo los procesos de oxidación avanzada (Tabla 2.2). Aplicando la electrocoagulación, por ejemplo, a las aguas residuales avícolas, la recuperación de agua varía entre el 50-75% con una recuperación de lodos del 5-10% (Vaishnav *et al.*, 2023). Sin embargo, existen varios parámetros como los costos de mantenimiento, así como el rendimiento de estas tecnologías, que son una desventaja para su implantación (Tabla 2.2). Con el fin de ampliar la escala de estas tecnologías, hay que tener en cuenta varios aspectos para mejorarlas. Existe trabajo de investigación en curso, pero se deben realizar más análisis en relación con los costos del proceso, la toxicidad de los efluentes y subproductos, la tecnología de catalizadores y el diseño del reactor, entre otros (Domingues *et al.*, 2021).

Tabla 2.2. Procesos fisicoquímicos estudiados para eliminar residuos y conseguir la reutilización de aguas residuales ganaderas.

Tecnología	Ventaja	Desventaja	Referencias
Fenton	Menor toxicidad del efluente, eliminación del color, mineralización de contaminantes.	Toxicidad del hierro, no reutilización del catalizador, baja eficacia a pH elevado para aguas residuales complejas.	Domingues <i>et al.</i> , 2018; Domingues <i>et al.</i> , 2021.

Tabla 2.2 (continuación)

Foto-Fenton	Mejora de la degradación de moléculas orgánicas.	Necesidad de radiación UV, aumento de los costos.	Park <i>et al.</i> , 2019.
Ozonización	Reacción con moléculas ricas en electrones.	Oxidación incompleta de aguas residuales complejas, subproductos tóxicos.	Gomes <i>et al.</i> , 2019; Cheng <i>et al.</i> , 2020b; Rekhate and Srivastava, 2020.
Fotocatálisis	Reacción rápida mediante radiación solar, alta mineralización de los contaminantes.	Elevada turbidez del efluente, filtración del efluente con mayores costos.	Basavarajappa <i>et al.</i> , 2020; Cheng <i>et al.</i> , 2020b; Kang <i>et al.</i> , 2020; Zhao <i>et al.</i> , 2020; Domingues <i>et al.</i> , 2021.
Procesos electroquímicos	Funcionamiento a temperatura y presión ambiente, alto rendimiento y adaptabilidad a las aguas residuales ganaderas.	Costos elevados de los electrodos, alto consumo de energía, subproductos tóxicos, formación de compuestos organoclorados a partir del NaCl.	Huang <i>et al.</i> , 2018; Garcia-Segura <i>et al.</i> , 2019; Huang <i>et al.</i> , 2019.
Electrocoagulación	Equipos sencillos, funcionamiento y automatización.	La sustitución de los ánodos aumenta los costos del proceso.	Zhang <i>et al.</i> , 2018.

De acuerdo con la Tabla 2.2, las alternativas de tratamiento son eficaces en términos de degradación de la materia orgánica, velocidad de reacción y condiciones de operación.

El agua reutilizada es una fuente hidrológicamente independiente durante todo el año que puede amortiguar los impactos de la escasez de agua (Lee y Jepson, 2020). Una de las ventajas de la reutilización del agua es la posibilidad de reducir la presión sobre el consumo de agua y, por otro lado, permitir valorizar los residuos presentes en dicha agua mediante diversas tecnologías, que se están expandiendo rápidamente debido a la necesidad de reciclar adecuadamente algunos elementos clave de las aguas residuales (como el nitrógeno y el fósforo, por ejemplo) para avanzar hacia una sociedad moderna verdaderamente sostenible (Robles *et al.*, 2020; Hasan *et al.*, 2021). La capacidad de recuperar y valorizar los elementos y nutrientes de las aguas residuales genera beneficios como el cumplimiento con los niveles de nutrientes en los efluentes, exigidos por la legislación, la reducción de los problemas de eutrofización y la obtención de subproductos con potencial económico de diversa índole, entre otros (Robles *et al.*, 2020).

A nivel internacional, no existe una legislación medioambiental unificada que regule el uso de aguas residuales tratadas procedentes de la industria de producción animal para aplicaciones de riego. A nivel local, la legislación chilena NCh 1333 regula los requisitos de calidad del agua para diversas aplicaciones, incluido el riego; sin embargo, sólo define el rango de valores de pH (5,5-9,0) para el riego. Para la descarga de residuos líquidos industriales al alcantarillado, la disposición legal D.S. 609/1998 de Chile regula los estándares de pH, fósforo, nitrógeno y demanda biológica de oxígeno, entre otros (Tabla 2.3). La disposición legal D.S. 90/01 de Chile se aplica para la descarga de residuos líquidos a sistemas de aguas superficiales e incluye los parámetros antes mencionados (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Límite máximo o rango de algunos parámetros para la descarga de residuos líquidos según la legislación ambiental chilena.

Parámetro	Disposición legal según	Disposición legal según
	D.S. 609/1998	D.S. 90/01
pH	5,5-9,0	6,0-8,5
FT (mg/L)	15	10

NT (mg/L)	80	50
DBO (mg/L)	35	35

FT: fósforo total; NT: nitrógeno total; DBO: demanda biológica de oxígeno.

Cabe mencionar que se ha estudiado la reutilización de las aguas residuales de ganado y aves de corral. Existen varias tecnologías evaluadas en la reutilización de aguas residuales ganaderas, como la filtración por membrana con un alto porcentaje de recuperación (Tabla 2.4). Por lo tanto, la filtración por membrana parece ser la tecnología más viable para la reutilización de aguas residuales. En concreto, Mansor *et al.* (2021) desarrollaron membranas de ultrafiltración capaces de eliminar la demanda biológica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO), los sólidos solubles totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y la turbidez con una eficiencia del 99,8%, 99,7%, 99,8% y 99,6%, respectivamente. Los compuestos mencionados son la principal fuente de contaminantes orgánicos en el caso de los residuos de la industria láctea. La ultrafiltración es un buen método para el tratamiento de aguas de importancia económica y ecológica que deberían reutilizarse. La Tabla 2.4 es un compendio de estudios que resume los esfuerzos de investigación relativos a la reutilización de las aguas residuales ganaderas, avícolas y lácteas.

Tabla 2.4. Reutilización de las aguas residuales de las industrias ganadera, avícola y láctea, y su eficiencia de eliminación.

Tipo de agua residual	Parámetros <sup>a)</sup>	Tecnología	Reúso	Eficiencia de remoción (%)	Referencias
Purín de aves de corral	DQO, SST, turbidez.	Microfiltración	Limpieza, riego.	100	Goswami and Pugazhenth, 2020
Suero de queso	DBO, DQO, SST.	Ultrafiltración	Limpieza, riego.	99	Mansor <i>et al.</i> , 2021

Tabla 2.4 (continuación)

Purín de cerdo	Fósforo.	Absorción con aluminio.	Limpieza, riego.	94	Banet <i>et al.</i> , 2020
Purín de cerdo	NH <sub>3</sub> -N	Compost.	Limpieza, riego.	87	Matiz-Villamil, <i>et al.</i> , 2023
Aguas residuales ganaderas	DQO, fósforo, nitrógeno.	Sistemas de multicapa asistidos con microcorriente.	Limpieza, riego.	>80	Liu <i>et al.</i> , 2022
Aguas residuales lácteas	DBO, proteínas, lípidos.	Coagulación.	Limpieza, riego.	73	Kurup <i>et al.</i> , 2019

a) DQO: demanda química de oxígeno; SST: sólidos solubles totales; DBO: demanda biológica de oxígeno; NT: nitrógeno total; NH<sub>3</sub>-N: nitrógeno amoniacal.

## 2.7. Filtración por membrana

En la actualidad, en la gestión de las aguas residuales se emplea un amplio espectro de técnicas de eliminación de nutrientes. Sin embargo, estas tecnologías muestran con frecuencia una ineficacia que permite que los nutrientes penetren en los ecosistemas acuáticos. El aumento de la reutilización de las aguas residuales implica la incorporación de tratamientos terciarios a los lodos, como los procesos de membrana con alta eficiencia de eliminación de nutrientes (Tabla 2.4) con un rendimiento de concentrado o retentado del 20-40%, una recuperación de agua del 55-75% para efluentes lácteos y del 50-90% para efluentes porcinos (Vaishnav *et al.*, 2023). En este contexto, su combinación con tratamientos biológicos surge como una forma ecológicamente consciente de suceder a los tratamientos secundarios mediante la captura de residuos químicos de las aguas residuales y su conversión en productos potencialmente valiosos (Vaishnav *et al.*, 2023). Las tecnologías de membrana son una herramienta versátil utilizada en diversos sectores, desde la producción de agua potable hasta la recuperación de otros recursos. En el tratamiento de aguas residuales, las tecnologías de membrana ofrecen una serie

de ventajas sobre los métodos tradicionales, como un menor consumo de energía, una separación continua y una mayor eficacia en la eliminación de contaminantes (Vaishnav *et al.*, 2023). Una de las principales ventajas de las tecnologías de membrana es que pueden eliminar contaminantes de forma continua. Esto contrasta con los métodos tradicionales de tratamiento de aguas residuales, que suelen ser procesos por lotes que requieren un tiempo no operativo para su limpieza y mantenimiento. Otra ventaja de las tecnologías de membrana es que pueden reducir el consumo de energía, ya que las membranas son capaces de separar los contaminantes físicamente, en lugar de utilizar procesos químicos o biológicos con un mayor consumo de energía (Quan *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2022). Sin embargo, las tecnologías de membrana también tienen algunas desventajas. Una de las principales desventajas es que pueden ser caras de instalar y operar. Otra desventaja es que las membranas pueden obstruirse con contaminantes, lo que se conoce como ensuciamiento, lo que reduce el flujo del permeado y requiere una limpieza periódica (Kwon *et al.*, 2021). Esto ocurre cuando los sólidos y otros materiales orgánicos se depositan en la superficie o dentro de los poros de la membrana. Esto reducirá el flujo del permeado, lo que requerirá más presión y aumentará el consumo de energía. En el ensuciamiento de las membranas influyen varios factores, como las propiedades de la membrana, su rugosidad e hidrofobicidad, la velocidad del flujo, la presión transmembrana, la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la concentración de contaminantes (Obotey-Ezugbe y Rathilal, 2020; Bera *et al.*, 2022; Vaishnav *et al.*, 2023). Sin embargo, aún existe un vacío en el conocimiento sobre el uso de membranas en condiciones de bajo ensuciamiento, así como la búsqueda de alternativas para mitigar el ensuciamiento con el fin de alargar la vida operativa de estos elementos.

## **2.8. Tratamientos biológicos**

Entre las tecnologías investigadas para la recuperación y valorización de residuos de purines ganaderos destacan las microalgas y las bacterias como las más ampliamente estudiadas, en particular las interacciones microalgas-bacterias (López-Sánchez *et al.*,

2022b). Estos tratamientos biológicos presentan una notable ventaja sobre los procedimientos químicos o los sistemas de membranas debido a la disminución del consumo energético y de los gastos operativos (Crini y Lichtfouse, 2019; Sutherland y Ralph, 2019; Pacheco *et al.*, 2020).

## 2.9. Microalgas

Debido a su adaptabilidad a diversos medios acuáticos, las microalgas han demostrado ser un receptor adecuado de nutrientes procedentes de los efluentes ganaderos. Como ya se ha dicho, estos efluentes contienen macronutrientes, como nitrógeno y fósforo, junto con micronutrientes como calcio, cloro, cromo, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, sílice, sodio, azufre y zinc. Este entorno químico diverso favorece la proliferación de microalgas. El empleo de tratamientos de aguas residuales basados en microalgas asimila eficazmente la materia orgánica y los nutrientes, satisfaciendo sus necesidades de crecimiento, al tiempo que sirve como depósito de nutrientes y precursores químicos como proteínas, lípidos, polisacáridos, vitaminas y betacarotenos, lo que permite la generación de productos como los biocombustibles (Tabla 2.5) (Li *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020). La eliminación biológica de nutrientes impulsada por microalgas ha sido objeto de un amplio estudio en los últimos años (Cheng *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2019; Nagarajan *et al.*, 2020). Este proceso permite la síntesis de diversos productos valiosos en condiciones notablemente rentables de aproximadamente 0,24 USD\$/m<sup>3</sup> (Figura 2.1) (Cheng *et al.*, 2020a; Chaudry, 2021).

Tabla 2.5. Principales especies de microalgas y productos generados a partir de aguas residuales ganaderas y sus aplicaciones.

Especies	Producto	Aplicación	Referencias
<i>Botryococcus braunii</i> ; <i>Chlorella zofingiensis</i> ; <i>Coelastrella striolata</i> ; <i>Cryptonemia obovate</i> ; <i>Dunaliella bardawil</i> ; <i>Dunaliella salina</i> ;	Carotenoides, pigmentos	Colorantes, aditivos alimentarios, suplementos nutricionales	Khoo <i>et al.</i> , 2019; Koyande <i>et al.</i> , 2019; Sathasivam <i>et al.</i> , 2019; Zanella and Vianello, 2020.

Tabla 2.5 (continuación)

<p><i>Haematococcus pluvialis</i>;  <i>Nannochloropsis gaditana</i>;  <i>Phaeodactylum tricornutum</i>;  <i>Scenedesmus obliquus</i>.</p>	<p>Polisacáridos</p>	<p>Actividades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, anticancerígenas, inmunomoduladoras, antiinflamatorias, anticoagulantes, antitusivas, antiglucémicas, antilipídicas y antienvjecimiento, bioplásticos.</p>	<p>Koutra <i>et al.</i>, 2018; Prybylski <i>et al.</i>, 2020.</p>
<p><i>Arthrospira platensis</i>;  <i>Chlorella minutissima</i>;  <i>Chlorella sorokiniana</i>;  <i>Scenedesmus bijuga consorcia</i>.</p>	<p>Proteínas</p>	<p>Alimentación animal, productos industriales, productos de cuidado personal.</p>	<p>Moheimani <i>et al.</i>, 2018; Fuentes-Tristan <i>et al.</i>, 2019; Luo <i>et al.</i>, 2019; Orfanoudaki <i>et al.</i>, 2019; Amador-Castro <i>et al.</i>, 2020.</p>
<p><i>Botryococcus braunii</i>;  <i>Chlorella prothothecoides</i>;  <i>Chlorella sorokiniana</i>;  <i>Scenedesmus obliquus</i>.</p>	<p>Lípidos</p>	<p>Biodiesel, bioetanol, biogás, biohidrógeno.</p>	<p>Kadir <i>et al.</i>, 2018; Khalid <i>et al.</i>, 2018; Javed <i>et al.</i>, 2019; Maaz <i>et al.</i>, 2019.</p>
<p><i>Botryococcus braunii</i>;  <i>Chlorella kessleri</i>;  <i>Dunaliella tertiolecta</i>;  <i>Tetraselmis suecica</i>.</p>	<p>Nanopartículas metálicas</p>	<p>Industria cosmética, envasado de alimentos, productos textiles.</p>	<p>Arévalo-Gallegos <i>et al.</i>, 2018; Arya <i>et al.</i>, 2018; Pugazhendhi <i>et al.</i>, 2018.</p>

Compuestos generados Phylum	Ficobiliproteínas	Polisacáridos	Clorofilas	Carotenoides	Esteroles	Vitaminas	Proteínas	Polifenoles	AGPI
Chlorophyta		2,5,6,8,10	1,2,3,5	1,2,3,4,5	3,5,8,10,11	5	3,4,5,6,7,8,9		
Rhodophyta	1,2,3,5	2,5,6,8,10							
Cyanobacteria	1,2,3,5	2,5,6,8,10					3,4,5,6,7,8,9	3,5,8,9	
Glaucophyta	1,2,3,5								
Cryptista	1,2,3,5								3,8,9,11
Haptophyta					3,5,8,10,11	5			3,8,9,11
Heterokontophyta					3,5,8,10,11	5		3,5,8,9	3,8,9,11

Figura 2.1. Compuestos de aguas residuales ganaderas sintetizados por microalgas (a) y sus aplicaciones (b). Adaptado de López-Sánchez et al. (2022a).

a) AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

b) 1: colorantes utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica o cosmética; 2: inmunoestimulante en la industria farmacéutica o cosmética; 3: antiinflamatorio; 4: fotoprotector; 5: antioxidante en nutraceuticos; 6: agente reológico en la industria alimentaria; 7: estimulante del colágeno en la industria cosmética estimulante del colágeno en la industria cosmética; 8: anticrónico en la industria farmacéutica; 9: antimicrobiano/antiviral en la industria farmacéutica o cosmética; 10: lipidémico anticacético; 11: antidegenerativo en la industria farmacéutica.

El contenido total de carotenoides para las especies microalgales oscila entre el 0,69% y el 14% de la biomasa (Koyande *et al.*, 2019). Estos compuestos se aplicaron debido a sus propiedades antioxidantes como colorantes naturales no alergénicos, suplementos para piensos y compuestos funcionales para el consumo humano y animal (Khoo *et al.*, 2019; Sathasivam *et al.*, 2019; Zanella y Vianello, 2020). El contenido proteico de las microalgas oscila entre el 6% y el 71% de la composición de la materia seca (Koyande *et al.*, 2019), utilizándose en la producción de productos de cuidado personal como filtros UV (Fuentes-Tristan *et al.*, 2019; Amador-Castro *et al.*, 2020). Además, las microalgas son una destacada materia prima para biocombustibles de tercera generación debido a su alto contenido en lípidos, con una producción de aceite que supera entre 15 y 300 veces la de cultivos oleaginosos como el maíz, el girasol, la soja y la palma (Lee *et al.*, 2020; Poh *et al.*, 2020). Las microalgas también producen exopolisacáridos (EPS), compuestos de elevado valor por sus notables atributos, con un porcentaje de

recuperación del orden del 74-78% (Cheng *et al.*, 2020a). Además de sus propiedades autofloculantes, los EPS presentan características antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, anticancerígenas, inmunomoduladoras, antiinflamatorias, anticoagulantes, antitusivas, antiglucémicas, antilipidémicas y antienvjecimiento (Prybylski *et al.*, 2020). En consecuencia, los tratamientos biológicos con microalgas ofrecen una vía viable para la recuperación, transformación y reutilización de nutrientes de las aguas residuales ganaderas. Sin embargo, a pesar del éxito de los ensayos a escala de laboratorio y de los cultivos de alta densidad, sigue existiendo el reto de la ampliación, junto con la posterior extracción y purificación de las biomoléculas generadas (Li *et al.*, 2020). Como las microalgas están suspendidas en el medio de cultivo acuoso, la biomasa y los metabolitos intra/extracelulares requieren la separación y recolección de este medio (Li *et al.*, 2020). Entre las tecnologías más destacadas para la recolección de biomasa microalgal, existen la centrifugación, la floculación y la filtración (Singh y Patidar, 2018). Sin embargo, algunos de estos procesos tienen implicaciones adversas a escala industrial, como la utilización de floculantes perjudiciales para el medio ambiente, y dificultan la posterior purificación de las algas y/o sus derivados (Hu *et al.*, 2020).

## **2.10. Consorcios microalgas-bacterias**

Los consorcios microalgas-bacterias presentan una compleja interacción de relaciones mutualistas y antagonistas (Gradilla-Hernández *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Dentro de este resultado dinámico y beneficioso se produce la síntesis de compuestos como micronutrientes y vitaminas, junto con la mejora en la eficiencia del proceso. En el caso de interacciones mutualistas bacteria-microalga, las bacterias contribuyen a la producción de compuestos favorables para el crecimiento microalgal, incluyendo micronutrientes, vitaminas, estimulantes del crecimiento y antibióticos que protegen a las microalgas contra microbios patógenos (López-Sánchez *et al.*, 2022b). Además, la actividad respiratoria de las bacterias libera dióxido de carbono - crítico para la fotosíntesis

microalgal - aumentando los niveles de oxígeno disuelto para las bacterias aeróbicas en el medio, mitigando así la necesidad de aireación mecánica (Zhang *et al.*, 2021).

No obstante, estos consorcios también pueden dar lugar a efectos adversos. Las bacterias nitrificantes pueden perturbar el crecimiento microalgal; se produce competencia a concentraciones limitadas de CO<sub>2</sub>; sustancias como la estreptomicina pueden interferir con los mecanismos fotosintéticos impidiendo el transporte de electrones, lo que lleva a una reducción del crecimiento microalgal y de la acumulación de biomasa. La Tabla 2.5 hace referencia a potenciales microalgas para ser utilizadas en consorcios microbianos en el tratamiento de aguas residuales agroindustriales.

Determinadas bacterias pueden participar en una alianza simbiótica con microalgas, ejemplificada por *Chlorella vulgaris*, en la que ambos grupos obtienen beneficios mutuos. Este conocimiento sirve de piedra angular para formular estrategias que mejoren la viabilidad técnica y económica de los sistemas de tratamiento de aguas residuales basados en consorcios de bacterias y microalgas. Entre las ventajas se encuentran la simplificación del proceso, la nitrificación y desnitrificación concurrentes, el aumento de la supervivencia de las microalgas tras la aclimatación debido a la robustez del sistema y la reducción de los costos de esterilización asociados a las aguas residuales ganaderas (López-Sánchez *et al.*, 2023). A pesar de ello, es indispensable una mayor validación de estos sistemas a través de estudios en curso.

Aunque las características únicas de las especies de microalgas las hacen adecuadas para objetivos particulares, la mayor parte de la literatura examina predominantemente los monocultivos. Sin embargo, la dificultad de mantener condiciones estériles, especialmente en sistemas de estanque abierto, incita a explorar el potencial de los consorcios de microalgas con otros microorganismos, como las bacterias lácticas, una vía prometedora que sigue sin estar relativamente clara.

### **2.11. Retos futuros: las bacterias lácticas como alternativa de valorización de residuos**

Las bacterias lácticas (BAL) constituyen un grupo diverso de microorganismos procariotas reconocidos por su variada morfología y fisiología, caracterizados principalmente por la fermentación de azúcares que conduce a la producción de ácido láctico. Pertenecientes al orden de los Lactobacillales, las BAL contienen seis familias, 30 géneros (principalmente *Lactococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Leuconostoc* sp. y *Lactobacillus* sp.) y más de 300 especies (Mora-Villalobos *et al.*, 2020). Al prosperar en diversas condiciones ambientales, las BAL desempeñan muchas funciones, desde adaptarse a nichos ecológicos (por ejemplo, aguas residuales) hasta crecer en condiciones adversas de temperatura, pH y salinidad (Vasmara *et al.*, 2021). Las BAL producen bacteriocinas con atributos antimicrobianos que pueden retrasar el crecimiento de patógenos (Mora-Villalobos *et al.*, 2020). La biomasa es un pienso de alta calidad o un suplemento probiótico, que promueve la salud de la microbiota intestinal, reduce el colesterol y regula la respuesta inmunitaria de los consumidores. Las BL sintetizan ácidos láctico y poliláctico, presentando varias aplicaciones en la industria alimentaria y de bioplásticos (Zou *et al.*, 2024). Además, las BL son una vía propicia para la producción de EPS funcionales, que se manifiestan como polímeros exocelulares iónicos o no iónicos de alto peso molecular (Yildiz y Karatas, 2018; Daba *et al.*, 2021; Korcz y Varga, 2021). Entre los EPS derivados de BL se encuentran el dextrano, el levan, el kefiran y el ácido hialurónico. Estos compuestos ejercen efectos de aumento de la viscosidad, emulsionantes, texturizantes y estabilizantes, junto con atributos antifúngicos, antibacterianos, antioxidantes y prebióticos (Mantovan *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018; Hasheminya *et al.*, 2019; Moradi y Kalanpour, 2019; Martin *et al.*, 2020). La Figura 2.2 resume los productos obtenidos tras la valorización de residuos mediante BAL.

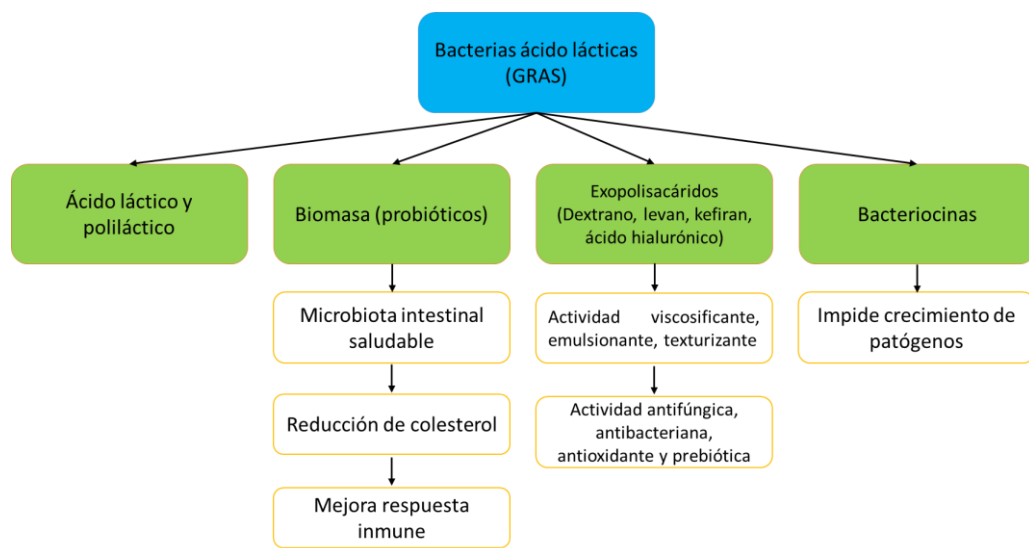


Figura 2.2. Productos obtenidos a partir de efluentes ganaderos y avícolas mediante bacterias lácticas.

No hay estudios publicados sobre el tratamiento de aguas residuales ganaderas empleando BAL. Hasta donde sabemos, estos microorganismos poseen las vías metabólicas para la formación de bioproductos y la recuperación de estos efluentes. Sin embargo, de acuerdo a los requerimientos nutricionales las BAL necesitan co-fermentaciones que involucran la combinación de dos tipos de aguas residuales o desechos para establecer las condiciones óptimas para la proliferación microbiana (Vasmara *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022). La incorporación de cepas con atributos probióticos en el tratamiento de residuos y/o efluentes no sólo promueve la producción de bioproductos como ácidos orgánicos y exopolisacáridos, sino que también produce biomasa probiótica, valiosa como alimento animal o utilizada en aplicaciones agrícolas (Zhong *et al.*, 2021; Pekkoh *et al.*, 2022; Sadeghi *et al.*, 2022). Estos atributos únicos de las BAL hacen que su exploración para el tratamiento de aguas residuales ganaderas y la recuperación de residuos sea un reto prometedor, en particular, para aquellas BAL provenientes de Antártica.

Por último, la Figura 2.3 ofrece una representación conceptual de un sistema integrado de tratamiento de aguas residuales, que combina las tecnologías de filtración

predominantes y los sistemas biológicos. Las aguas residuales podrían someterse a un tratamiento terciario mediante membranas de ultrafiltración, lo que permitiría la reutilización del agua dentro de la instalación y/o el riego agrícola. Simultáneamente, la fracción de retención proveniente de la etapa de ultrafiltración podría someterse a un proceso de transformación biológica con microalgas, por ejemplo, del género *Chlorella*, facilitando la recuperación de nutrientes viables en aplicaciones farmacéuticas, alimentarias, agrícolas o ganaderas, reintegrándolos al ciclo productivo. Además, este proceso podría generar biocombustibles como el biogás para el suministro energético dentro de la misma fase de tratamiento terciario.

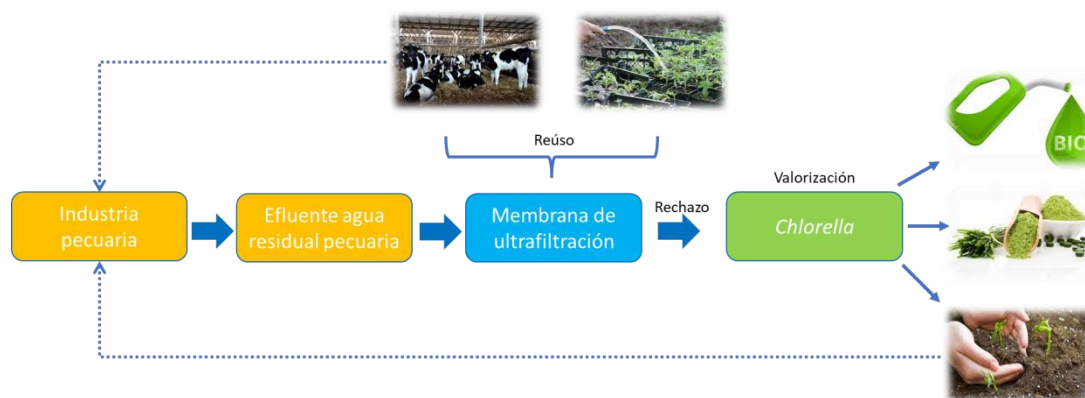


Figura 2.3. Esquema del sistema de tratamiento integrado propuesto para la reutilización y valorización de las aguas residuales ganaderas y avícolas.

## 2.12. Conclusiones

Un sistema integrado para aguas residuales ganaderas y avícolas que combina la filtración por membranas con bacterias y microalgas ofrece una tecnología de bioprocesado sostenible y ecológica para la reutilización del agua y la valorización de residuos. La tecnología de membranas de ultrafiltración es importante en la reutilización de aguas residuales debido a su notable capacidad para alcanzar tasas de eliminación de nutrientes de hasta un 100%. Esta tecnología permite la reutilización del agua dentro del mismo proceso de producción o su uso como agua de riego en la agricultura. Además,

la integración de este proceso de separación con sistemas biológicos permite la creación de valiosos compuestos biotecnológicos a partir de los nutrientes de las aguas residuales. Las microalgas y las bacterias actúan como precursores, generando subproductos de gran valor a través de sus vías metabólicas y compuestos como complementos alimenticios y agentes promotores de la salud. En particular, las bacterias lácticas ofrecen vías prometedoras mediante estrategias de co-fermentación para la utilización de aguas residuales ganaderas y el consumo de nutrientes. En el futuro, la combinación de la filtración por membrana con los sistemas biológicos - en concreto, la interacción entre la ultrafiltración y las microalgas - desempeñará un papel central en la reutilización novedosa de las aguas residuales y la recuperación de nutrientes para el sector ganadero y avícola. Este enfoque holístico concuerda perfectamente con los principios de la economía circular, garantizando una gestión eficiente y eficaz de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, la materialización de estos beneficios a escala industrial requiere más estudios para facilitar la aplicación de estas tecnologías de vanguardia.

### **2.13. Referencias**

- Åkerman, M., Humalisto, N., Pitzen, S. 2020. Material politics in the circular economy: The complicated journey from manure surplus to resource. *Geoforum* 116:73-80. doi:10.1016/j.geoforum.2020.07.013.
- Amador-Castro, F., Rodriguez-Martinez, V., Carrillo-Nieves, D. 2020. Robust natural ultraviolet filters from marine ecosystems for the formulation of environmental friendlier bio-sunscreens. *Science of the Total Environment* 749:141576. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141576.
- Arévalo-Gallegos, A., Garcia-Perez, J.S., Carrillo-Nieves, D., Ramirez-Mendoza, R.A., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldívar, R. 2018. *Botryococcus braunii* as a bioreactor for the production of nanoparticles with antimicrobial potentialities. *International Journal of Nanomedicine* 13:5591–5604. doi:10.2147/IJN.S174205.

- Artukmetov, Z., Nasirov, B., Aliev, J., Kamolova, N. 2021. Composition of waste water from poultry factories and their suitability for irrigation of agricultural crops (as an example of Tashkent province, Uzbekistan). *E3S Web of Conferences* 244:01018. doi:10.1051/e3sconf/202124401018.
- Arya, A., Gupta, K., Chundawat, T.S., Vaya, D. 2018. Biogenic synthesis of copper and silver nanoparticles using green alga *Botryococcus braunii* and its antimicrobial activity. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2018:7879403. doi:10.1155/2018/7879403.
- Banet, T., Massey, M.S., Zohar, I., Litaor, M.I., Ippolito, J.A. 2020. Phosphorus removal from swine wastewater using aluminium-based water treatment residuals. *Resources, Conservation & Recycling: X* 6:100039. doi:10.1016/j.rcrx.2020.100039.
- Basavarajappa, P., Patil, S., Ganganagappa, N., Raghava, K., Raghu, A., Venkata, C. 2020. Recent progress in metal-doped TiO<sub>2</sub>, non-metal doped/codoped TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanostructured hybrids for enhanced photocatalysis. *International Journal of Hydrogen Energy* 45:7764-7778. doi:10.1016/j.ijhydene.2019.07.241.
- Bera, S.P., Godhaniya, M., Kothari, C. 2022. Emerging and advanced membrane technology for wastewater treatment: A review. *Journal of Basic Microbiology* 62:245–259. doi:10.1002/jobm.202100259.
- Chaudry, S. 2021. Integrating microalgae cultivation with wastewater treatment: A peek into economics. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 193:3395-3406. doi:10.1007/s12010-021-03612-x.
- Chen, W., Oldfield, T.L., Patsios, S.I., Holden, N.M. 2020. Hybrid life cycle assessment of agro-industrial wastewater valorisation. *Water Research* 170:115275. doi:10.1016/j.watres.2019.115275.
- Chen, F., Ma, J., Zhu, Y., Li, X., Yu, H., Sun, Y. 2022. Biodegradation performance and anti-fouling mechanism of an ICME/electro-biocarriers-MBR system in livestock wastewater (antibiotic-containing) treatment. *Journal of Hazardous Materials* 426:128064. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.128064.
- Cheng, P., Osei-Wusu, D., Zhou, C., Wang, Y., Xu, Z., Chang, T., Huo, S. 2019. The effects of refractory pollutants in swine wastewater on the growth of *Scenedesmus* sp.

- with biofilm attached culture. *International Journal of Phytoremediation* 22:241–250. doi:10.1080/15226514.2019.1658706.
- Cheng, H.H., Narindri, B., Chu, H., Whang, L.M. 2020a. Recent advancement on biological technologies and strategies for resource recovery from swine wastewater. *Bioresource Technology* 303:122861. doi:10.1016/j.biortech.2020.122861.
- Cheng, D., Ngo, H.H., Guo, W., Chang, S.W., Nguyen, D.D., Liu, Y., Wei, Q., Wei, D. 2020b. A critical review on antibiotics and hormones in swine wastewater: Water pollution problems and control approaches. *Journal of Hazardous Materials* 387:121682. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121682.
- Crini, G., Lichtfouse, E. 2019. Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment. *Environmental Chemistry Letters* 17:145-155. doi:10.1007/s10311-018-0785-9.
- Daba, G.M., Elnahas, M.O., Elkhateeb, W.A. 2021. Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 173:79-89. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.01.110.
- Daneshvar, E., Zarrinmehr, M.J., Koutra, E., Kornaros, M., Farhadian, O., Bhatnagar, A. 2019. Sequential cultivation of microalgae in raw and recycled dairy wastewater: Microalgal growth, wastewater treatment and biochemical composition. *Bioresource Technology* 273:556–564. doi:10.1016/j.biortech.2018.11.059.
- de Matos Nascimento, A., de Paula, V.R., Oliveira-Dias, E.H., da Costa-Carneiro, J., Otenio, M.H. 2020. Quantitative microbial risk assessment of occupational and public risks associated with bioaerosols generated during the application of dairy cattle wastewater as biofertilizer. *Science of the Total Environment* 745:140711. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140711.
- de Mendonça, H.V., Ometto, J.P.H.B., Otenio, M.H., Marques, I.P.R., dos Reis, A.J.D. 2018. Microalgae-mediated bioremediation and valorization of cattle wastewater previously digested in a hybrid anaerobic reactor using a photobioreactor: Comparison

- between batch and continuous operation. *Science of the Total Environment* 633:1–11. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.157.
- Domingues, E., Gomes, J., Quina, M., Quinta-Ferreira, R., Martins, R. 2018. Detoxification of olive mill wastewaters by Fenton's process. *Catalysts* 8:662. doi:10.3390/catal8120662.
- Domingues, E., Fernandes, E., Gomes, J., Martins, R.C. 2021. Advanced oxidation processes perspective regarding swine wastewater treatment. *Science of the Total Environment* 776:145958. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145958.
- FAO. 2021. Dairy market review: Overview of global dairy market developments in 2020. April 2021. FAO, Rome, Italy.
- Ferreira, A., Marques, P., Ribeiro, B., Assemany, P., de Mendonça, H.V., Barata, A., Oliveira, A.C., Reis, A., Pinheiro, H.M., Gouveia, L. 2018. Combining biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen. *Environmental Research* 164:32–38. doi:10.1016/j.envres.2018.02.007.
- Fuentes-Tristan, S., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H.M.N., Carrillo-Nieves, D. 2019. Bioinspired biomolecules: Mycosporine-like amino acids and scytonemin from *Lyngbya* sp. with UV-protection potentialities. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 201:111684. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111684.
- Garcia-Segura, S., Mostafa, E., Baltruschat, H. 2019. Electrogeneration of inorganic chloramines on boron-doped diamond anodes during electrochemical oxidation of ammonium chloride, urea and synthetic urine matrix. *Water Research* 160:107-117. doi:10.1016/j.watres.2019.05.046.
- Gomes, J., Frasson, D., Pereira, J., Gonçalves, F., Castro, L., Quinta-Ferreira, R., Martins, R. 2019. Ecotoxicity variation through parabens degradation by single and catalytic ozonation using volcanic rock. *Chemical Engineering Journal* 360:30-37. doi:10.1016/j.cej.2018.11.194.

- Goswami, K., Pugazhenthii, G. 2020. Treatment of poultry slaughterhouse wastewater using tubular microfiltration membrane with fly ash as key precursor. *Journal of Water Process Engineering* 37:101361. doi:10.1016/j.jwpe.2020.101361.
- Gradilla-Hernández, M.S., García-González, A., Gschaedler, A., Herrera-López, E.J., González-Avila, M., García-Gamboa, R., Yebra-Montes, C., Fuentes-Aguilar, R.Q. 2020. Applying differential neural networks to characterize microbial interactions in an ex vivo gastrointestinal gut simulator. *Processes*. 8:593. doi:10.3390/pr8050593.
- Hasan, M.N., Altaf, M.M., Khan, N.A., Kahn, A.H., Kahn, A.A., Ahmed, S., Kumar, P.S., Naushad, M., Rajapaksha, A.U., Iqbal, J., Tirth, V., Islam, S. 2021. Recent technologies for nutrient removal and recovery from wastewaters: A review. *Chemosphere* 130328:1-12. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.130328.
- Hasheminya, S.M., Mokarram, R.R., Ghanbarzadeh, B., Hamishekar, H., Kafil, H.S., Dehghannya, J. 2019. Development and characterization of biocomposite films made from kefiran, carboxymethyl cellulose and *Satureja Khuzestanica* essential oil. *Food Chemistry* 289:443-452. doi:10.1016/j.foodchem.2019.03.076.
- Hu, H., Li, X., Wu, S., Yang, C. 2020. Sustainable livestock wastewater treatment via phytoremediation: Current status and future perspectives. *Bioresource Technology* 315:123809. doi:10.1016/j.biortech.2020.123809.
- Huang, K.L., Wei, K.C., Chen, M.H., Ma, C.Y. 2018. Removal of organic and ammonium nitrogen pollutants in swine wastewater using electrochemical advanced oxidation. *International Journal of Electrochemical Science* 13:11418-11431. doi:10.20964/2018.12.32.
- Huang, K.L., Liu, C.C., Ma, C.Y., Chen, T.T. 2019. Effects of operating parameters on electrochemical treatment of swine wastewater. *International Journal of Electrochemical Science* 14:11325-11339. doi:10.20964/2019.12.43.
- Hülßen, T., Hsieh, K., Tait, S., Barry, E.M., Puyol, D., Batstone, D.J. 2018. White and infrared light continuous photobioreactors for resource recovery from poultry processing wastewater – A comparison. *Water Research* 144:665–676. doi:10.1016/j.watres.2018.07.040.

- Javed, F., Aslam, M., Rashid, N., Shamair, Z., Khan, A.L., Yasin, M., Fazal, T., Hafeez, A., Rehman, F., Rehman, M.S.U., Khan, Z., Iqbal, J., Bazmi, A.A. 2019. Microalgae-based biofuels, resource recovery and wastewater treatment: A pathway towards sustainable biorefinery. *Fuel* 255:115826. doi:10.1016/j.fuel.2019.115826.
- Kadir, W., Lam, M., Uemura, Y., Lim, J.W., Lee, K. 2018. Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review. *Energy Conversion and Management* 171:1416-1429. doi:10.1016/j.enconman.2018.06.074.
- Kang, J., Zhou, L., Duan, X., Sun, H., Wang, S. 2020. Catalytic degradation of antibiotics by metal-free catalysis over nitrogen-doped graphene. *Catalysis Today* 357:341-349. doi:10.1016/j.cattod.2018.12.002.
- Kavanagh, I., Fenton, O., Healy, M. G., Burchill, W., Lanigan, G. J., & Krol, D. J. 2021. Mitigating ammonia and greenhouse gas emissions from stored cattle slurry using agricultural waste, commercially available products and a chemical acidifier. *Journal of Cleaner Production*, 294(126251), 126251. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126251>
- Khalid, A.A.H., Yaakob, Z., Abdullah, S.R.S., Takriff, M.S. 2018. Growth improvement and metabolic profiling of native and commercial *Chlorella sorokiniana* strains acclimatized in recycled agricultural wastewater. *Bioresource Technology* 247:930-939. doi:/10.1016/j.biortech.2017.09.195.
- Khanal, G., Maraseni, T., Thapa, A., Devkota, N., Paudel, U.R., Khanal, C. K. 2023. Managing water scarcity via rainwater harvesting system in Kathmandu Valley, Nepal: People's awareness, implementation challenges and way forward. *Environmental Development* 46:100850. doi:10.1016/j.envdev.2023.100850.
- Khoo, K.S., Lee, S.Y., Ooi, C.W., Fu, X., Miao, X., Ling, T.C., Show, P.L. 2019. Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 288:121606. doi:10.1016/j.biortech.2019.121606.
- Korcz, V., Varga, L. 2021. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 110:375-384. doi:10.1016/j.tifs.2021.02.014.

- Koutra, E., Economou, C.N., Tsafrakidou, P., Kornaros, M. 2018. Bio-based products from microalgae cultivated in digestates. *Trends in Biotechnology* 36:819-833. doi:10.1016/j.tibtech.2018.02.015.
- Koyande, A.K., Chew, K.W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D.T., Show, P.L. 2019. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness* 8:16-24. doi:10.1016/j.fshw.2019.03.001.
- Kurup, G.G., Adhikari, B., Zisu, B. 2019. Recovery of proteins and lipids from dairy wastewater using food grade sodium lignosulphonate. *Water Resources and Industry* 22:100114. doi:10.1016/j.wri.2019.100114.
- Kwon, D., Bae, W., Kim, J. 2021. Hybrid forward osmosis/membrane distillation integrated with anaerobic fluidized bed bioreactor for advanced wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials* 404:124160. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124160.
- Lee, H., Jeong, D., Im, S.J., Jang, A. 2020. Optimization of alginate bead size immobilized with *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* for nutrient removal. *Bioresource Technology* 302:122891. doi:10.1016/j.biortech.2020.122891.
- Lee, K., Jepson, W. 2020. Drivers and barriers to urban water reuse: A systematic review. *Water Security* 11:100073. doi:10.1016/j.wasec.2020.100073.
- Li, X., Yang, W.L., He, H., Wu, S., Zhou, Q., Yang, C., Zeng, G., Luo, L., Lou, W. 2018. Responses of microalgae *Coelastrella* sp. to stress of cupric ions in treatment of anaerobically digested swine wastewater. *Bioresource Technology* 251:274–279. doi:10.1016/j.biortech.2017.12.058.
- Li, W., Ren, M., Duo, L., Li, J., Wang, S., Sun, Y., Li, M., Ren, W., Hou, Q., Yu, J., Sun, Z., Sun, T. 2020. Fermentation characteristics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from naturally fermented dairy products and screening of potential starter isolates. *Frontiers in Microbiology* 11:1794. doi:10.3389/fmicb.2020.01794.
- Liu, S., Qiu, D., Lu, F., Wang, Y., Wang, Z., Feng, X., Pyo, S.H. 2022. *Acorus calamus* L. constructed wetland-microbial fuel cell for Cr(VI)-containing wastewater treatment and bioelectricity production. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10:107801. doi:10.1016/j.jece.2022.107801.

- López-Pacheco, I.Y., Carrillo-Nieves, D., Salinas-Salazar, C., Silva-Núñez, A., Arévalo-Gallegos, A., Barceló, D., Afewerki, S., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldívar, R. 2019. Combination of nejayote and swine wastewater as a medium for *Arthrospira maxima* and *Chlorella vulgaris* production and wastewater treatment. *Science of the Total Environment* 676:356–367. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.04.278.
- López-Sánchez, A., Silva-Gálvez, A.L., González-López, M.E., Díaz-Vázquez, D., Orozco-Nunnelly, D.A., Novoa-Leiva, I., *et al.* 2023. Valorization of livestock waste through combined anaerobic digestion and microalgae-based treatment in México: A techno-economic analysis for distributed biogas generation, animal feed production, and carbon credits trading. *Environmental Technology & Innovation* 32:103321. doi:10.1016/j.eti.2023.103321.
- López-Sánchez, A., Silva-Gálvez, A.L., Zárata-Aranda, J.E., Yebra-Montes, C., Orozco-Nunnelly, D.A., Carrillo-Nieves, D., *et al.* 2022. Microalgae-mediated bioremediation of cattle, swine and poultry digestates using mono- and mixed-cultures coupled with an optimal mixture design. *Algal Research* 64:102717. doi:10.1016/j.algal.2022.102717.
- Lu, W., Asraful Alam, M., Liu, S., Xu, J., Parra Saldívar, R. 2019. Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO<sub>2</sub> from livestock farms: A review. *Science of the Total Environment* 716:135247. doi:/10.1016/j.scitotenv.2019.135247.
- Luo, L., Ren, H., Pei, X., Xi, G., Xing, D., Dai, Y., Ren, N., Liu, B. 2019. Simultaneous nutrition removal and high-efficiency biomass and lipid accumulation by microalgae using anaerobic digested effluent from cattle manure combined with municipal wastewater. *Biotechnology for Biofuels* 12:218. doi:10.1186/s13068-019-1553-1.
- Lv, J., Liu, Y., Feng, J., Liu, Q., Nan, F., Xie, S 2018. Nutrients removal from undiluted cattle farm wastewater by the two-stage process of microalgae-based wastewater treatment. *Bioresource Technology* 264:311-318. doi:10.1016/j.biortech.2018.05.085.
- Maaz, M., Yasin, M., Aslam, M., Kumar, G., Atabani, A.E., Idrees, M., Anjum, F., Jamil, F., Ahmad, R., Khan, A.L., Lesage, G., Heran, M., Kim, J. 2019. Anaerobic membrane bioreactors for wastewater treatment: Novel configurations, fouling control and energy

- considerations. *Bioresource Technology* 283:358-372. doi:10.1016/j.biortech.2019.03.061.
- Manasfi, R., Brienza, M., Ait-Mouheb, N., Montemurro, N., Perez, S., Chiron, S. 2021. Impact of long-term irrigation with municipal reclaimed wastewater on the uptake and degradation of organic contaminants in lettuce and leek. *Science of the Total Environment* 765:142742. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142742.
- Mansor, E.S., Ali, E.A., Shaban, A.M. 2021. Tight ultrafiltration polyethersulfone membrane for cheese whey wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal* 407:127175. doi:10.1016/j.cej.2020.127175.
- Mantovan, J., Bersaneti, G.T., Faria-Tischer, P.C.S., Celligoi, M.A.P.C., Mali, S. 2018. Use of microbial levan in edible films based on cassava starch. *Food Packaging and Shelf Life* 18:31-36. doi:10.1016/j.fpsl.2018.08.003.
- Martin, A.A., Sasaki, G.L., Sierakowski, M.R. 2020. Effect of adding galactomannans on some physical and chemical properties of hyaluronic acid. *International Journal of Biological Macromolecules* 144:527-535. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.114.
- Matiz-Villamil, A., Méndez-Carranza, K.J., Pascagaza-Pulido, A.F., Rendón-Rendón, T., Noriega-Noriega, J., Pulido-Villamarín, A. 2023. Trends in the management of organic swine farm waste by composting: A systematic review. *Heliyon* 9:e18208. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e18208.
- Moheimani, N.R., Vadiveloo, A., Ayre, J.M., Pluske, J.R. 2018. Nutritional profile and in vitro digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent. *Algal Research* 35:362-369. doi:10.1016/j.algal.2018.09.007.
- Moradi, Z., Kalanpour, N. 2019. Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications: a review. *Carbohydrate Polymers* 223:115100. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115100.
- Mora-Villalobos, J.A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., López-Gómez, J.P. 2020. Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation* 6:23. doi:10.3390/fermentation6010023.

- Nagarajan, D., Lee, D.J., Chen, C.Y., Chang, J.S. 2020. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. *Bioresource Technology* 302:122817. doi:10.1016/j.biortech.2020.122817.
- Niquice-Janeiro, C. Marques-Arsenio, A., Brito, R.M.C.L., van Lier, J.B. 2020. Use of (partially) treated municipal wastewater in irrigated agriculture; potentials and constraints for sub-Saharan Africa. *Physics and Chemistry of the Earth* 118–119:102906. doi:10.1016/j.pce.2020.102906.
- Obotey-Ezugbe, E., Rathilal, S. 2020. Membrane technologies in wastewater treatment: A review. *Membranes* 10:89. doi:10.3390/membranes10050089.
- Oliveira, J.F., Fia, R., Fia, F.R.L., Rodrigues, F.N., Matos, M.P., Siniscalchi, L.A.B. 2020. Principal component analysis as a criterion for monitoring variable organic load of swine wastewater in integrated biological reactors UASB, SABF and HSSF-CW. *Journal of Environmental Management* 262:110386. doi:10.1016/j.jenvman.2020.110386.
- Orfanoudaki, M., Hartmann, A., Karsten, U., Ganzera, M. 2018. Chemical profiling of mycosporine-like amino acids in twenty-three red algal species. *Journal of Phycology* 55:393-403. doi:10.1111/jpy.12827.
- Oueslati, A., Montevecchi, G., Antonelli, A., Mansour, H.B. 2021. Short-time irrigation on young olive tree (*Olea europaea* L. cv. *Chemlali*) with untreated industrial poultry wastewater: investigation of growth parameters and leaves chemical composition. *Environmental Science and Pollution Research International* 28:50420–50429. doi:10.1007/s11356-021-14261-2.
- Pacheco, D. Rocha, A.C., Pereira, L., Verdelhos, T. 2020. Microalgae water bioremediation: Trends and hot topics. *Applied Sciences* 10:1886. doi:10.3390/app10051886.
- Park, J., Shin, D., Lee, J. 2019. Treatment of high-strength animal industrial wastewater using photo-assisted Fenton oxidation coupled to photocatalytic technology. *Water* 11:1553. doi:10.3390/w11081553.

- Patwa, N., Sivarajah, U., Seetharaman, A., Sarkar, S., Maiti, K., Hingorani, K. 2021. Towards a circular economy: An emerging economies context. *Journal of Business Research* 122:725-735. doi:10.1016/j.jbusres.2020.05.015.
- Pekkoh, J., Chaichana, C., Thurakit, T., Phinyo, K., Lomakool, S., Ruangrit, K., Duangjan, K., Suwannarach, N., Kumla, J., Cheirsilp, B., Srinuanpan, S. 2022. Dual-bioaugmentation strategy to enhance the formation of algal-bacteria symbiosis biofloc in aquaculture wastewater supplemented with agricultural wastes as an alternative nutrient sources and biomass support materials. *Bioresource Technology* 359:127469. doi:10.1016/j.biortech.2022.127469.
- Poh, Z.L., Kadir, W.N.A., Lam, M.K., Uemura, Y., Suparmaniam, U., Lim, J.W., Show, P.L., Lee, K.T. 2020. The effect of stress environment towards lipid accumulation in microalgae after harvesting. *Renewable Energy* 154:1083-1091. doi:10.1016/j.renene.2020.03.081.
- Prybylski, N., Toucheteau, C., El Alaoui, H., Bridiau, N., Maugard, T., Abdelkafi, S., Fendri, I., Delattre, C., Dubessay, P., Pierre, G., Michaud, P. 2020. Bioactive polysaccharides from microalgae. p. 533-571. In Jacob-Lopes, E., Manzoni-Maroneze, M., Queiroz, M.I., Queiroz-Zepka, L. (eds.) *Handbook of microalgae-based processes and products*. Academic Press, Cambridge, MA, USA. doi:10.1016/b978-0-12-818536-0.00020-8.
- Pugazhendhi, A., Prabakar, D., Jacob, J.M., Karuppusamy, I., Saratale, R.G. 2018. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Gelidium amansii* and its antimicrobial property against various pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis* 114:41–45. doi:10.1016/j.micpath.2017.11.013.
- Quan, X., Huang, K., Li, M., Lan, M., Li, B. 2018. Nitrogen removal performance of municipal reverse osmosis concentrate with low C/N ratio by membrane-aerated biofilm reactor. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 12:5. doi:10.1007/s11783-018-1047-6.
- Rekhate, C., Srivastava, J.K. 2020. Recent advances in ozone-based advanced oxidation processes for treatment of wastewater- A review. *Chemical Engineering Journal Advances* 3:100031. doi:10.1016/j.ceja.2020.100031.

- Robles, A., Aguado, D., Barat, R., Borrás, L., Bouzas, A., Gimenez, J.B., Martí, N., Ribes, J., Ruano, M.V., Serralta, J., Ferrer, J., Seco, A. 2020. New frontiers from removal to recycling of nitrogen and phosphorus from wastewater in the circular economy. *Bioresource Technology* 300:122673. doi:10.1016/j.biortech.2019.122673.
- Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Shahryari, S., Kharazmi, M.S., Jafari, S.M. 2022. Food applications of probiotic yeasts; focusing on their techno-functional, postbiotic and protective capabilities. *Trends in Food Science & Technology* 128:278-295. doi:10.1016/j.tifs.2022.08.018.
- Sarawaneeyaruk, S., Lorliam, W., Krajangsang, S., Pringsulaka, O. 2019. Enhancing plant growth under municipal wastewater irrigation by plant growth promoting rhizospheric *Bacillus* spp. *Journal of King Saud University - Science* 31:384-389. doi:10.1016/j.jksus.2018.04.027.
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., Abd Allah, E.F. 2019. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26:709–722. doi:10.1016/j.sjbs.2017.11.003.
- Shen, J., Wang, C., Liu, Y., Hu, C., Xin, Y., Ding, N., Su, S. 2018. Effect of ultrasonic pretreatment of the dairy manure on the electricity generation of microbial fuel cell. *Biochemical Engineering Journal* 129:44–49. doi:10.1016/j.bej.2017.10.013.
- Singh, G., Patidar, S.K. 2018. Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management* 217:499–508. doi:10.1016/j.jenvman.2018.04.010.
- Sutherland, D.L., Ralph, P.J. 2019. Microalgal bioremediation of emerging contaminants - opportunities and challenges. *Water Research* 164:114921. doi:10.1016/j.watres.2019.114921.
- Thapa, A., Khanal, G., Mahapatra, S.K., Devkota, N., Mahato, S., Paudel, U.R. 2022. Identifying determinants of sustainable water management at the household level through rainwater harvesting systems in Nepal. *Water Policy* 24:1676–1691. doi:10.2166/wp.2022.113.

- Tsai, W.T. 2018. Regulatory promotion and benefit analysis of biogas-power and biogas-digestate from anaerobic digestion in Taiwan's livestock industry. *Fermentation* 4:57 doi:10.3390/fermentation4030057.
- Unfried, K., Kis-Katos, K., Poser, T. 2022. Water scarcity and social conflict. *Journal of Environmental Economics and Management* 113:102633. doi:10.1016/j.jeem.2022.102633.
- Vaishnav, S., Saini, T., Chauhan, A., Gaur, G.K., Tiwari, R., Dutt, T., Tarafdar, A. 2023. Livestock and poultry farm wastewater treatment and its valorization for generating value-added products: Recent updates and way forward. *Bioresource Technology* 382:129170. doi:10.1016/j.biortech.2023.129170.
- Vasmara, C., Marchetti, R., Carminati, D. 2021. Wastewater from the production of lactic acid bacteria as feedstock in anaerobic digestion. *Energy* 229:120740. doi:10.1016/j.energy.2021.120740.
- Xie, W., Chen, Q.F., Wu, L., Yang, H., Xu, J., Zhang, Y. 2020. Coastal saline soil aggregate formation and salt distribution are affected by straw and nitrogen application: A 4-year field study. *Soil and Tillage Research* 198:104535. doi:10.1016/j.still.2019.104535.
- Yaashikaa, P.R., Kumar, P.S., Varjani, S. 2022. Valorization of agro-industrial wastes for biorefinery process and circular bioeconomy: A critical review. *Bioresource Technology* 343:126126. doi:10.1016/j.biortech.2021.126126.
- Yildiz, H., Karatas, N. 2018. Microbial exopolysaccharides: resources and bioactive properties. *Process Biochemistry* 72:41-46. doi:10.1016/j.procbio.2018.06.009.
- Zanella, L., Vianello, F. 2020. Microalgae of the genus *Nannochloropsis*: Chemical composition and functional implications for human nutrition. *Journal of Functional Foods* 68:103919. doi:10.1016/j.jff.2020.103919.
- Zhang, X., Lin, H., Hu, B. 2018. The effects of electrocoagulation on phosphorus removal and particle settling capability in swine manure. *Separation and Purification Technology* 200:112-119. doi:10.1016/j.seppur.2018.02.025.

- Zhang, C., Li, S., Ho, S.H. 2021. Converting nitrogen and phosphorus wastewater into bioenergy using microalgae-bacteria consortia: A critical review. *Bioresource Technology* 342:126056. doi:10.1016/j.biortech.2021.126056.
- Zhao, H. Tian, C., Mei, J., Wong, P.K. 2020. Synergistic effect and mechanism of catalytic degradation toward antibiotic contaminants by amorphous goethite nanoparticles decorated graphitic carbon nitride. *Chemical Engineering Journal* 390:124551. doi:10.1016/j.cej.2020.124551.
- Zhao, T., Tashiro, Y., Sonomoto, K. 2022. Construction and metabolic analysis of acetone-butanol-ethanol fermentation using mixed acetic acid and lactic acid in wastewater. *Industrial Crops and Products* 187:115503. doi:10.1016/j.indcrop.2022.115503.
- Zheng, T., Li, P., Ma, X., Sun, X., Wu, C., Wang, Q., Gao, M. 2019. Pilot-scale experiments on multilevel contact oxidation treatment of poultry farm wastewater using saran lock carriers under different operation model. *Journal of Environmental Sciences (China)* 77:336–345. doi:10.1016/j.jes.2018.09.005.
- Zhong, Y., Liu, H., Li, H., Lu, Q., Sun, Y. 2021. Does exogenous carbon source always promote algal biomass and nutrients removal in algal-bacterial wastewater remediation? *Journal of Cleaner Production* 281:125371. doi:10.1016/j.jclepro.2020.125371.
- Zhou, Q., Feng, F., Yang, Y., Zhao, F., Du, R., Zhou, Z., Han, Y. 2018. Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. *International Journal of Biological Macromolecules* 107:2234-2241. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.098.
- Zhou, Q., Lin, Y., Yang, C., Tang, W., Wu, S., Li, D., Lou, W. 2019. Effects of copper ions on removal of nutrients from swine wastewater and on release of dissolved organic matter in duckweed systems. *Water Research* 158: 171-181. doi:10.1016/j.watres.2019.04.036.
- Zou, F., Huo, Y., Gao, W., Dai, M., Zhao, G., & Zhang, S. (2024). Physicochemical, microbiological and sensory characterization of yogurt fermented by *Weissella confusa*

SW1 and traditional starters. Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology], 201(116229), 116229.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116229>

## **CAPÍTULO III: Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas provenientes de matrices antárticas**

### **Resumen**

La Antártida presenta unas condiciones ambientales únicas y extremas, en las que los microorganismos sobreviven gracias a su adaptación a condiciones hostiles. Sin embargo, se carece de información científica sobre diversos microorganismos, entre otras, de las bacterias lácticas, de ese continente. En este estudio se identificaron bacterias lácticas de 27 matrices ambientales, incluyendo mamíferos, plantas, pingüinos y peces mediante métodos bioquímicos y moleculares. Se aislaron e identificaron 32 cepas mediante el kit API 50CH y la secuenciación del ARNr 16S. Las cepas identificadas por métodos bioquímicos fueron *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Weissella confusa*. Por otro lado, las especies identificadas por métodos moleculares fueron *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Weissella confusa*. La especie con mayor frecuencia detectada y ensamblaje total de secuencias fue *Weissella confusa*, a la que se realizaron pruebas de resistencia ambiental. Esta cepa mostró un crecimiento a 25-35°C, 2-4% NaCl, pH inicial de 6,0-7,0 y una hidrofobicidad superior a 50%. Estas características hacen de *Weissella confusa* un candidato prometedor para la remediación biológica de suelos y aguas residuales.

Palabras clave: Caracterización bioquímica, hidrofobicidad superficial, resistencia al estrés, secuenciación molecular, *Weissella confusa*.

### **3.1 Introducción**

La Antártida es el continente más frío, seco y ventoso del mundo (Shivaji *et al.*, 2017) y posee un ecosistema extremo con escasez de vegetación, lo que hace que los organismos desarrollen mecanismos especiales de adaptación bioquímica para sobrevivir a bajas temperaturas con ciclos de congelación-descongelación, condiciones

de luz subóptimas, altas dosis de radiación UV-B y baja humedad. Según Krishnan *et al.* (2016), entre las formas de vida con mayor capacidad de adaptación destacan los microorganismos.

La investigación sobre bacterias de la Antártida ha ido en aumento en los últimos años, centrada principalmente en nuevos microorganismos con potencial biotecnológico (Zucconi *et al.*, 2025). Por ejemplo, hay enzimas de bacterias antárticas que se han utilizado en la desfosforilación, la degradación de bifenilos policlorados y en la producción de biodiésel y lipasas (Sathyanarayana Reddy *et al.*, 2016; Gran-Scheuch *et al.*, 2017; Shivaji *et al.*, 2017). Hasta ahora, la literatura sobre el aislamiento de bacterias de ácido láctico (BAL), generalmente reconocidas como seguras o «GRAS» (Hang *et al.*, 2019), de diferentes matrices en la Antártida es escasa. Las BAL son inocuas, amigables con el ecosistema y se aplican en diversos procesos debido a su alta capacidad de adaptación (Mollea *et al.*, 2013; Vasmara *et al.*, 2021). Estas han sido utilizadas en diferentes áreas productivas, participando en procesos biotecnológicos y ambientales (Gou *et al.*, 2019; Mora-Villalobos *et al.*, 2020; Korcz y Varga, 2021).

La búsqueda y caracterización de BAL antárticas puede contribuir a desarrollar nuevos retos científicos, especialmente porque la Antártida es un laboratorio natural con características especiales, y con apenas unos pocos estudios sistemáticos de aislamiento de este tipo de microorganismos. El objetivo de este estudio fue caracterizar bacterias lácticas antárticas a partir de diversas matrices ambientales y evaluar su potencial uso en aplicaciones de remediación ambiental en condiciones inusuales.

Existen estudios que demuestran la efectividad de las BAL en aguas residuales agrícolas, donde ha quedado en evidencia su capacidad para favorecer la recuperación de nutrientes (Chrysanthopoulos *et al.*, 2024). La valorización de los subproductos agroindustriales es una solución viable para reutilizar su contenido nutricional y reducir el consumo de recursos (Kavanagh *et al.*, 2021).

La bioacidificación de purines animales, ha sido abordado en estudios previos (Prado *et al.*, 2020; Kavanagh *et al.*, 2021; Gioelli *et al.*, 2022). Se ha puesto especial atención al impacto de aditivos alternativos para lograr modificar el pH de los purines y con esto lograr la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y amoníaco (NH<sub>3</sub>). El suero de queso, ha mostrado resultados prometedores en la reducción de emisiones de NH<sub>3</sub> (58-90%) (Gioelli *et al.*, 2022; Prado *et al.*, 2020). Otros estudios han evaluado la posibilidad de utilizar residuos agrícolas para la bioacidificación de purines (Regueiro *et al.*, 2022), enriqueciendo esta agua residual con nutrientes. Por ejemplo, en el trabajo de Prado *et al.* (2020), la adición de salvado de arroz al purín aumentó su contenido de magnesio en un 33%. El rol tecnológico de las BAL se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, debido a sus capacidades de producir metabolitos y biomasa con interés comercial, además de sus cualidades benéficas e inocuas (Ferrer *et al.*, 2015). Las BAL presentan potencial para la recuperar nutrientes en purines de cerdo, lo que puede contribuir a mejorar la sostenibilidad agrícola. Estas bacterias han demostrado ser eficaces en la mejora de la productividad y en el control biológico de cultivos (Abdul *et al.*, 2022). Su capacidad para inhibir microorganismos patógenos y promover el crecimiento de las plantas las convierte en alternativas viables para su uso en lugar de fertilizantes inorgánicos (Akpogheli *et al.*, 2025). Además, su acción en el metabolismo de carbohidratos permite la producción de ácido láctico, un subproducto que no solo mejora la calidad de los alimentos, sino que también puede utilizarse para enriquecer los purines con nutrientes (Sánchez-Pascuala *et al.*, 2017; Anumudu *et al.*, 2024). La capacidad de las BAL para metabolizar carbohidratos y producir compuestos beneficiosos también es crucial para su aplicación en la recuperación de nutrientes. A través de sus rutas metabólicas, como la glucólisis y la fermentación, estas bacterias pueden transformar sustratos complejos en nutrientes biodisponibles, aumentando así el valor agronómico de los purines (Wang *et al.*, 2021b; Zhao *et al.*, 2023). Esto contribuye a una agricultura más sostenible y al favorecimiento de la economía circular al reutilizar residuos en la producción agrícola.

Estos mecanismos son relevantes para las variables que esta tesis evalúa experimentalmente, al establecer un vínculo entre la capacidad de las BAL para adaptarse a condiciones extremas y su funcionalidad en la recuperación de nutrientes en ambientes distintos a su nicho ecológico.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1. Muestreo

Se recogieron muestras de pingüinos, peces y del medio ambiente en la isla Rey Jorge del archipiélago de las Shetland del Sur durante la Expedición Científica Antártica (ECA) 56 en enero 2020. Los lugares de muestreo se muestran en la Figura 3.1.

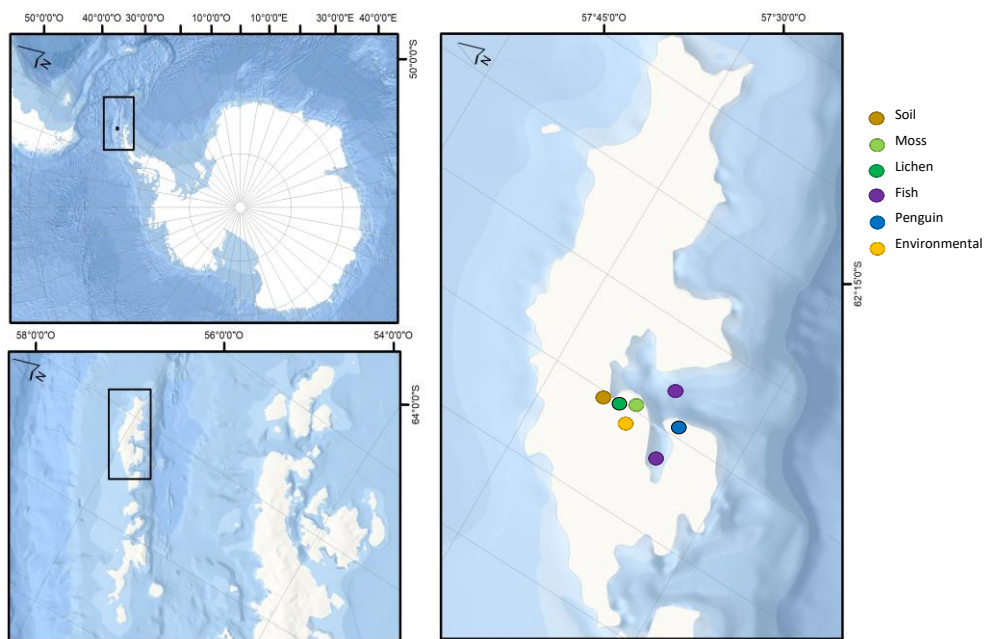


Figura 3.1. Localización de las zonas muestreadas.

Para el muestreo de pingüinos, el protocolo bioético se llevó a cabo utilizando una red de malla y los animales fueron liberados cuidadosamente de la red y colocados en el regazo del manipulador mirando hacia delante. Se les cubrieron los ojos con un paño negro y se les sujetó suavemente el pico y las alas, mientras se tomaban muestras de la boca, las alas, la cloaca y las heces, todo ello con una tórula estéril, y luego se almacenaron en

tubos que contenían 4 mL de solución salina fisiológica estéril (0,9%) (Olivares *et al.*, 2019). En el caso de los peces, se les administró una dosis letal de 1 mL/L de 2-fenoxietanol y se les practicó la eutanasia mediante seccionamiento medular antes de la extracción de tejidos de acuerdo a los protocolos bioéticos establecidos (Vargas-Chacoff *et al.*, 2016); posteriormente fueron disecados asépticamente para recolectar muestras de branquias, estómago, intestino, además de una muestra superficial de escamas (Etyemez y Balcazar, 2016). Estas muestras se almacenaron en tubos con 4 mL de solución salina fisiológica estéril (0,9%). Para las muestras ambientales, es decir, heces de mamíferos y aves antárticas, se recogieron muestras de 0,5 g de heces y se introdujeron en tubos de 15 mL que contenían 4 mL de solución salina fisiológica estéril (0,9%) (Olivares *et al.*, 2019). Para las muestras de suelo, musgos y líquenes, se realizó el protocolo descrito por Franzmann *et al.* (1991). Las muestras se almacenaron en bolsas estériles utilizando guantes quirúrgicos.

De cada muestra, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L, se colocó en un tubo de tapón de rosca de 15 mL que contenía 4 mL de medio Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Alemania) y se cultivó a 37 °C por 48 horas, para favorecer el crecimiento de las cepas de BAL. Antes de transportarlas al laboratorio, las suspensiones microbianas se centrifugaron a 9.500 rpm durante 10 min a 4 °C; cada cepa se almacenó a -20 °C en tubos Eppendorf con un medio de Extracto Lácteo de Levadura de 1,5 mL (Franzmann *et al.*, 1991; Isas *et al.*, 2023). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

### **3.2.2. Aislamiento**

Las cepas se aislaron siguiendo el protocolo descrito por Ketema *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Se seleccionaron colonias únicas, morfológicamente distintas, asignando un número a cada cepa. Las cepas se cultivaron durante 24 h en tubos de tapón de rosca de 15 mL con 4 mL de medio MRS a 37°C. Como control negativo se utilizó medio MRS esterilizado. La suspensión microbiana se centrifugó a 9.500 rpm, 4°C durante 10 minutos y se lavó con una solución salina fisiológica estéril (0,9%) para eliminar los restos de MRS. A continuación, los pellets celulares se resuspendieron en el

mismo volumen de medio MRS, se incubaron durante 18 h a 37°C, se centrifugaron y se lavaron nuevamente con la solución salina fisiológica. Todas las muestras se aislaron en triplicado.

Antes de aplicar las pruebas de caracterización e identificación, las cepas se activaron según el protocolo de Fernández *et al.* (2003). La densidad óptica de las muestras se ajustó a un valor de absorbancia entre 0,5 y 0,599 a 600 nm utilizando el espectrofotómetro Spectroquant® Prove 600 (Merck) para obtener concentraciones microbianas similares para todas las cepas.

### **3.2.3. Caracterización bioquímica**

La actividad de catalasa, la tinción de Gram, la producción de peróxido de hidrógeno y las pruebas de gluconato se realizaron de acuerdo con los procedimientos reportados por Lee *et al.* (2023), Axelsson (2004), García *et al.*, (2009) y Domingos-Lopes *et al.* (2017). Todas las pruebas se realizaron en triplicado, utilizando como control negativo medio MRS esterilizado y una cepa de *Lactobacillus plantarum* como control positivo. Se utilizó el kit API 50 CH (bioMérieux, Inc., Marcy l'Étoile, Francia) para caracterizar las BAL según el metabolismo específico de fermentación de azúcares. Las galerías inoculadas se incubaron a 37°C durante 48 h y, a continuación, se examinaron para comprobar si se producía un cambio de color de púrpura a amarillo (por disminución de pH), lo que indicaba un resultado positivo. Los resultados se registraron e interpretaron, utilizando la base de datos del software de identificación apiweb™ (<https://apiweb.biomerieux.com>). La elección de realizar pruebas a 37°C en el análisis bioquímico de bacterias ácido-lácticas, se justifica por la estandarización de los métodos de laboratorio y la optimización del crecimiento bacteriano. Esta temperatura es considerada óptima para muchas especies, lo que favorece el crecimiento y la actividad metabólica de estas bacterias. Investigaciones recientes, como las de Kowsalya *et al.* (2022) y Madushanka *et al.* (2025), han confirmado que 37°C es la temperatura comúnmente utilizada en microbiología para evaluar las capacidades fermentativas y bioquímicas de las bacterias ácido-lácticas. Estas condiciones permiten obtener resultados más consistentes y comparables entre

diferentes cepas y estudios, lo que es fundamental para la caracterización de estas bacterias.

#### **3.2.4. Secuenciación e identificación**

El protocolo de secuenciación se basó en la metodología de Weisburg *et al.* (1991). Para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S, se utilizaron los cebadores 27F: AGAGTGTGATCMTGGCTCAG y 1492R: GGYTACCTTGTTACGACTT, que generaron un producto de aproximadamente 1.400 pares de bases (pb), aplicando este parámetro como criterio de calidad. Como cepa control se añadió a la secuenciación una cepa de *Lactobacillus plantarum*. Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% durante 3-5 horas para separarlos completamente y cortar las bandas. Posteriormente, se purificaron las bandas y se realizaron cuatro reacciones de secuenciación con los cebadores 27F, 515F, 800R y 1492R que cubrían completamente el gen de la bacteria aislada. Los archivos de secuencias obtenidos se visualizaron, editaron y ensamblaron utilizando el visor de trazas Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd) y el software BioEdit ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)).

De los aislados bacterianos secuenciados de las especies detectadas con mayor frecuencia y con ensamblaje de secuencia completo, se eligieron tres cepas de diferentes matrices para realizar pruebas de resistencia ambiental.

#### **3.2.5. Hidrofobicidad de la superficie celular (HCS)**

Este parámetro se determinó según la metodología descrita por Sirichokohatchawan *et al.* (2018), utilizando la adhesión microbiana a hidrocarburos (MATH) para evaluar la hidrofobicidad de la superficie celular. Las cepas de BAL se centrifugaron a 4°C y 3.000 rpm durante 10 min y se lavaron con tampón fosfato de 0,1M (pH 7,2), repitiendo este procedimiento dos veces, y se resuspendieron en tampón fosfato hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0,6 (tiempo 0). Posteriormente, se añadió 1 mL de xileno, tolueno y hexadecano, respectivamente, a 3 mL de suspensión bacteriana. Se

mezcló durante 90 segundos a 3.000 rpm utilizando un vórtex y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se recogió la fase acuosa de los sistemas bifásicos para medir la DO a 600 nm utilizando el espectrofotómetro Spectroquant® Prove 600 (Merck) (tiempo 1). El ensayo se realizó por triplicado.

*Ecuación para calcular hidrofobicidad*

$$HSC(\%) = \frac{OD_{600,T0} - OD_{600,T1}}{OD_{600,T0}} * 100 \quad (3.1)$$

Donde:

OD<sub>600,T0</sub> = Absorbancia en el tiempo 0.

OD<sub>600,T1</sub> = Absorbancia en el tiempo 1.

Para definir las características hidrofóbicas, se dividieron las cepas en tres categorías: cepas con hidrofobicidad alta (71 a 100%), media (36 a 70%) y baja (0 a 35%) (García *et al.*, 2009).

La metodología de adhesión microbiana a hidrocarburos (MATH) utilizada para evaluar la hidrofobicidad de la superficie celular es un enfoque eficaz y sensible para cuantificar este parámetro en cepas de bacterias ácido-lácticas. La sensibilidad del método se debe a su capacidad para detectar cambios en la absorbancia que reflejan la capacidad de las bacterias para interactuar con diferentes hidrocarburos, lo que permite clasificar las cepas según su hidrofobicidad. La precisión del método puede verse influenciada por factores como la concentración celular, la temperatura y el tipo de hidrocarburo utilizado. Se han reportado diferentes niveles de hidrofobicidad para cepas de bacterias ácido-lácticas. Para este caso se utilizó como control la cepa *Lactobacillus plantarum* que ha mostrado hidrofobicidad alta, con valores que oscilan entre el 70% y el 90% (Niu *et al.*, 2025). Esta cepa es frecuentemente utilizada como control en estudios de hidrofobicidad debido a su capacidad bien documentada para adherirse a superficies y formar biopelículas, lo que la hace relevante en aplicaciones industriales.

Para el análisis estadístico de los resultados, en primera instancia se realizó un test de Shapiro Willks para determinar el tipo de distribución que presentaban los datos y posteriormente se realizó el análisis de varianza y test de Tukey para muestras con distribución normal; y, por otro lado, se aplicó el test de Kruskall Wallis y U de Mann Whitney para variables no paramétricas, utilizando el software SPSS versión 29.0.2.0. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ . Todas las mediciones se realizaron en triplicado.

### **3.2.6. Resistencia al calor, al NaCl y al pH**

Los ensayos para determinar el efecto de diferentes condiciones ambientales sobre el crecimiento bacteriano se realizaron según Thayer *et al.* (1987), con modificaciones que se detallan a continuación. Como cepa control se utilizó la cepa LP-87. Esta cepa corresponde a *Pediococcus acidilactici* y ya ha sido previamente utilizada en otras investigaciones (Patente WO 2012088621, <http://www.google.com/patents/WO2012088>).

Para determinar la resistencia al calor, las cepas se cultivaron en tubos de ensayo con medio MRS a pH 5,7 y se incubaron a 5, 15, 25, 35 y 45°C durante 120 h en un horno Memmert UFB. Cada 24 h se realizaron mediciones del pH y de la DO expresada como absorbancia (ABS) a 500 nm. Para el análisis estadístico de los resultados, en primera instancia se realizó un test de Shapiro Willks para determinar el tipo de distribución de los datos y posteriormente se realizó el análisis de varianza y test de Tukey para muestras con una distribución normal; y, por otro lado, se aplicó el test de Kruskall Wallis y U de Mann Whitney para variables no paramétricas, utilizando el software SPSS versión 29.0.2.0. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ . Para el análisis de la resistencia al calor de *Weissella confusa*, se utilizaron diferentes temperaturas como criterio de comparación. Este enfoque nos ayudó a identificar cuál es la temperatura óptima para su crecimiento y actividad, así como a evaluar su viabilidad y producción de metabolitos en función de las variaciones térmicas.

Para evaluar la resistencia al NaCl, las cepas se cultivaron en el medio MRS a pH 5,7 utilizando concentraciones de NaCl del 2, 4, 6, 8 y 10 % (p/v) y se incubaron a 37°C durante 120 h. Cada 24 h se realizaron mediciones del pH y de la DO expresada como absorbancia (ABS) a 500 nm. En cuanto al análisis de los resultados, primero se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar el tipo de distribución de los datos. A partir de ahí, se utilizó el análisis de varianza y el test de Tukey para aquellos conjuntos de datos que presentaban una distribución normal. En el caso de las variables no paramétricas, se optó por la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney. Todo este análisis se llevó a cabo utilizando el software SPSS versión 29.0.2.0, y se desarrolló con un nivel de significancia estadística de  $p < 0,05$ . De este modo, se pudo determinar la resistencia al NaCl de las cepas evaluadas. Como cepas tolerantes al NaCl se definieron aquellas que muestran un crecimiento en altas concentraciones de NaCl y como cepas sensibles se consideraron aquellas que presentan una disminución significativa en el crecimiento con la concentración de NaCl.

En la prueba de resistencia al pH, las cepas se cultivaron en el medio MRS ajustando los valores iniciales de pH con ácido láctico a 4, 5, 6 y 7 y se incubaron a 35°C durante 120 h. Cada 24 h se realizaron mediciones del pH y de la DO expresada como absorbancia (ABS) a 500 nm. Para el análisis estadístico de los resultados, en primera instancia se realizó el test de Shapiro Willks para determinar el tipo de distribución que presentaban los datos y posteriormente se realizó el análisis de varianza y test de Tukey para muestras con distribución normal; y, por otro lado, se aplicó el test de Kruskall Wallis y U de Mann Whitney para variables no paramétricas, utilizando el software SPSS versión 29.0.2.0.

### **3.2.7. Análisis estadístico y tratamiento de datos**

Las pruebas se realizaron por triplicado para cada tratamiento. En todos los casos, los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE), y se consideraron diferencias significativas cuando  $p < 0,05$  con un intervalo de confianza del 95 %. Para los datos no paramétricos, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. En caso de las diferencias significativas para la hidrofobicidad se aplicó test de Tukey. Para el análisis

de los datos se realizó una rutina de programación utilizando el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS; IBM, Corporation, Armonk, NY, EE. UU.) versión 29.0.2.0.

### 3.3. Resultados y discusión

#### 3.3.1. Muestreo

El muestreo se llevó a cabo en varios lugares de la isla Rey Jorge, y se recogieron un total de 27 muestras, como se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Muestras recogidas provenientes de diferentes matrices en la isla Rey Jorge.

Matriz		Tipo de muestra		Cantidad	Coordenada
Ambiental	Animal*	Mamíferos	Pinnípedo**	3	21E 0395894 UTM 3101502
			Lobo fino antártico ( <i>Arctophoca gazella</i> )	1	21E 0398915 UTM 3106637
			Foca de Wedell ( <i>Leptonychotes weddellii</i> )	4	21E 0399110 UTM 3106939
			Elefante marino ( <i>Mirounga leonina</i> )	3	21E 0398915 UTM 3106637
		Aves	Pingüino ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	2	21E 0400317 UTM 3100808
			Skua grande ( <i>Stercorarius skua</i> )	2	21E 0396243 UTM 3102180
			Petrel antártico ( <i>Thalassoica antárctica</i> )	1	21E 0400287 UTM 3100467

Tabla 3.1 (continuación)					
	Vegetal		Musgo	1	21E 0399010 UTM 3107213
			Líquén ( <i>Usnea aurantiaco-atra</i> )	1	21E 0400257 UTM 3100462
			Suelo	1	21E 0400257 UTM 3100462
Pingüino	Barbijo ( <i>Pygoscelis antarctica</i> )	Polluelo	Cloaca	1	21E 0400317 UTM 3100808
	Adelia ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	Polluelo	Cloaca	1	21E 0400317 UTM 3100808
	Papúa ( <i>Pygoscelis papua</i> )	Adulto	Ala	1	21E 0400317 UTM 3100808
		Polluelo	Cloaca	1	21E 0400317 UTM 3100808
Pez	<i>Notothenia rossii</i>		Agalla	2	21E 0400424 UTM 3100924
			Intestino	1	21E 0400424 UTM 3100924
	<i>Harpagifer</i>		Intestino	1	21E 0398122 UTM 3101089

\*Las muestras de origen animal corresponden a heces frescas. \*\*Las muestras de heces encontradas, a las que no se pudo atribuir ninguna especie, se denominaron Pinnípedos.

### 3.3.2. Aislamiento

A partir de las 27 muestras recuperadas de diversas matrices ambientales, se obtuvieron 32 aislados bacterianos diferenciados por morfología. La Tabla 3.2 muestra los aislados bacterianos obtenidos de las muestras seleccionadas.

Tabla 3.2. Aislados bacterianos seleccionados.

N°	ID cepa	Matriz	Muestra
1	4	Ambiental-mamífero	Pinnípedo
2	5	Ambiental-mamífero	Pinnípedo
3	11	Ambiental-ave	Skúa grande
4	12	Ambiental-ave	Skúa grande
5	14	Ambiental-mamífero	Pinnípedo
6	16	Ambiental-mamífero	Pinnípedo
7	17	Ambiental-mamífero	Pinnípedo
8	19	Pingüino	Adelia-cloaca
9	23	Pingüino	Papúa-cloaca
10	25	Ambiental-ave	Petrel antártico
11	38	Ambiental-ave	Pingüino-adelia
12	43	Ambiental-ave	Petrel antártico
13	47	Pingüino	Papúa-ala
14	51	Ambiental-ave	Pingüino-Adelia
15	54	Ambiental-mamífero	Lobo fino antártico
16	55	Ambiental-mamífero	Elefante marino
17	57	Ambiental-ave	Skua grande
18	58	Ambiental-mamífero	Lobo fino antártico
19	59	Ambiental-mamífero	Lobo fino antártico
20	60	Ambiental-mamífero	Elefante marino
21	69	Pingüino	Barbijo-polluelo-cloaca
22	78	Ambiental-ave	Skua grande
23	81	Ambiental-mamífero	Lobo fino antártico
24	98	Ambiental-mamífero	Foca de Wedell

25	100	Ambiental-mamífero	Elefante marino
26	157	Pez	<i>Notothenia rossii</i> -intestino
27	171	Pez	<i>Harpagifer</i> -intestino
28	179	Pez	<i>Notothenia rossii</i> -agalla
29	184	Pez	<i>Notothenia rossii</i> -agalla
30	195	Ambiental-Vegetal	Musgo
31	197	Ambiental-Vegetal	Líquén
32	186B	Ambiental-Vegetal	Suelo

Se aislaron bacterias lácticas de diferentes matrices ambientales antárticas, tales como heces, pingüinos y peces (Tabla 3.1). De los 32 aislados, 21 cepas fueron de origen ambiental, correspondiendo a un 65,6%, tres cepas provenían de matrices ambientales vegetal, siendo un 9,4%, cuatro cepas provenían de pingüinos, siendo un 12,5% y cuatro cepas provenían de peces, siendo un 12,5%. Diversos factores abióticos físicos (temperatura, presión atmosférica, luz solar, clima y relieve) y químicos (pH, aire, agua y suelo) pueden influir en la actividad de los microorganismos. Sin embargo, la plena adaptación a las condiciones extremas de la Antártida parece bastante difícil, según pruebas de viabilidad bacteriana en diferentes condiciones en otras partes del mundo (Fguiiri *et al.*, 2015; Almohammadi *et al.*, 2022).

La posibilidad de aislar varias especies de bacterias lácticas puede deberse al hecho de que estos microorganismos proceden de zonas que incluyen patógenos y otros microorganismos. Las bacterias lácticas tienen la capacidad de adaptarse para sobrevivir en presencia de otras bacterias, adquiriendo la característica de desarrollarse en condiciones adversas (Wang *et al.*, 2007; Smykla *et al.*, 2015). Por otro lado, se cree que las cepas encontradas en este estudio están influenciadas por bacterias de otras matrices. Según estudios previos, las bacterias presentes en las heces animales tienen una fuerte influencia de las biocomunidades en el suelo antártico, interactuando también con líquenes y musgos. Puede haber una recombinación de material genético de las

bacterias presentes en las heces con las disponibles en el medio antártico (Smykla *et al.*, 2015; Zúñiga *et al.*, 2015; Van Dorst *et al.*, 2021).

La variabilidad genética introducida por la recombinación pudo haber dificultado la identificación de estas cepas, especialmente entre aquellas que comparten características morfológicas similares (Hossain *et al.*, 2021). Las posibles alteraciones en marcadores genéticos, como el gen 16S rRNA, pueden conducir a confusiones taxonómicas, complicando la interpretación de resultados y la clasificación de las cepas. Asimismo, se puede indicar que algunas cepas han adquirido genes que podrían conferirles ventajas adaptativas en el ambiente extremo de la Antártida, lo que no solo cambia su fenotipo, sino que también complica su identificación mediante métodos estándar (Ramasamy *et al.*, 2023). Estos hallazgos resaltan la importancia de adoptar enfoques multidimensionales en la identificación y caracterización de cepas de bacterias lácticas antárticas, considerando que la recombinación puede introducir complejidades significativas en la evaluación de la diversidad microbiana en estos hábitats extremos.

Las tasas de recuperación de las bacterias lácticas en la Antártida están fuertemente determinadas por las extremas condiciones ambientales que allí se encuentran, como las bajas temperaturas, los ciclos de congelación y descongelación, la falta de nutrientes y la alta radiación ultravioleta (George *et al.*, 2018). A pesar de estos retos, se han logrado aislar y caracterizar con éxito diversas especies de bacterias lácticas de distintos hábitats antárticos, lo que pone de manifiesto su impresionante capacidad de adaptación y resistencia (Zhang *et al.*, 2024). Estos microorganismos son muy diversos y tienen aplicaciones en la elaboración de alimentos, productos lácteos y potencialmente en el desarrollo de probióticos (Novik y Savich, 2020). El éxito en el aislamiento de estas bacterias depende de varios factores, como el lugar donde se toman las muestras, las técnicas empleadas para su aislamiento y cultivo, y el estado físico de las bacterias en el momento de la recolección (Kieliszek *et al.*, 2021; Anumudu *et al.*, 2024). En algunos casos, se han obtenido hasta  $2,4 \times 10^7$  unidades formadoras de colonia por mililitro de muestras, lo que indica que hay poblaciones saludables y robustas presentes (Dennis *et al.*, 2020). El entorno hostil de la Antártida requiere métodos de recuperación específicos,

que a menudo incluyen medios de cultivo adaptados para el frío y periodos de incubación más largos a bajas temperaturas, con el fin de replicar las condiciones naturales y mejorar así las tasas de recuperación. Además, las diferentes especies y cepas de bacterias lácticas que se encuentran en las muestras pueden variar considerablemente, lo que a su vez afecta las tasas de recuperación reportadas en distintos estudios. Estas bacterias también tienen la capacidad de neutralizar micotoxinas, lo que sugiere que podrían desempeñar un papel importante en la conservación y la seguridad alimentaria (Zapašnik *et al.*, 2022).

### 3.3.3. Caracterización bioquímica

La caracterización preliminar mostró que todas las cepas aisladas y seleccionadas eran catalasa negativa, gram positivas y productoras de peróxido, además eran positivas en las pruebas de gluconato, siendo organismos heterofermentativos obligados.

Los resultados de la prueba bioquímica con el kit API 50CH se muestran en la Tabla 3.3, donde el perfil bioquímico según el consumo de sustrato indica el taxón de la especie y su correspondiente porcentaje de identificación tras 48 horas de incubación.

Tabla 3.3. Identificación de las cepas aisladas y seleccionadas según el kit API 50 CH.

Nº	Código aislado	Especie	% Identificación
1	4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,8
2	5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
3	11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	90,1
4	12	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99,7
5	14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	90,1
6	16	<i>Lactobacillus pentosus</i>	82,1
7	17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	90,0
8	19	<i>Lactobacillus pentosus</i>	97,7
9	23	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99,9
10	25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	61,4
11	38	<i>Weissella confusa</i>	82,1
12	43	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98,3
13	47	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98,7
14	51	<i>Lactobacillus pentosus</i>	91,9
15	54	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98,3
16	55	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	89,6
17	57	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9

18	58	<i>Lactobacillus plantarum</i>	90,0
19	59	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
20	60	<i>Lactobacillus plantarum</i>	91,9
21	69	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99,9
22	78	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99,7
23	81	<i>Lactobacillus pentosus</i>	91,9
24	98	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99,8
25	100	<i>Lactobacillus plantarum</i>	91,9
26	157	<i>Lactobacillus plantarum</i>	90,9
27	171	<i>Lactobacillus plantarum</i>	90,9
28	179	<i>Lactobacillus pentosus</i>	98,5
29	184	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	87,7
30	195	<i>Lactobacillus brevis</i>	98,7
31	197	<i>Lactobacillus brevis</i>	40,3
		<i>Weissella confusa</i>	36,4
32	186B	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99,5

La caracterización bioquímica reveló que *Lactobacillus plantarum* era la especie identificada con mayor frecuencia.

Las pruebas de caracterización bioquímica de las cepas aisladas mostraron características típicas de bacterias lácticas. Resultados positivos en las pruebas de gluconato significan la generación de CO<sub>2</sub> y una ruta metabólica heterofermentativa obligada para las cepas, ya que el CO<sub>2</sub> se produce durante la conversión de hexosas en pentosas. Estas cepas producirían ácido láctico como producto principal, y ácido acético o etanol como metabolitos secundarios, teniendo una mayor versatilidad bioquímica con la formación de diversos productos metabólicos (Chen *et al.*, 2022; Liang *et al.*, 2022; Sedó-Molina *et al.*, 2022). Esto significa que estas bacterias poseen más alternativas de supervivencia al tener una mayor variación en sus rutas metabólicas y un mayor potencial en aplicaciones de remediación biológica.

El sistema API 50 CHL es una herramienta eficaz para la identificación bioquímica de bacterias ácido-lácticas (BAL). Su principal función consiste en determinar perfiles fermentativos mediante asimilación de hasta 49 tipos diferentes de carbohidratos. Entre las ventajas que ofrece destacan su estandarización y rapidez de aplicación, así como su capacidad para proporcionar una identificación taxonómica a nivel de especie, con porcentajes de coincidencia que, en este estudio, superan el 90% para la mayoría de las

cepas evaluadas. Sin embargo, es importante tener en cuenta algunas limitaciones metodológicas de este procedimiento al momento de interpretar los resultados. En primer lugar, la sensibilidad del kit está condicionada por la expresión fenotípica activa de las rutas metabólicas que se analizan, las cuales pueden cambiar dependiendo del medio, el tiempo de incubación y las condiciones ambientales. Una cepa podría no mostrar todos sus potenciales metabólicos en las condiciones del test, lo que dificulta la identificación de cepas que son atípicas o que han evolucionado en ambientes extremos, como los de la Antártida. Además, la especificidad del API 50 CHL es moderada y puede verse limitada cuando se utilizan bases de datos de referencia que se han desarrollado a partir de cepas mesofílicas. Esta limitación puede llevar a resultados ambiguos, sobre todo con psicrófilos o aislados provenientes de entornos con una fuerte presión selectiva genética, como es el caso de la Antártida. La plasticidad fenotípica de estas cepas a menudo genera patrones bioquímicos que pueden ser mixtos o no convencionales. Por ejemplo, se identificó una cepa con un 61,4% de coincidencia (25), lo que plantea dudas sobre la fiabilidad taxonómica del método en estos contextos.

En este estudio se presentan los resultados de la caracterización bioquímica de las 32 cepas aisladas de bacterias ácido-lácticas (BAL) mediante el sistema API 50 CHL. Esta herramienta permite inferir perfiles fermentativos según el uso diferencial de 49 carbohidratos, lo que contribuye a una identificación funcional preliminar. Las cepas seleccionadas compartieron características típicas de BAL: gram positivas, catalasas negativas, productoras de peróxido y heterofermentativas, lo cual valida su pertenencia al grupo de interés.

Los resultados permitieron asignar las cepas a tres géneros principales: *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Weissella*. *L. plantarum* fue la especie más recurrente, con altos porcentajes de coincidencia. No obstante, algunos casos presentaron coincidencias bajas (hasta 61%), o ambigüedad entre especies (*L. brevis* y *W. confusa*), lo que revela limitaciones en la precisión del método. Si bien el uso del API es técnicamente válido, su dependencia de la expresión fenotípica activa bajo condiciones fijas (37°C) puede limitar

la detección de cepas adaptadas a condiciones ambientales distintas, como las propias del entorno antártico. El método no discrimina con suficiente resolución entre especies filogenéticamente próximas y requiere contrastarse con análisis moleculares adicionales, para futuras investigaciones respecto a esta temática.

Estos podrían incluir estudios genéticos y caracterización de metabolitos; además, permitirían una evaluación más completa y precisa de las capacidades funcionales de las cepas, facilitando así su aplicación en diversas áreas industriales, alimentarias y farmacéuticas. La integración de diferentes enfoques metodológicos enriquecería la comprensión del comportamiento y las propiedades de las BAL, maximizando su aprovechamiento en el desarrollo de productos innovadores.

Para complementar el análisis del perfil bioquímico obtenido con el kit API 50 CHL y lograr una identificación más precisa de las bacterias ácido-lácticas, se podrían realizar diversas estrategias. Una opción es utilizar métodos moleculares, como PCR y secuenciación del gen 16S rRNA, que permiten confirmar la identidad de las cepas a nivel de especie. Además, el análisis de los perfiles de ácidos grasos de las membranas celulares puede ofrecer información adicional sobre sus características. También se pueden realizar estudios sobre el metabolismo de compuestos específicos y evaluar la plasticidad fenotípica al cambiar las condiciones de cultivo, como el pH o la temperatura. Otras consideraciones incluyen pruebas de sensibilidad a antibióticos, análisis proteómicos mediante electroforesis en gel, y técnicas metabolómicas para explorar el perfil de metabolitos. Evaluar características fisiológicas, como la formación de biofilm o la resistencia al estrés, y analizar la producción de compuestos antimicrobianos también puede resultar útil. Al integrar estos enfoques, se obtiene una visión más completa sobre las cepas estudiadas y su potencial en diversas aplicaciones, enriqueciendo así el análisis inicial.

#### **3.3.4. Determinación molecular de los aislados bacterianos**

Los resultados obtenidos de la secuenciación bacteriana se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Identificación de aislados bacterianos antárticos mediante secuenciación del ARNr 16S.

N°	Código cepa	Especie/cepa	Observación	% Identificación	Concentración (ng/L)
1	4	<i>Weissella confusa</i>		99,93	114,0
2	5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		99,93	36,8
3	11	<i>Enterococcus durans</i>		100,0	53,2
4	12	<i>Enterococcus faecium</i>		100,0	19,5
5	14	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		99,93	57,5
6	16	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		100,0	89,2
7	17	<i>Lactobacillus plantarum</i>		100,0	84,6
8	19	Sin ensamblaje	Mala calidad	-	62,3
9	23	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		99,93	53,9
10	25	<i>Enterococcus faecium</i>		100,0	78,4
11	38	<i>Enterococcus faecium</i>		100,0	140,2
12	43	<i>Enterococcus faecium</i>	Ensamble parcial	99,52	212,7
13	47	<i>Lactobacillus plantarum</i>		100,0	269,1
14	51	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		100,0	206,0
15	54	<i>Lactobacillus plantarum</i>		100,0	161,0
16	55	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		100,0	160,1
17	57	<i>Enterococcus faecium</i>		100,0	140,8
18	58	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		100,0	171,3
19	59	Sin ensamblaje	Mala calidad	-	70,2
20	60	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ensamble parcial	100,0	94,7
21	69	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		100,0	210,2
22	78	<i>Enterococcus faecium</i>		99,93	86,4
23	81	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		100,0	174,1
24	98	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ensamble parcial	99,42	73,0
25	100	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ensamble parcial	99,75	109,8
26	157	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		100,0	26,0
27	171	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		100,0	139,4
28	179	<i>Lactobacillus plantarum</i>		100,0	110,5
29	184	<i>Weissella confusa</i>		100,0	75,8
30	186B	<i>Weissella confusa</i>		100,0	58,2
31	195	<i>Weissella confusa</i>		100,0	62,3

Tabla 3.4 (continuación)

32	197	<i>Weissella confusa</i>	100,0	133,1
----	-----	--------------------------	-------	-------

La secuenciación reveló que las cepas correspondían principalmente a *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecium* y *Weissella confusa*. Se eligieron tres cepas de esta última especie (186B, 195 y 197) de diferentes matrices vegetales (suelo, musgo y líquen), las cuales fueron seleccionadas por su diversidad de orígenes, lo que permite estudiar su variabilidad genética y funcional en diferentes entornos. Su capacidad de adaptación a condiciones extremas y propiedades deseables, como la producción de exopolisacáridos y actividad antimicrobiana, las hacen prometedoras para aplicaciones biotecnológicas.

El estudio de *Weissella confusa* en el contexto antártico resulta de interés debido a su potencial para proporcionar información sobre la diversidad microbiana en este ecosistema extremo, donde las condiciones ambientales son severas. Además, investigar su interacción con otros microorganismos y su papel en los ecosistemas antárticos puede ayudar a comprender mejor las dinámicas ecológicas y la funcionalidad de estas comunidades microbianas. Dada la creciente preocupación por el cambio climático, el estudio de *Weissella* permite vislumbrar cómo estos microorganismos responden a variaciones ambientales y qué implicaciones pueden tener para la microbiota antártica en general.

*Weissella confusa* es una bacteria láctica gram positiva que pertenece al género *Weissella*, caracterizándose por su morfología de cocos o bacilos que pueden formar cadenas y por ser móviles y no esporulados. Esta especie es conocida por su capacidad para fermentar azúcares tales como glucosa y ribulosa, produciendo metabolitos como ácido láctico, bacteriocinas y exopolisacáridos (Liu *et al.*, 2024). Estos últimos no solo mejoran la textura y el sabor de los productos alimentarios, sino que también poseen propiedades funcionales, como efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Zhou *et al.*, 2024). Su resistencia a condiciones extremas y su capacidad para ser aislada de diversas

fuentes, como suelos, lagos, frutas y productos fermentados, la convierten en un organismo relevante para estudios en ecosistemas adversos, como el antártico.

La identidad de las muestras con un ensamblaje completo (Tabla 3.4) es similar en al menos un 99,93% a los géneros bacterianos con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI. Sin embargo, la identificación por el perfil molecular de ARNr no coincide con la caracterización bioquímica mediante el kit API 50CH.

Poder vincular los resultados bioquímicos obtenidos mediante API 50 CHL con la caracterización genética a través del análisis es esencial para una identificación más precisa y robusta de las cepas aisladas de BAL. Mientras que la caracterización bioquímica proporciona información sobre las capacidades fermentativas basadas en la utilización de carbohidratos, la secuenciación genética permite una resolución filogenética más detallada, identificando las cepas a nivel de especie y revelando relaciones evolutivas entre ellas. Esta combinación de enfoques, además de validar los perfiles fermentativos asignados, detecta discrepancias potenciales entre la expresión fenotípica y la identidad genética, lo que es vital para la selección de cepas con características deseables para aplicaciones biotecnológicas. La integración de ambos tipos de análisis contribuye a una comprensión más integral de la diversidad y funcionalidad de las BAL, facilitando su explotación en aplicaciones industriales.

Existe una relación entre el kit API 50 CHL y la identificación molecular a través de la secuenciación del gen 16S rRNA. Ambos métodos se utilizan para identificar y clasificar bacterias, pero lo hacen de maneras distintas. El kit API 50 CHL se basa en la evaluación de perfiles bioquímicos, analizando cómo las bacterias asimilan diferentes carbohidratos. Esto permite obtener un perfil fermentativo que puede ofrecer pistas sobre sus características fenotípicas. Sin embargo, este enfoque puede tener limitaciones, sobre todo cuando se trata de cepas que presentan variaciones fenotípicas, como las de ambientes extremos. Por su parte, la secuenciación del gen 16S rRNA proporciona una forma más precisa de identificar bacterias a nivel genético. Este gen es altamente conservado entre las especies bacterianas, lo que facilita la diferenciación a nivel de especie, incluso entre cepas que pueden compartir similitudes bioquímicas. Por eso, los

resultados obtenidos con el kit API 50 CHL suelen ser validados y complementados con la secuenciación del 16S rRNA, ayudando a aclarar cualquier duda que pueda surgir en el análisis bioquímico. Combinar ambos métodos puede enriquecer la identificación de bacterias ácido-lácticas y otras bacterias, haciendo el proceso más confiable y preciso. Por otra parte, algunas discrepancias entre los datos del API y la secuenciación del gen 16S rRNA también han sido observadas en otros estudios, no sólo para BAL sino también para otros géneros bacterianos (Moraes *et al.*, 2013). Lo anterior puede deberse a los plásmidos, ya que algunos genes requeridos para la fermentación de azúcares son codificados por ellos, y la variación en los mismos puede conducir a inconsistencias metabólicas (Domingos-Lopes *et al.*, 2017). Por otro lado, las secuencias de ADN genómico no dependen de las condiciones de cultivo o manipulación, por lo que esta técnica es más precisa para la identificación de especies (Domingos-Lopes *et al.*, 2017). Como se ha mencionado anteriormente, las condiciones climáticas extremas de la Antártida podrían haber ejercido una fuerte presión selectiva sobre las BAL encontradas en este estudio, dando lugar a importantes mecanismos de adaptación al ambiente hostil, lo que concuerda con Santa-Cruz Vásquez *et al.* (2021). Esto puede haber favorecido la evolución de estos microorganismos a lo largo del tiempo, con vías metabólicas únicas y adaptativas, que pueden ganar o perder genes productores de enzimas y compuestos de interés biotecnológico (Makarova y Koonin, 2007).

La identificación de bacterias, pudo verse limitada por la falta de equipamiento avanzado como MALDI-TOF, secuenciación genómica y técnicas de espectrometría de proteínas. Cada uno de estos métodos ofrece ventajas significativas. El MALDI-TOF permite una identificación rápida y precisa al comparar perfiles de masas de proteínas, aunque su efectividad depende de la calidad de las bases de datos de referencia. La secuenciación genómica proporciona una visión completa del genoma, revelando características genéticas importantes, mientras que la espectrometría de proteínas ofrece información sobre el perfil proteómico y las funciones metabólicas (Domingos-Lopes *et al.*, 2017). Sin embargo, el método molecular de identificación, como la secuenciación del gen 16S rRNA, se destaca por su precisión y capacidad para diferenciar cepas a nivel de especie,

incluso aquellas con variaciones fenotípicas. Este enfoque supera las limitaciones de los métodos fenotípicos, que dependen de condiciones específicas de cultivo y expresión metabólica. En resumen, aunque los métodos avanzados son valiosos, la identificación molecular se considera superior y clásica por su capacidad para ofrecer resultados más confiables y detallados, lo cual es fundamental para aplicaciones en biotecnología.

Los ambientes extremos antárticos con sus condiciones cambiantes, pueden ofrecer variedad de bacterias con potencial biotecnológico. Los microorganismos que allí se desarrollan están siendo foco de interés para descubrir nuevas enzimas que pueden ser muy útiles en diversas industrias, como la farmacéutica, producción de químicos ecológicos, procesamiento de alimentos y desarrollo agrícola (Jin *et al.*, 2022). Además, hay pocos estudios que analicen cómo estas bacterias se adaptan genéticamente y fenotípicamente a las duras condiciones de su entorno.

Una de las ventajas de utilizar técnicas moleculares para identificar estas bacterias es que simplifica el proceso. Estas técnicas complementan los métodos fenotípicos tradicionales, mejorando la rapidez de identificación.

La comparación entre las especies de bacterias ácido-lácticas muestra divergencias genéticas que reflejan sus adaptaciones a diferentes entornos. Por ejemplo, *Lactobacillus* y *Pediococcus* suelen ser más similares entre sí, mientras que *Enterococcus* muestra una evolución distinta, posiblemente debido a los distintos hábitats y funciones en la fermentación (Kosiorek *et al.*, 2024). Estas divergencias pueden estar relacionadas con adaptaciones a condiciones específicas, como el desarrollo en climas fríos, donde deben primar características específicas para sobrevivir en condiciones extremas. Además, las interacciones ecológicas en sus respectivos entornos también juegan un papel importante en su evolución.

### **3.3.5. Hidrofobicidad de la superficie celular (HCS)**

Se realizó la prueba estadística de Shapiro-Wilks, la cual arrojó que los datos presentaron distribución normal. La cepa 186B mostró una elevada hidrofobicidad de su superficie celular frente al xileno, el tolueno y el hexadecano; la cepa 195 mostró una hidrofobicidad

media frente a los compuestos mencionados; y la cepa 197 mostró una elevada hidrofobicidad frente al tolueno, pero sólo una hidrofobicidad media frente al xileno y el hexadecano (Figura 3.2).

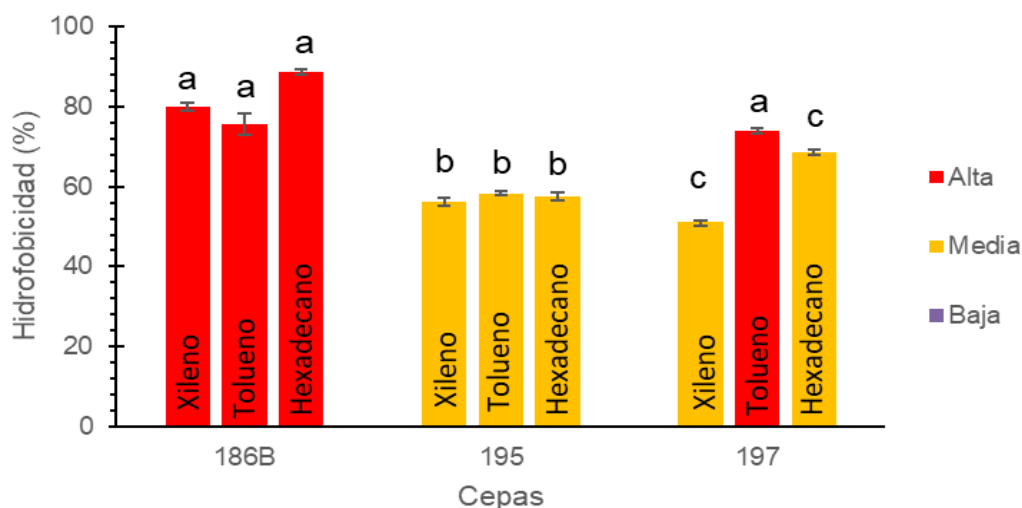


Figura 3.2. Porcentaje de hidrofobicidad de la superficie celular de tres aislados antárticos al xileno, tolueno y hexadecano.

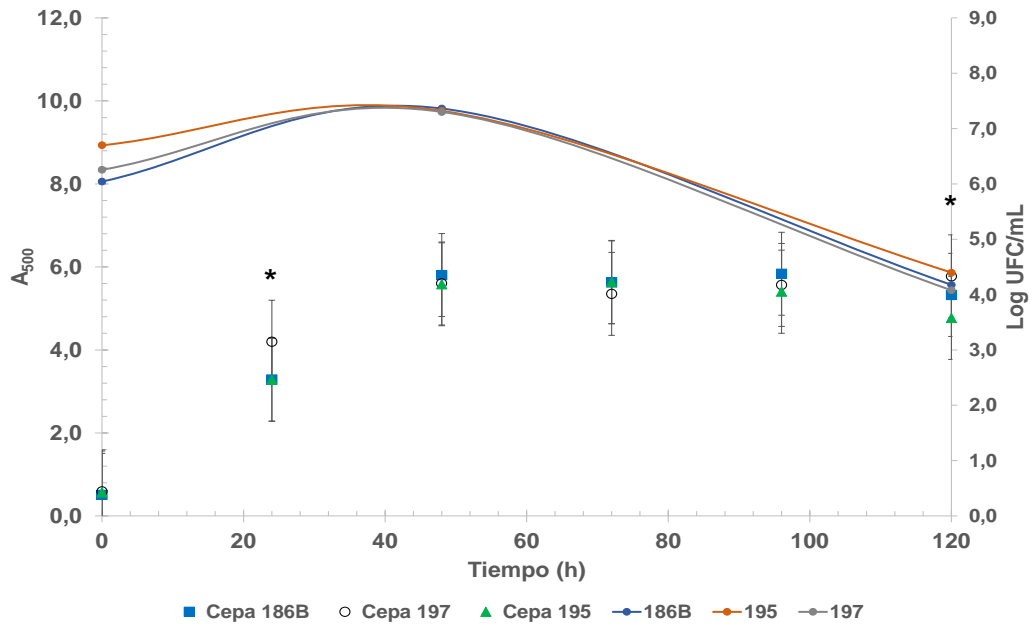
Los resultados indican que para el caso del xileno y el hexadecano las tres cepas presentan diferencias significativas en la hidrofobicidad ante estos solventes, y en el caso del tolueno la cepa 195 presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a las demás.

La hidrofobicidad media y alta puede poner en práctica las bacterias lácticas la degradación de contaminantes apolares del medio ambiente por parte de las bacterias lácticas (Elsanhoty y Ramadan, 2016). Huet y Puchooa (2017), descubrieron algunas bacterias lácticas con una acción biorremediadora frente a metales pesados como mercurio, arsénico, cromo y plomo. Las bacterias altamente hidrofóbicas que interactúan con compuestos como xileno, hexadecano y tolueno tienen diversas aplicaciones significativas, especialmente en la bioremediación ambiental y el tratamiento de aguas contaminadas. Estas bacterias son capaces de descomponer hidrocarburos tóxicos,

limpiando suelos y cuerpos de agua afectados por contaminantes (Elsanhoty y Ramadan, 2016). Además, pueden ser utilizadas en biorrecuperación de petróleo, facilitando su extracción de yacimientos, y en la producción de biocombustibles, ofreciendo alternativas más sostenibles a los combustibles fósiles. También pueden desempeñar un papel en el desarrollo de biosensores para detectar contaminantes y en la síntesis de compuestos químicos y enzimas para diversas industrias. Estas aplicaciones destacan su potencial en biotecnología y protección ambiental (Hüet y Puchooa, 2017). Así la cepa 186B, que fue aislada del suelo y presentó la mayor hidrofobicidad, es un candidato potencial para ser usada en el tratamiento de aguas residuales con elevada concentración de contaminantes apolares.

### **3.3.6. Resistencia al calor**

El crecimiento de las cepas 186B, 195 y 197 a 5, 15 y 45°C fue variable, con un retraso del crecimiento a 15 y 45°C, y sin crecimiento durante 120 h a 5°C. Por otro lado, se encontró un fuerte crecimiento a 25°C (Figura 3.3) y 35°C (Figura 3.4). Las tres cepas de BAL mostraron el mayor crecimiento a 35°C, con los mayores valores de absorbancia a las 120 h. La cepa 195 tuvo el mayor crecimiento, seguida de la cepa 197. Los valores de pH mostraron una tendencia similar a ambas temperaturas (Figura 3.5 y 3.6), con una disminución más pronunciada durante las primeras 24 horas a 35°C.



\*Diferencias significativas entre las cepas para el mismo período de tiempo.

Figura 3.3. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo a 25°C para tres cepas antárticas.

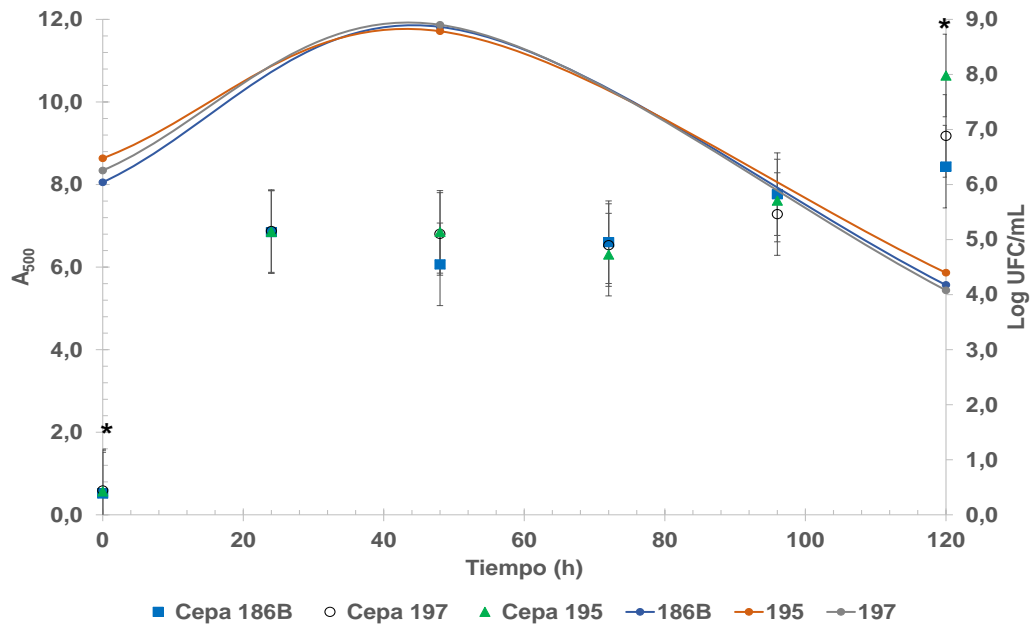


Figura 3.4. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo a 35°C para tres cepas antárticas.

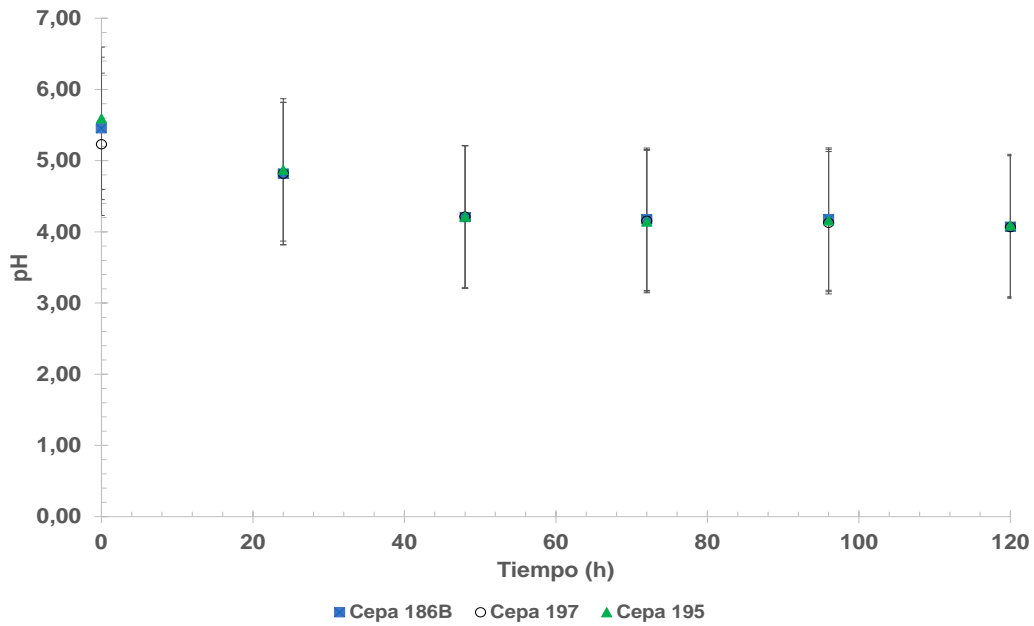
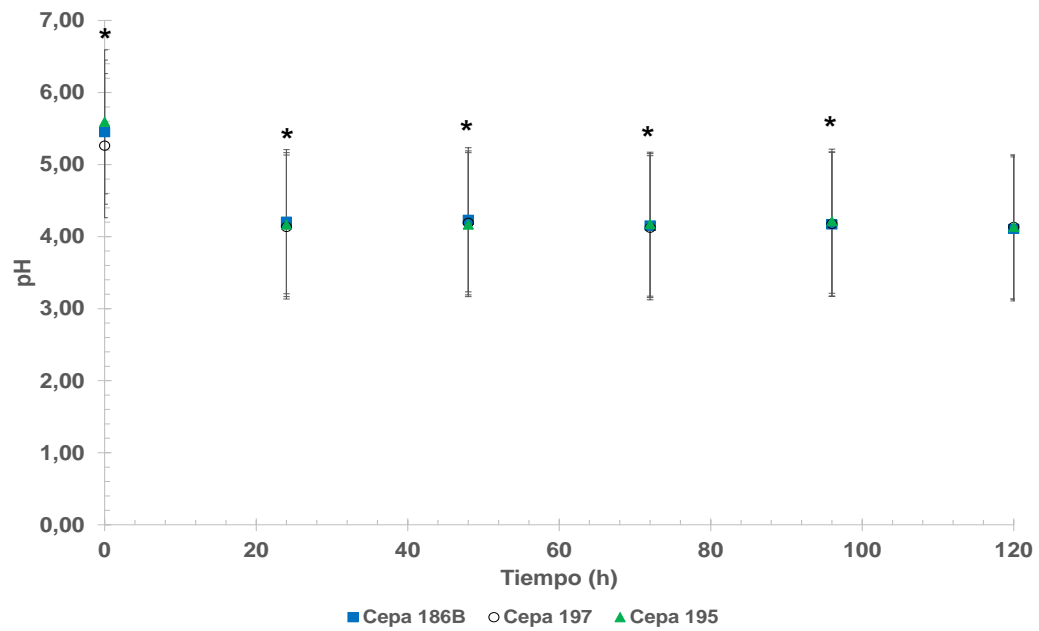


Figura 3.5. Cambio del pH del medio de cultivo a 25°C para tres cepas lácticas.



\*Diferencias significativas entre las cepas para el mismo período de tiempo.

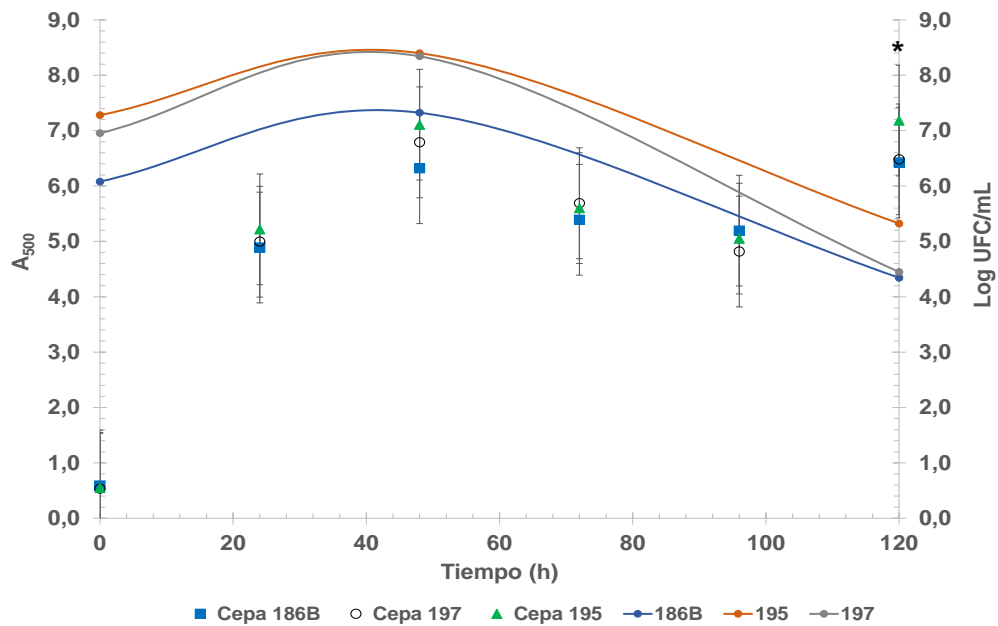
Figura 3.6. Cambio del pH del medio de cultivo a 35°C para tres cepas lácticas.

En este estudio se considera que 35°C es la temperatura óptima de crecimiento debido a la mayor absorbancia, es decir, las cepas 186B, 195 y 197 produjeron la mayor cantidad de biomasa, acidificando el medio de crecimiento más rápidamente durante las primeras 24 horas. Aunque no existen estudios previos para *Weissella* del continente antártico, los resultados están de acuerdo con la literatura, donde la mayoría de las especies de *Weissella* crecen de forma óptima a temperaturas superiores a 30°C (Hu y Gänzle, 2018; Kavitate *et al.*, 2020).

Sin embargo, el hecho de que las cepas sean capaces de crecer a 15 y 45°C demuestra que pueden adaptarse a temperaturas que no están dentro del rango óptimo de crecimiento. Esto está de acuerdo con los hallazgos de Fguiri *et al.* (2015), que aislaron cepas de BAL que fueron capaces de crecer a 10, 39 y 45°C, lo que indica que las especies de *Weissella* pueden crecer incluso a temperatura de refrigeración (4°C) (Silva *et al.*, 2017). Sin embargo, es difícil aislar bacterias psicrófilas incluso a bajas temperaturas, si las especies estuvieran adaptadas a esta condición, debido a la alta temperatura ocasional del suelo y a las muestras recolectadas en los meses de verano (O'Brien *et al.*, 2004).

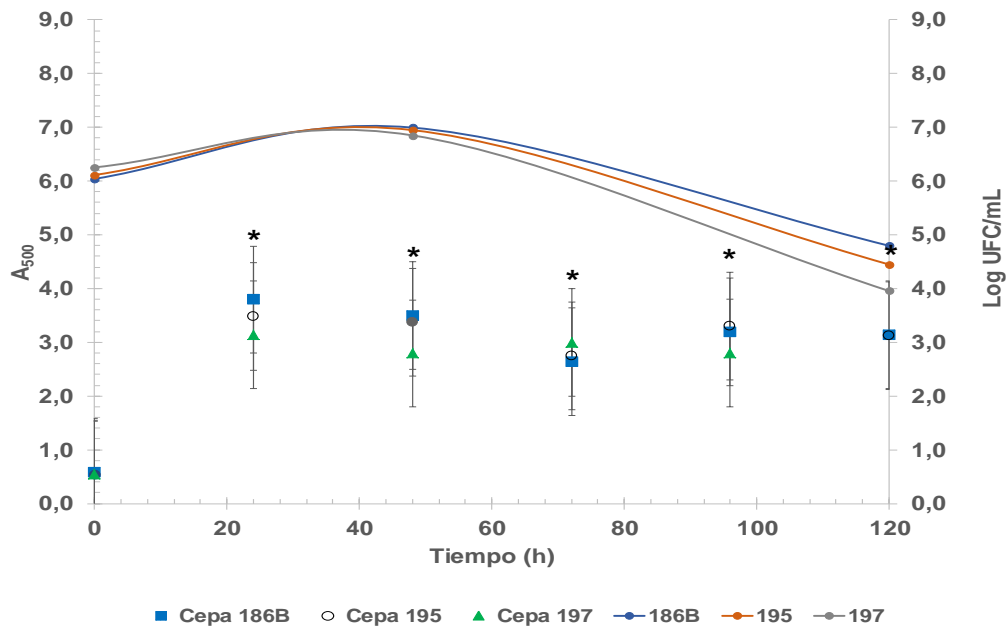
### **3.3.7. Cloruro de sodio**

El crecimiento de las cepas se retrasó en presencia de cloruro de sodio (NaCl) al 6 y 8%, mientras que no se detectó crecimiento alguno al 10%. Las cepas seleccionadas crecieron fuertemente con concentraciones de NaCl del 2 y 4% (Figura 3.7 y 3.8). Al 2% de NaCl, la absorbancia más alta se midió para la cepa 195 a las 120 h (Figura 3.10). En el caso de la cepa 197, la absorbancia más alta se registró a las 72 h (Figura 3.8). La cepa 186B presentó una menor tolerancia a la salinidad. En presencia de NaCl al 4%, todas las cepas mostraron una disminución de los valores de absorbancia a partir del tiempo 24 h (Figura 3.8). En cuanto al pH, la mayor acidez se registró a las 72 h, con valores similares medidos para todas las cepas en ambos niveles de salinidad (Figura 3.9 y 3.10).



\*Diferencias significativas entre las cepas para el mismo período de tiempo.

Figura 3.7. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo al 2% de NaCl para tres cepas antárticas.



\*Diferencias significativas entre las cepas para el mismo período de tiempo.

Figura 3.8. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo al 4% de NaCl para tres cepas antárticas.

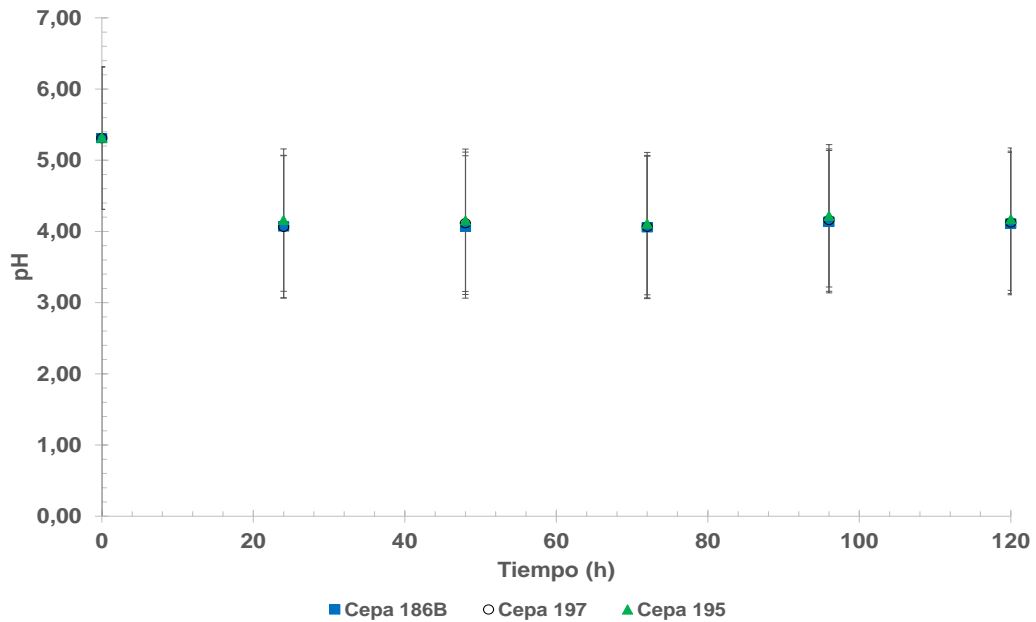


Figura 3.9. Cambio del pH a lo largo del tiempo para las cepas antárticas al 2% de NaCl.

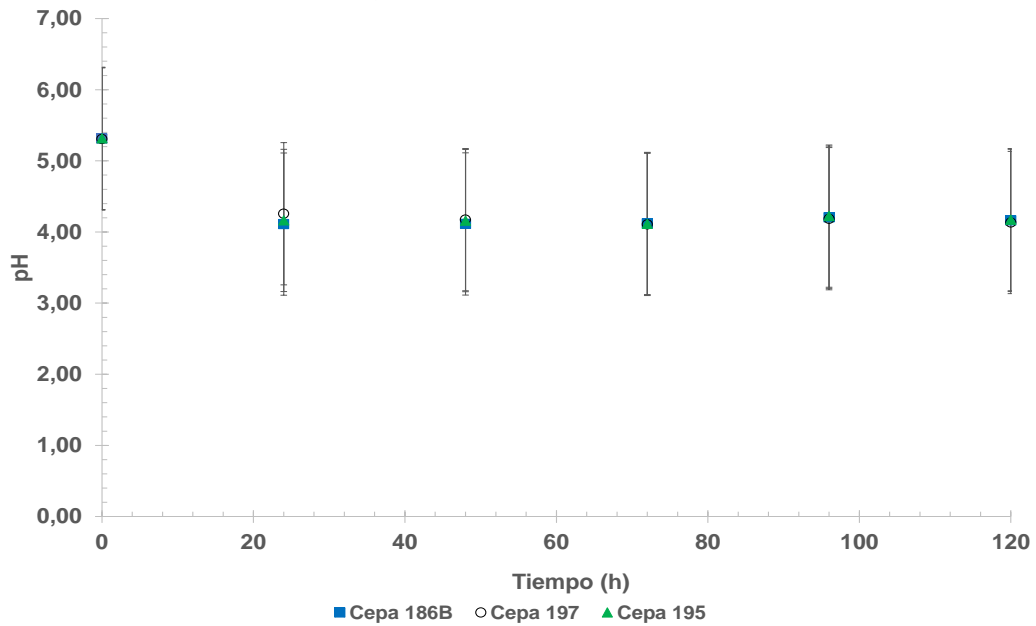


Figura 3.10. Cambio del pH a lo largo del tiempo para las cepas antárticas al 4% de NaCl.

Se evaluó el crecimiento y acidificación del medio en tres cepas BAL (186B, 195 y 197) bajo concentraciones de 2% y 4% de NaCl, monitoreando absorbancia ( $A_{500}$ ) y pH durante

120 h. Los resultados mostraron que la cepa 195 fue la más tolerante, con crecimiento sostenido y mayor reducción de pH al 2% de NaCl, mientras que todas las cepas experimentaron una inhibición al 4%, lo que se observa en valores bajos de absorbancia y escasa acidificación. Esto sugiere que el umbral de tolerancia para estas BAL se encuentra en torno al 3%, alineado con literatura previa (Abiona y Adegoke, 2017), y confirma el impacto del estrés osmótico como factor limitante del metabolismo bacteriano. Los mejores resultados se obtuvieron al 2% de NaCl. La cepa 195 fue la que mejor toleró la salinidad a una concentración del 2%, mientras que al 4% todas las cepas mostraron valores de absorbancia más bajos. Uno de los factores limitantes para el crecimiento celular o la supervivencia de las BAL es el estrés osmótico, ya que afecta a las actividades metabólicas de las bacterias (Le Marrec, 2011). Esto puede explicar que no se haya encontrado crecimiento a concentraciones más altas de NaCl como las ensayadas en este estudio.

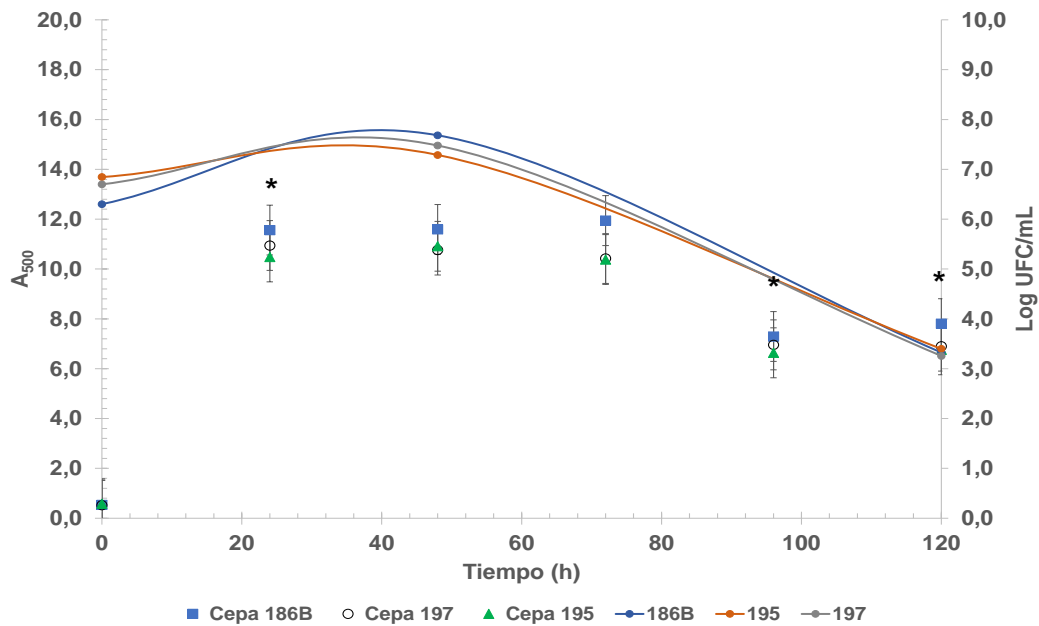
Aunque no se han reportado estudios sobre el aislamiento y caracterización de *Weissella* de la Antártida, las tasas de crecimiento óptimas a valores de pH entre 6,2 y 7,0 se encontró en otros estudios de BAL en el mundo (Mussatto *et al.*, 2008; Camesasca *et al.*, 2021). Estos resultados están de acuerdo con la absorbancia y pH encontrada para todas las cepas en este estudio.

El mecanismo de tolerancia al NaCl en las bacterias ácido-lácticas (BAL) que se han aislado en la Antártida es especial y fundamental para su supervivencia en un entorno tan extremo, donde la salinidad puede ser bastante alta (Jin *et al.*, 2022). Estas cepas han desarrollado estrategias únicas para mantener el equilibrio osmótico y seguir funcionando adecuadamente incluso en condiciones de alta salinidad. Una de las formas en que logran esto es acumulando compuestos osmoprotectores, como aminoácidos (por ejemplo, la prolina) y solutos como la trehalosa (Ali *et al.*, 2021). Estos compuestos les ayudan a contrarrestar la presión osmótica sin afectar sus funciones celulares. Además, se ha visto que estas bacterias antárticas pueden activar sistemas de transporte de iones y proteínas chaperonas, que les permiten adaptarse mejor a las condiciones difíciles y mantener la estabilidad de sus proteínas y membranas (Deming y Young, 2017). Por otro

lado, las cepas de BAL que no provienen de la Antártida, es decir, aquellas que se pueden encontrar en ambientes más templados, suelen tener una menor capacidad para tolerar el NaCl. Aunque también pueden acumular algunos osmoprotectores, sus mecanismos de adaptación no son tan efectivos como los de las cepas antárticas. Muchas de estas bacterias dependen más de la regulación de la presión osmótica a través de la síntesis de peptidoglicano y ajustes en la membrana celular (Margesin, 2017). Además, las cepas de ambientes menos extremos a menudo muestran una menor expresión de los genes que están relacionados con la tolerancia a la sal. Esto sugiere que su capacidad para adaptarse ha evolucionado para hacer frente a una variedad de condiciones ambientales, pero no necesariamente a los niveles extremos de salinidad que se encuentran en la Antártida (Furhan, 2020). Esta diferencia en adaptaciones puede atribuirse a la presión selectiva que impone un entorno tan hostil, donde sobrevivir y reproducirse en condiciones de alta salinidad es esencial.

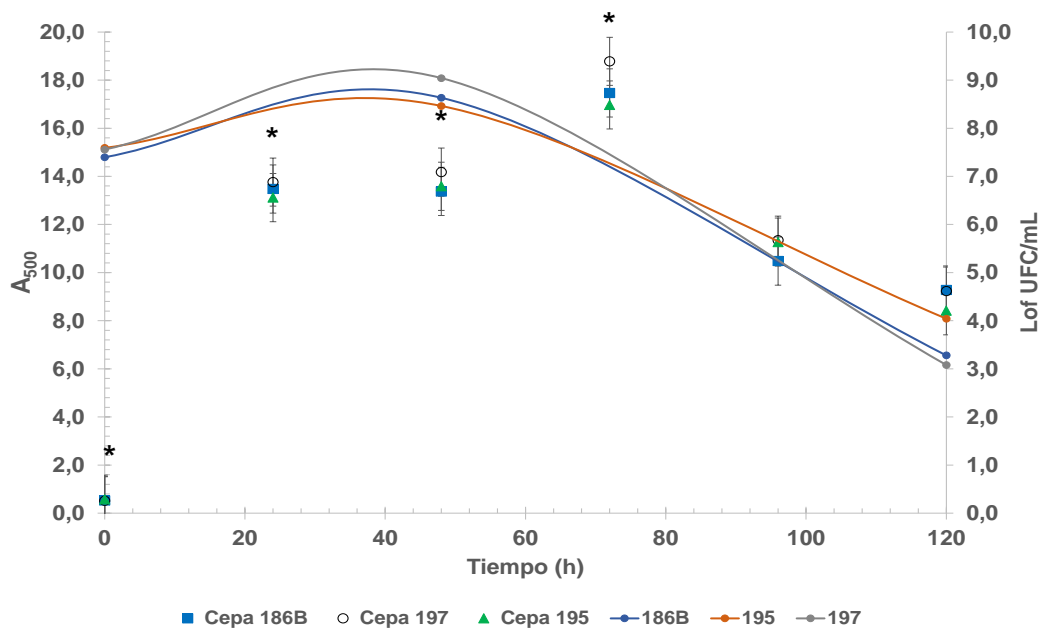
### **3.3.8. pH inicial**

El crecimiento de las cepas fue escaso y sólo a las 24 h a un pH inicial de 4,0 y 5,0. Los valores más altos de absorbancia se registraron a un pH inicial de 7,0 para todas las cepas. A un pH inicial de 6,0, el mayor crecimiento se encontró a las 72 h, con la absorbancia más alta para la cepa 186B (Figura 3.11). Todas las cepas fueron capaces de acidificar el medio a las 24 h, alcanzando valores similares, a pesar de iniciar los experimentos con valores de pH diferentes. A pH 7,0, todas las cepas presentaron una elevada tasa de crecimiento, alcanzando la máxima absorbancia a las 72 h. La cepa 197 presentó el mayor crecimiento, seguida de la 186B (Figura 3.12). Los perfiles de cambio de pH son semejantes para los valores de 6,0 y 7,0 de pH inicial (Figura 3.13 y 3.14).



\*Diferencias significativas entre las cepas para el mismo período de tiempo.

Figura 3.11. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo a pH 6,0 para tres cepas antárticas.



\*Diferencias significativas entre las cepas para el mismo período de tiempo.

Figura 3.12. Cambio en la absorbancia ( $A_{500}$ ) de medio de cultivo a pH 7,0 para tres cepas antárticas.

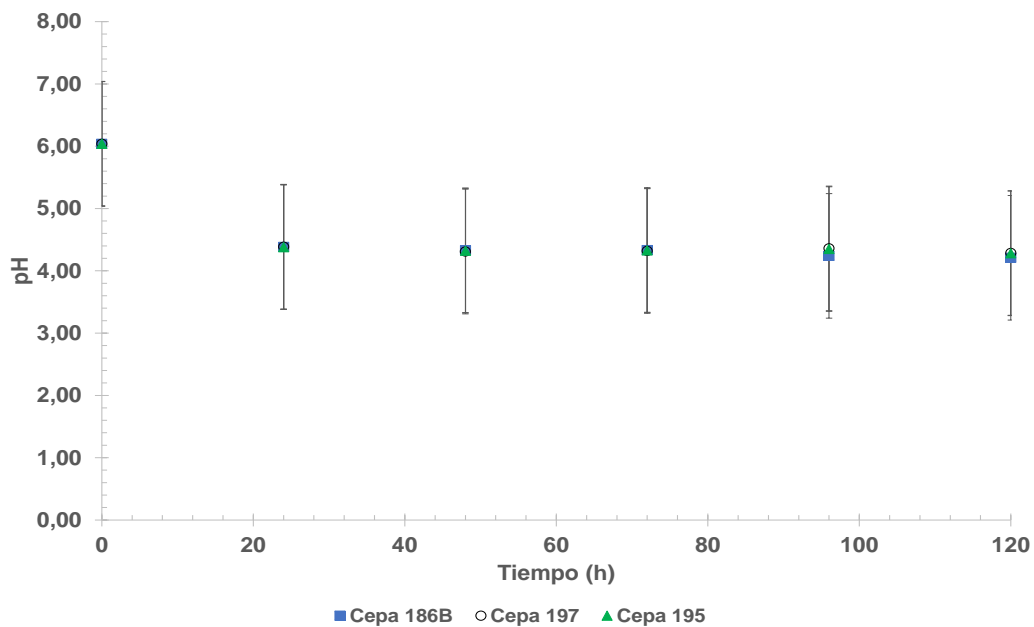


Figura 3.13. Cambio de pH a lo largo del tiempo para las cepas antárticas a partir de un pH inicial de 6,0.

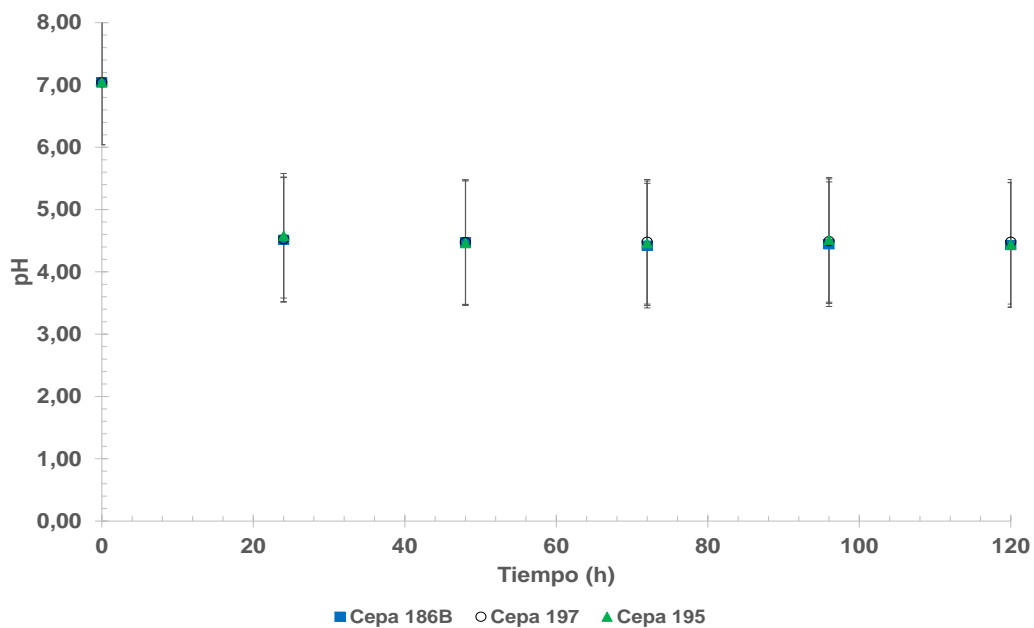


Figura 3.14. Cambio de pH a lo largo del tiempo para las cepas antárticas a partir de un pH inicial de 7,0.

Las cepas 186B, 195 y 197 exhibieron la absorbancia más alta a un pH inicial de 7,0, con un perfil de pH semejante para los valores 6,0 y 7,0. Además, se observó un crecimiento similar pero retardado de las cepas a pH inicial de 4,0 y 5,0, con acidificación del medio sin generación significativa de biomasa. A las 96 h, para ambas condiciones se evidenció una disminución de la absorbancia, asociada a una posible inhibición. Esto puede ser explicado debido a los cambios en la composición del medio (como la caída del pH), a consecuencia de la acumulación de ácidos orgánicos que ocurre en la fermentación del ácido láctico, el cual causa estrés ácido que también puede afectar la viabilidad y la actividad metabólica de las BAL. Se ha descrito el efecto tóxico del ácido láctico no disociado sobre las células de las BAL (Nsogning *et al.*, 2018). Para superar este estrés en su entorno de fermentación, las células lácticas desencadenan cuatro enzimas principales: glutamato descarboxilasa (GAD), lisina descarboxilasa, arginina deiminasa (ADI) y multi subunidad F1Fo ATPasa. Sin embargo, este fenómeno depende de la presencia de aminoácidos disponibles.

Otros autores han informado de que los medios de cultivo ácidos pueden inhibir el crecimiento bacteriano debido a la disminución del pH externo y a la protonación del ácido que puede entrar por simple difusión en el citoplasma (Mussatto *et al.*, 2008; Carpenter y Boradent, 2009). Como el pH intracelular de la mayoría de las bacterias es casi neutro, los ácidos protonados dentro de la célula se disocian y liberan protones y aniones, lo que puede provocar un retraso del crecimiento y la muerte celular debido a un mayor consumo de energía en el intento de bombear protones fuera de la célula bacteriana (Rawoof *et al.*, 2020). El diseño experimental tiene el mérito de explorar el perfil fisiológico de las cepas en un gradiente ácido-neutro y vincularlo con la capacidad acidificante característica de las BAL. Sin embargo, se podrían haber vinculado de forma más explícita estos patrones de acidificación con indicadores de viabilidad celular, mecanismos de tolerancia ácido-inducida (GAD, ADI, F1Fo ATPasa), o tasas de producción de ácido láctico (Nsogning *et al.*, 2018).

Es posible mencionar, además, que las curvas de crecimiento de carácter sigmoide se ajustan al modelo de Gompertz (Zwietering *et al.*, 1990). Este es una herramienta

matemática valiosa para describir el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL) en entornos controlados. El modelo captura distintas fases del crecimiento bacteriano: inicialmente, las BAL atraviesan una fase “lag”, donde se adaptan al nuevo medio sin mostrar un aumento notable en la población, representada en la parte inicial de la curva (Wang *et al.*, 2021). Luego, entran en una fase exponencial, caracterizada por un aumento rápido en la división celular debido a su metabolismo que conlleva a la producción de ácido láctico, lo cual se observa en la sección ascendente del modelo (Di Biase *et al.*, 2022). Finalmente, el crecimiento se desacelera y se estabiliza, reflejando la acumulación de productos de desecho que pueden inhibir el desarrollo, lo que corresponde a la fase estacionaria del modelo de Gompertz (Łepecka *et al.*, 2018). Esta metodología permite predecir el comportamiento de las BAL bajo diferentes condiciones, lo que es fundamental en procesos de fermentación.

A pesar de las diferentes matrices desde las que fue posible aislar cepas de *Weissella confusa* (suelo, musgo y líquen antártico), los resultados no evidencian mayores diferencias. Esta aparente falta de impacto de origen o hábitat sobre los resultados podría indicar que las cepas se adaptan a diversos microambientes sin comprometer su funcionalidad (Faillace *et al.*, 2021). Sin embargo, también evidencia cómo el entorno influye en la evolución de estas bacterias y su capacidad para preservar características específicas en condiciones extremas (Hoffmann y Sgrò, 2011). Este resultado sugiere que factores intrínsecos, como la genética y la respuesta frente a estímulos ambientales podrían desempeñar un papel determinante en las propiedades funcionales de las cepas de *Weissella confusa* (Gibert *et al.*, 2019). Estos hallazgos subrayan la necesidad de realizar investigaciones adicionales para comprender mejor los mecanismos que podrían estar regulando la variabilidad fenotípica en estas bacterias en entornos extremos (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2013). La elección de condiciones de cultivo mesofílicas podría haber restringido la recuperación de cepas psicrotolerantes, potencialmente más representativas del ambiente antártico. Además, la dependencia exclusiva de la absorbancia compromete la discriminación entre la biomasa viva y muerta.

Los resultados obtenidos con el kit API 50CH destacan la relevancia de *Weissella confusa*, la cepa más frecuentemente identificada en este estudio. Esto sugiere que tiene una notable adaptabilidad en el entorno analizado, lo que podría explicar su predominancia. Las pruebas de resistencia ambiental muestran que *Weissella confusa* crece mejor entre 25 y 35°C, tolera concentraciones de NaCl de 2 a 4% y se desarrolla en un rango de pH de 6,0 a 7,0. Estas condiciones favorables respaldan su identificación frecuente y sugieren que podría desempeñar un papel importante en la remediación biológica de suelos y aguas residuales. Además, su hidrofobicidad superior al 50% indica su capacidad para adherirse a superficies, un rasgo valioso en aplicaciones ambientales. La sinergia entre los hallazgos del kit API y las pruebas de resistencia proporciona una base sólida para futuras investigaciones. Al establecer a *Weissella confusa* como un referente, se abrirán nuevas oportunidades para explorar sus características y aplicaciones en la biotecnología, especialmente en contextos de biorremediación. La combinación de su aislamiento frecuente y sus condiciones de crecimiento favorables la convierte en un candidato prometedor para estudios futuros en el ámbito ambiental.

La relación entre la recombinación genética y la plasticidad fenotípica es fundamental para entender cómo los organismos se adaptan a su entorno. La recombinación genética genera variabilidad al intercambiar material genético, lo que es crucial para la evolución y permite nuevas combinaciones de genes que pueden presentar ventajas adaptativas (Yoon *et al.*, 2023). Por otro lado, la plasticidad fenotípica se refiere a la capacidad de un organismo para cambiar su fenotipo en respuesta a variaciones ambientales sin alterar su composición genética. La mayor diversidad genética resultante de la recombinación puede facilitar esta plasticidad (Hoffmann y Sgrò, 2011). Además, en entornos cambiantes, esta característica permite a los organismos adaptarse rápidamente, mientras que la variabilidad genética aumenta la probabilidad de que surjan variantes con características favorables. Así, ambos procesos están interrelacionados, permitiendo a las especies afrontar cambios ambientales y sobrevivir en ecosistemas extremos (Faillace *et al.*, 2021).

Las cepas de *Weissella* destacan por su capacidad para generar una variedad de metabolitos que tienen múltiples aplicaciones en diferentes industrias. Entre sus productos más destacados se encuentra el ácido láctico, que no solo actúa como conservante, sino que también por sus aplicaciones biotecnológicas (Adebayo *et al.*, 2018). Además, estas cepas son conocidas por producir exopolisacáridos, que pueden servir como espesantes en la industria alimentaria y como prebióticos, favoreciendo la salud intestinal. También se ha observado que generan compuestos antioxidantes, lo que los convierte en aliados en la creación de alimentos funcionales que ayudan a combatir el estrés oxidativo (Heperkan *et al.*, 2020). En el ámbito de la fermentación, su papel en la elaboración de diversos productos resalta su importancia, ya que enriquecen no solo el sabor sino también el valor nutricional de los alimentos.

Analizar las características de las especies revela su gran potencial en bioprocesos y en la reutilización de residuos (Lian *et al.*, 2024). Estas bacterias son destacadas por su habilidad para fermentar diferentes tipos de carbohidratos y otros compuestos, lo que es esencial para transformar residuos orgánicos en productos útiles. Por ejemplo, se ha reportado la capacidad de *Enterococcus* para producir antimicrobianos (Ozkan *et al.*, 2021). *Pediococcus* también contribuye a la producción de ácido láctico inhibiendo la actividad patogénica (Du *et al.*, 2022). Además, la capacidad para descomponer compuestos complejos podría aprovecharse para convertir residuos en bioproductos útiles, como biocombustibles o fertilizantes orgánicos (De Brito *et al.*, 2024). Por otro lado, *Weissella* es conocida por generar exopolisacáridos y antioxidantes, que no solo mejoran la calidad de los productos obtenidos a través de la fermentación, sino que también pueden ofrecer beneficios para la salud (Heperkan *et al.*, 2020). Sin embargo, al considerar, hay desafíos a tener en cuenta. Es fundamental optimizar las condiciones de cultivo para lograr el mejor rendimiento y asegurar la estabilidad del proceso, ya que la competencia con otra microflora puede ser un factor que afecte su eficacia (Sakandar y Zhang, 2022). Por lo tanto, es crucial discutir cómo estas bacterias pueden contribuir a la sostenibilidad y eficiencia de los bioprocesos, así como su papel en la valorización de residuos (Tilwani *et al.*, 2022). Esto no solo podría abrir nuevas oportunidades para la

producción de bioproductos, sino también ayudar a mitigar los impactos ambientales asociados con la gestión de residuos, promoviendo un enfoque más circular y sostenible en la industria (Ibrahim *et al.*, 2022). De esta manera, los metabolitos que producen estas cepas las convierten en una opción prometedora para el desarrollo de productos innovadores.

### **3.4. Conclusiones**

Se consiguió aislar y caracterizar bioquímica y molecularmente bacterias lácticas a partir de diferentes matrices antárticas, con un alto porcentaje de positividad en la identificación, alcanzando valores de hasta 100% para algunas cepas de *Weissella confusa*. Los resultados obtenidos muestran que las bacterias lácticas seleccionadas de *Weissella confusa* tienen una hidrofobicidad superficial media/alta, y pueden crecer en diferentes condiciones de salinidad del 2-4%, temperaturas óptimas de 25-35°C y un rango de pH de 6,0 a 7,0. Estas características las convierten en prometedoras candidatas para diversas aplicaciones biotecnológicas, como agentes biológicos de remediación para el tratamiento de suelos y aguas residuales. Además, los hallazgos obtenidos hacen evidente la necesidad de realizar investigaciones adicionales para comprender mejor los mecanismos que podrían estar regulando la variabilidad fenotípica en las bacterias seleccionadas en entornos extremos.

El enfoque unifactorial utilizado en el estudio para evaluar la resistencia de las cepas de BAL tiene varias limitaciones importantes. Al analizar una sola condición a la vez, como temperatura, salinidad o pH, no se logra captar la complejidad de las interacciones que ocurren en la naturaleza. En la práctica, los microorganismos enfrentan múltiples factores simultáneamente, y un alto contenido de sal en un medio ácido podría afectar su crecimiento de manera diferente a como lo harían estas condiciones por separado. La microbiología ha demostrado que las respuestas de las bacterias a combinaciones de estrés pueden variar considerablemente, lo que significa que un enfoque unifactorial podría llevar a conclusiones erróneas sobre la capacidad de adaptación y robustez de las

cepas. Por ello, un diseño multifactorial sería más beneficioso, ya que permitiría estudiar cómo interactúan factores como salinidad y pH y afectan variables como el crecimiento y la producción de exopolisacáridos. Este enfoque no solo ofrecería una comprensión más completa del comportamiento de las cepas en condiciones reales, sino que también facilitaría la identificación de patrones útiles para optimizar los procesos de fermentación y mejorar la calidad de los productos finales. En un contexto donde la sostenibilidad y la eficiencia son clave, entender estas interacciones puede ser fundamental para el desarrollo de productos más resistentes y efectivos.

### 3.5. Referencias

- Abdul Aziz, M., Brini, F., Rouached, H., & Masmoudi, K. 2022. Genetically engineered crops for sustainably enhanced food production systems. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1027828. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1027828>
- Abiona, S. O., Adegoke, G. O. 2017. Molecular characteristics of probiotics lactic acid bacteria isolated from soursop, cowmilk, goatmilk yoghurts and cheese. *Journal of Food Biotechnology Research* 1 (1), 7.
- Adebayo-Tayo, B., Ishola, R., & Oyewunmi, T. 2018. Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 19, e00271. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00271>
- Akpogheli, P. O., Edo, G. I., Ali, A. B. M., Yousif, E., Zainulabdeen, K., Owheru, J. O., Isoje, E. F., Igbuku, U. A., Essaghah, A. E. A., Makia, R. S., Ahmed, D. S., Umar, H., & Alamiery, A. A. 2025. Lactic acid bacteria: Nature, characterization, mode of action, products and applications. *Process Biochemistry (Barking, London, England)*, 152, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.02.010>
- Ali, P., Fucich, D., Shah, A. A., Hasan, F., & Chen, F. (2021). Cryopreservation of Cyanobacteria and Eukaryotic Microalgae Using Exopolysaccharide Extracted from a

- Glacier Bacterium. *Microorganisms*, 9(2), 395.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9020395>
- Almohammadi, A. R., Abdel-Shafi, S., Tartour, E., Enan, G. 2022. Inhibitory action of three lactic acid bacteria cultures on some food-borne pathogens during pickling of green olive fruits. *Heliyon*, 8 (11), e11693. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11693>.
- Anumudu, C. K., Miri, T., & Onyeaka, H. 2024. Multifunctional Applications of Lactic Acid Bacteria: Enhancing Safety, Quality, and Nutritional Value in Foods and Fermented Beverages. *Foods*, 13(23), 3714. <https://doi.org/10.3390/foods13233714>
- Axelsson, L., 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. S. Salminen, A. V. Wright and Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* (3rd ed.), Marcel Dekker Inc, New York, pp. 1-67. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>.
- Camesasca, L., de Mattos, J. A., Vila, E., Cebreiros, F., Lareo, C. 2021. Lactic acid production by *Carnobacterium* sp. isolated from a maritime Antarctic lake using eucalyptus enzymatic hydrolysate. *Biotechnology Reports*, 31, e00643. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00643>.
- Carpenter, C. E., & Broadbent, J. R. 2009. External concentration of organic acid anions and pH: key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acidic foods. *Journal of Food Science*, 74(1), R12-5. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00994.x>.
- Chen, C., Xiong, Y., Xie, Y., Zhang, H., Jiang, K., Pang, X. N., Huang, M. 2022. Metabolic characteristics of lactic acid bacteria and interaction with yeast isolated from light-flavor Baijiu fermentation. *Food Bioscience*, 50 (Part A), 102102. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102102>.
- Chrysanthopoulos, S., Coutinho, J., Silva, A. C., Brito, L., & Figueiro, D. 2024. Agro-industrial by-products as alternative additives for the agronomic valorization of pig slurry through pH modification. *Journal of Cleaner Production*, 434(140052), 140052. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.140052>

- Deming, J. W., & Young, J. N. 2017. The role of exopolysaccharides in microbial adaptation to cold habitats. In *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology* (pp. 259–284). Springer International Publishing.
- Di Biase, M., Le Marc, Y., Bavaro, A. R., Lonigro, S. L., Verni, M., Postollec, F., & Valerio, F. 2022. Modeling of growth and organic acid kinetics and evolution of the protein profile and amino acid content during *Lactiplantibacillus plantarum* ITM21B fermentation in liquid sourdough. *Foods*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/foods11233942>.
- De Brito, L. P., da Silva, E. C., Lins, L. F., Severo de Medeiros, R., Silva, F. C. O., Pastrana, L., Cavalcanti, I. D. L., de Britto Lira-Nogueira, M. C., Cavalcanti, M. T. H., & Porto, A. L. F. 2024. Optimization, structural characterization, and biological applications of exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecium* KT990028. *International Journal of Biological Macromolecules*, 282(136926), 136926. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136926>
- Dennis, D., Nasution, M., & Simatupang, Y. 2020. Effectiveness of star fruit leaf extract on the growth of streptococcus sanguinis: An in vitro study. *World Journal of Dentistry*, 11(3), 196–200. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10015-1731>
- Domingos-Lopes, M., Stanton, C., Ross, P., Dapkevicius, M., Silva, C. 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology* 63, 178-190. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.014>.
- Du, R., Ping, W., & Ge, J. 2022. Purification, characterization and mechanism of action of enterocin HDX-2, a novel class IIa bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* HDX-2. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 153(112451), 112451. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112451>
- Elsanhoty, R. M., Ramadan, M. F. 2016. Genetic screening of biogenic amines production capacity from some lactic acid bacteria strains. *Food Control*, 68, 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.002>.

- Etyemez, M., Balcazar, J. L. 2016. Isolation and characterization of bacteria with antibacterial properties from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Research in Veterinary Science*, 105, 62-64. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.01.019>.
- Faillace, C. A., Sentis, A., & Montoya, J. M. 2021. Eco-evolutionary consequences of habitat warming and fragmentation in communities. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 96(5), 1933–1950. <https://doi.org/10.1111/brv.12732>.
- Fernández, M. F., Boris, S., & Barbés, C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3), 449–455. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01850.x>.
- Ferrer, F., Pinuer, L., Cancino, A. G., & Yáñez, R. B. 2015. Effect of pH and dilution rate on specific production rate of extra cellular metabolites by *Lactobacillus salivarius* UCO\_979C in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), 6417–6429. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6526-0>
- Fguiri, I., Atigui, M., Ziadi, M., Arroum, S. and Khorchani, T. 2015. Biochemical and molecular identification of lactic acid bacteria isolated from camel milk in Tunisia. *Emir. J. Food Agric.* 27(9): 716-720.
- Franzmann, P. D., Höpfl, P., Weiss, N., & Tindall, B. J. 1991. Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 156 (4), 255–262. <https://doi.org/10.1007/BF00262994>.
- Furhan, J. 2020. Adaptation, production, and biotechnological potential of cold-adapted proteases from psychrophiles and psychrotrophs: recent overview. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 18(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00053-7>
- García, A., Henríquez, P., Retamal, C., Pineda, S., Delgado, C., González, C. 2009. Propiedades probióticas de *Lactobacillus spp* aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *Helicobacter pylori*. *Revista médica de Chile* 137 (3), 369-376. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009000300007>.

- George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F. J., Revol-Junelles, A.-M., Borges, F., & Foligné, B. 2018. Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: A multifaceted functional health perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2899. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02899>
- Gibert, P., Debat, V., & Ghalambor, C. K. 2019. Phenotypic plasticity, global change, and the speed of adaptive evolution. *Current Opinion in Insect Science*, 35, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.06.007>.
- Gioelli, F., Grella, M., Scarpeci, T. E., Rollè, L., Pierre, F. D., & Dinuccio, E. 2022. Bio-Acidification of Cattle Slurry with Whey Reduces Gaseous Emission during Storage with Positive Effects on Biogas Production. *Sustainability*, 14(19), 12331. <https://doi.org/10.3390/su141912331>
- Gou, Y., Yang, S., Cheng, Y., Song, Y., Qiao, P., Li, P., Ma, J. 2019. Enhanced anoxic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aged soil pretreated by hydrogen peroxide. *Chemical Engineering Journal*, 356, 524-533. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.09.059>.
- Gran-Scheuch, A., Fuentes, E., Bravo, D.M., Jiménez, J.C., Pérez-Donoso, J.M. 2017. Isolation and Characterization of Phenanthrene Degrading Bacteria from Diesel Fuel-Contaminated Antarctic Soils. *Front. Microbiology*, 8, 1634. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01634>.
- Hang, Y., Wei, X., Ling, J., Baloch, S., Xu, X., Fang, X. 2019. Microbial diversity and chemical analysis of Shuidouchi, traditional Chinese fermented soybean. *Food Research International*, 116, 1289-1297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.018>.
- Heperkan, Z. D., Bolluk, M., & Bülbül, S. 2020. Structural analysis and properties of dextran produced by *Weissella confusa* and the effect of different cereals on its rheological characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.036>
- Hoffmann, A. A., & Sgrò, C. M. 2011. Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470(7335), 479–485. <https://doi.org/10.1038/nature09670>.

- Hossain, Khondoker & Mazumder, Bipasha & Rahman, SMM & Hamid, Dr. Mohammad. 2021. Genetic diversity analysis of lactic acid bacteria isolated from regional yogurt samples. *Bangladesh Journal of Livestock Research*. 55-63. <https://doi.org/10.3329/bjlr.v27i1.55169>.
- Hu, Y., Gänzle, M. G. 2018. Effect of temperature on production of oligosaccharides and dextran by *Weissella cibaria* 10 M. *International Journal of Food Microbiology*, 280, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.003>.
- Huët, M. A. L., Puchooa, D. 2017. Bioremediation of heavy metals from aquatic environment through microbial processes: A potential role for probiotics? *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 5 (6), 14-23. <http://dx.doi.org/10.7324/JABB.2017.50603>.
- Ibrahim, H. A. H., Abou Elhassayeb, H. E., & El-Sayed, W. M. M. 2022. Potential functions and applications of diverse microbial exopolysaccharides in marine environments. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 20(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00432-2>
- Isas, A. S., Escobar, F., Álvarez-Villamil, E., Molina, V., Mateos, R., Lizarraga, E., Mozzi, F., Van Nieuwenhove, C. 2023. Fermentation of pomegranate juice by lactic acid bacteria and its biological effect on mice fed a high-fat diet. *Food Bioscience* 53, 102516. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102516>.
- Jin, S., Wang, Y., & Zhao, X. 2022. Cold-adaptive mechanism of psychrophilic bacteria in food and its application. *Microbial Pathogenesis*, 169(105652), 105652. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105652>
- Kavitake, D., Devi, P. B., Shetty, P. H. 2020. Overview of exopolysaccharides produced by *Weissella* genus – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2964-2973. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.185>.
- Ketema, B., Tetemke, M., & Mogessie, A. 2009. In-vitro probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from 'wakalim', a traditional Ethiopian fermented beef sausage. <https://repository.ju.edu.et/handle/123456789/941>.

- Korcz, E., Varga, L. 2021. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry, *Trends in Food Science & Technology*, 110, 375-384. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014>.
- Kosiorek, K., Grzesiak, J., Gawor, J., Sałańska, A., & Aleksandrak-Piekarczyk, T. 2024. Polar-region soils as novel reservoir of lactic acid bacteria from the genus *Carnobacterium*. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9444. <https://doi.org/10.3390/ijms25179444>
- Kowsalya, M., Sudha, K. G., Ali, S., Velmurugan, T., Karunakaran, G., & Prasanna Rajeshkumar, M. 2022. In-vitro assessment of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented rice gruel of South India: Lactic acid bacteria from fermented rice gruel. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 12(1), e4908. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.4908>
- Krishnan, A., Convey, P., Gonzalez-Rocha, G., Alias, S.A. 2016. Production of extracellular hydrolase enzymes by fungi from King George Island. *Polar Biology*, 39 (1), 65-76.
- Le Marrec, C. 2011. Responses of lactic acid bacteria to osmotic stress. pp: 67-90. In: E. Tsakalidou and K. Papadimitriou (Eds.). *Stress responses of lactic acid bacteria*. Springer. New York, USA. [http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8_4).
- Lee, M., Kim, D., Choi, E. J., Song, J. H., Kang, J. Y., Lee, K. W., Chang, J. Y. 2023. Transcriptome responses of lactic acid bacteria isolated from kimchi under hydrogen peroxide exposure. *Food Research International*, 168, 112681. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.1>.
- Łepecka, A., Szymański, P., Rutkowska, S., Iwanowska, K., & Kołożyn-Krajewska, D. 2021. The influence of environmental conditions on the antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from fermented meat products. *Foods*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/foods1010226712681>.
- Lian, T., Zhang, W., Cao, Q., Yin, F., Wang, S., Zhou, T., Wei, X., Zhang, F., Zhang, Z., & Dong, H. 2024. Enzyme enhanced lactic acid fermentation of swine manure and apple waste: Insights from organic matter transformation and functional bacteria.

- Journal of Environmental Management, 356, 120573.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120573>
- Liang, N., Zhao, Z., Curtis, J. M., Gänzle, M. G. 2022. Antifungal cultures and metabolites of lactic acid bacteria for use in dairy fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 383, 109938. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109938>.
- Liu, P., Yang, Z.-Q., Jin, C.-Z., Li, T., Jin, F.-J., Lee, H.-G., Lee, C. S., & Jin, L. 2024. Antifungal activity of metabolites of *Weissella cibaria* KM14 isolated from traditional Korean food kimchi against three spoilage fungi. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie (Food Science and Technology)*, 205(116545), 116545. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116545>.
- Madushanka, D., Vidanarachchi, J. K., Kodithuwakku, S., Nayanajith, G. R. A., Jayatilake, S., & Priyashantha, H. 2025. Isolation and characterization of probiotic lactic acid bacteria from fermented traditional rice for potential applications in food and livestock production. *Applied Food Research*, 5(1), 100865. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.100865>
- Makarova, K. S., & Koonin, E. V. 2006. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1199–1208. <https://doi.org/10.1128/JB.01351-06>.
- Margesin, Rosa. 2017. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*. 10.1007/978-3-319-57057-0.
- Mollea, C., Marmo, L., & Bosco, F. 2013. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. London: INTECH. <http://dx.doi.org/10.5772/53159>.
- Mora-Villalobos, J.A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., López-Gómez, J.P. 2020. Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation* 6 (1), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Júnior, A. S., & Nero, L. A. 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 109–112. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000100015>.

- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Mancilha, I. M., Roberto, I. C. 2008. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *Biochem. Eng. J.*, 40 (3), 437-444. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.01.013>.
- Niu, K., Kim, J.-H., Kothari, D., Wang, R., Zhai, Z., Sheng, P., Ji, S., Singh, D., & Kim, S.-K. 2025. Probiogenomic analysis of an autochthonous *Lactobacillus plantarum* SK4719 from Chinese chives reveals its adaptive stress response. *Food Science and Technology*, 223(117701), 117701. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.117701>
- Novik, G., & Savich, V. 2020. Beneficial microbiota. Probiotics and pharmaceutical products in functional nutrition and medicine. *Microbes and Infection*, 22(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.06.004>
- Nsogning, S. D., Fischer, S., & Becker, T. 2018. Investigating on the fermentation behavior of six lactic acid bacteria strains in barley malt wort reveals limitation in key amino acids and buffer capacity. *Food Microbiology*, 73, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.010>.
- O'Brien, A., Sharp, R., Russell, N., Roller, S. 2004. Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. *FEMS Microbiology Ecology* 48 (2), 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.01.001>.
- Olivares, F., Tapia, R., Gálvez, C., Meza, F., Barriga, G. P., Borrás-Chavez, R., Mena-Vasquez, J., Medina, R. A., & Neira, V. 2019. Novel penguin Avian avulaviruses 17, 18 and 19 are widely distributed in the Antarctic Peninsula. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66 (6), 2227–2232. <https://doi.org/10.1111/tbed.13309>.
- Özkan, E. R., Demirci, T., & Akin, N. 2021. In vitro assessment of probiotic and virulence potential of *Enterococcus faecium* strains derived from artisanal goatskin casing Tulum cheeses produced in central Taurus Mountains of Turkey. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 141(110908), 110908. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110908>
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M. S., Cornwell, W. K., Craine, J. M., Gurvich, D. E., Urcelay, C., Veneklaas, E. J., Reich, P. B., Poorter, L., Wright, I. J., Ray, P., Enrico, L., Pausas, J. G., de Vos,

- A. C., Cornelissen, J. H. C. 2013. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 61(3), 167. <https://doi.org/10.1071/bt12225>.
- Prado, J., Chieppe, J., Raymundo, A., Figueiro, D. 2020. Bio-acidification and enhanced crusting as an alternative to sulphuric acid addition to slurry to mitigate ammonia and greenhouse gases emissions during short term storage. *Journal of Cleaner Production*, 263(121443), 121443. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121443>
- Ramasamy, K. P., Mahawar, L., Rajasabapathy, R., Rajeshwari, K., Miceli, C., & Pucciarelli, S. 2023. Comprehensive insights on environmental adaptation strategies in Antarctic bacteria and biotechnological applications of cold adapted molecules. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1197797>.
- Rawoof, S. A. A., Kumar, P. S., Vo, D.-V. N., Devaraj, K., Mani, Y., Devaraj, T., & Subramanian, S. 2021. Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), 539–556. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01083-w>.
- Sakandar, H. A., & Zhang, H. 2021. Trends in Probiotic(s)-Fermented milks and their in vivo functionality: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.054>
- Sánchez-Pascuala, A., de Lorenzo, V., & Nikel, P. I. 2017. Refactoring the Embden-Meyerhof-Parnas pathway as a whole of portable GlucoBricks for implantation of glycolytic modules in gram-negative bacteria. *ACS Synthetic Biology*, 6(5), 793–805. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00230>
- Santa-Cruz Vásquez, Y. M., Barbosa Gomes, M., Rodrigues e Silva, T., Fernandes Duarte, A. W., Henrique Rosa, L., de Oliveira, V. M. 2021. Cold-adapted chitinases from Antarctic bacteria: Taxonomic assessment and enzyme production optimization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 34, 102029. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102029>.
- Sathyanarayana Reddy, G., Chattopadhyay, M. K., & Shivaji, S. 2016. Biodiversity, Adaptation and Biotechnological Importance of Bacteria Occurring in Cold Climates.

- Rampelotto (Ed.) *Biotechnology of Extremophiles: Grand Challenges in Biology and Biotechnology*. Vol.1, Springer Cham. Pp. 47–81.
- Sedó-Molina, G. E., Shetty, R., Xiao, H., Wätjen, A. P., Tovar, M., Bang-Berthelsen, C. H. 2022. Development of a novel lactic acid bacteria starter culture approach: From insect microbiome to plant-based fermentations. *LWT*, 167, 113797. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113797>.
- Shivaji, S., Reddy, G. S. N., & Chattopadhyay, M. K. 2017. Bacterial biodiversity, cold adaptation and biotechnological importance of bacteria occurring in Antarctica. *Proceedings of the Indian National Science Academy. Part A. Physical Sciences*, 90(0). <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2017/48956>.
- Silva, N. B., Longhi, D. A., Martins, W. F., Laurindo, J. B., Aragão, G. M. F., Carciofi, B. A. M. 2017. Modeling the growth of *Lactobacillus viridescens* under non-isothermal conditions in vacuum-packed sliced ham. *International Journal of Food Microbiology*, 240, 97-101. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.014>.
- Sirichokchatchawan, W., Pupa, P., Praechansri, P., Am-in, N., Tanasupawat, S., Sonthayanon, P., Prapasarakul, N. 2018. Autochthonous lactic acid bacteria isolated from pig faeces in Thailand show probiotic properties and antibacterial activity against enteric pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis* 119, 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.031>.
- Smykla, J., Drewnik, M., Szarek-Gwiazda, E., Hii, Y. S., Knap, W., Emslie, S. D. 2015. Variation in the characteristics and development of soils at Edmonson Point due to abiotic and biotic factors, northern Victoria Land, Antarctica. *CATENA*. 132, 56-67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.catena.2015.04.011>.
- Thayer, D. W., Muller, W. S., Buchanan, R. L., & Phillips, J. G. 1987. Effect of NaCl, pH, temperature, and atmosphere on growth of *Salmonella typhimurium* in glucose-mineral salts medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (6), 1311–1315. <https://doi.org/10.1128/aem.53.6.1311-1315.1987>.
- Tilwani, Y. M., Lakra, A. K., Domdi, L., Jha, N., & Arul, V. 2022. Characterization of potential probiotic bacteria *Enterococcus faecium* MC-5 isolated from the gut content

- of *Cyprinus carpio specularis*. *Microbial Pathogenesis*, 172(105783), 105783.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105783>
- Van Dorst, J., Wilkins, D., Crane, S., Montgomery, K., Zhang, E., Spedding, T., Hince, G., Ferrari, B. 2021. Microbial community analysis of biopiles in Antarctica provides evidence of successful hydrocarbon biodegradation and initial soil ecosystem recovery. *Environmental Pollution*, 290, 117977. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117977>.
- Vargas-Chacoff, L., Muñoz, J. L. P., Hawes, C., Oyarzún, R., Pontigo, J. P., Saravia, J., González, M. P., Morera, F. J., Labbé, B. S., Bertrán, C., Mardones, O., Pino, J., & Wadsworth, S. 2016. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) display differential metabolic changes in response to infestation by the ectoparasite *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, 464, 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.029>.
- Vasmara, C., Marchetti, R., Carminati, D. 2021. Wastewater from the production of lactic acid bacteria as feedstock in anaerobic digestion. *Energy*, 229, 120740. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.120740>.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>.
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. 2021. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>. Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. 2021b. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

- Weisburg, W., G., Barns, S., M., Pelletier, D., A. & Lane, D.J. 1991. Amplificación del ADN ribosómico 16S para el estudio filogenético. *Journal of Bacteriology*, 173 (2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
- Yoon, K., Cunningham, C., Bretman, A., Duncan, E. One genome, multiple phenotypes: decoding the evolution and mechanisms of environmentally induced developmental plasticity in insects. *Biochemical Society Transactions*, Volume 51, Issue 2, 2023, 675-689, ISSN 1470-8752, <https://doi.org/10.1042/BST20210995>.
- Zapašnik, A., Sokołowska, B., & Bryła, M. 2022. Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1283. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>
- Zhang, K., Liu, S., Liang, S., Xiang, F., Wang, X., Lian, H., Li, B., & Liu, F. 2024. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, biological activity, structure-activity relationship, and application in the food industry: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 257, 128733. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128733>.
- Zhao, J., Jing, Y., Zhang, J., Sun, Y., Wang, Y., Wang, H., & Bi, X. 2019. Aged refuse enhances anaerobic fermentation of food waste to produce short-chain fatty acids. *Bioresource Technology*, 289(121547), 121547. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121547>
- Zhao, X., Tang, F., Cai, W., Peng, B., Zhang, P., & Shan, C. 2023. Effect of fermentation by lactic acid bacteria on the phenolic composition, antioxidant activity, and flavor substances of jujube–wolfberry composite juice. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 184(114884), 114884. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114884>
- Zou, F., Huo, Y., Gao, W., Dai, M., Zhao, G., & Zhang, S. 2024. Physicochemical, microbiological and sensory characterization of yogurt fermented by *Weissella confusa* SW1 and traditional starters. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie. Food Science and Technology*, 201(116229), 116229. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116229>.

- Zucconi, L., Fierro-Vásquez, N., Antunes, A., Bendia, A. G., Lavin, P., González-Aravena, M., Sani, R. K., & Banerjee, A. 2025. Advocating microbial diversity conservation in Antarctica. *Npj Biodiversity*, 4(1), 5. <https://doi.org/10.1038/s44185-025-00076-8>
- Zúñiga, C., Leiva, D., Ramírez-Fernández, L., Carú, M., Yahr, R., Orlando, J., 2015. Phylogenetic Diversity of Peltigera Cyanolichens and Their Photobionts in Southern Chile and Antarctica. *Microbes and Environments* 30 (2), 172-179. <https://doi.org/10.1264%2Fjsme2.ME14156>.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (6), 1875-1881. <https://doi.org/10.1128%2Faem.56.6.1875-1881.1990>.

## **CAPÍTULO IV: Evaluación del uso de bacterias ácido lácticas provenientes de Antártica en el tratamiento de aguas residuales agropecuarias**

### **Resumen**

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial de bacterias ácido lácticas aisladas desde Antártica, en purín de cerdo mezclado con suero de queso. Se evaluó la actividad antimicrobiana, hidrofobicidad, demanda química de oxígeno, producción de exopolisacáridos; además la caracterización fisicoquímica y microbiológica del producto de fermentación y un ensayo de fitotoxicidad con semillas de *Raphanus sativus* permitió evaluar los efectos del fermentado sobre el crecimiento de las plantas. Los resultados reflejaron que *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium* destacaron en los experimentos por su capacidad de inhibir patógenos, ser altamente hidrofóbicas, producir exopolisacáridos en un medio complejo, además de promover el desarrollo de las semillas. Esto indica un efecto bioestimulante dotado por los metabolitos bacterianos y la elevada biodisponibilidad de nutrientes claves después de la fermentación. En conjunto, este trabajo fusiona un análisis que involucra parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y agronómicos, demostrando que algunas bacterias ácido lácticas antárticas presentan un alto potencial para la bioconversión de purines en biofertilizantes. Los resultados preliminares indican que, de las cepas estudiadas, especialmente *E. faecium* podría utilizarse como alternativa sostenible al manejo de residuos agroindustriales. Este enfoque abre un horizonte para futuras investigaciones que busquen optimizar su uso a escala industrial, contribuyendo a una agricultura más sustentable y amigable con el medio ambiente.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas, tratamiento de purines de cerdo, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecium*, exopolisacáridos.

## 4.1. Introducción

La biotecnología ha avanzado notablemente en las últimas décadas, promoviendo el uso de microorganismos en diversas aplicaciones industriales, medioambientales y de salud (Jiang *et al.*, 2019). Un área de interés creciente es el tratamiento de residuos y su revalorización mediante métodos biológicos como alternativas sostenibles a tecnologías convencionales (Martha-Lucero *et al.*, 2023). En este contexto, las bacterias lácticas han cobrado relevancia por su papel en procesos fermentativos y su capacidad de producir compuestos antimicrobianos (Serrano *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, estas bacterias se han utilizado en la industria alimentaria, pero investigaciones recientes han mostrado su potencial en aplicaciones ambientales, incluyendo la biorremediación de aguas residuales (Bravo *et al.*, 2020). Este capítulo se centra en el uso de bacterias lácticas para el tratamiento de efluentes agropecuarios, como el purín de cerdo y el suero de queso, buscando una solución sostenible que aumente la biodisponibilidad de la materia orgánica y mejore la calidad del agua tratada (El-Sheshtawy *et al.*, 2022).

El tratamiento de aguas residuales agroindustriales con métodos biológicos es prometedor debido a la disminución del impacto ambiental y a la posibilidad de convertir desechos en productos con valor agregado (Meléndez *et al.*, 2018).

La industria porcina genera grandes cantidades de purín, un residuo líquido con alta carga de materia orgánica y nutrientes, llegando a contener 37.643 mg/L de DQO, 2.050 mg/L de nitrógeno total y 620 mg/L de fósforo total (López-Sánchez *et al.*, 2022). A modo de ejemplo, en 2023, sólo en Brasil se produjeron alrededor de 4 millones de toneladas de carne porcina, lo que resultó en una generación considerable de purines (USDA, 2024). Es por ello, que, si no se gestiona adecuadamente, puede causar eutrofización y contaminación (Tortajada, 2021). De manera similar, el suero de queso, rico en proteínas y lactosa, representa un reto ambiental si se descarga sin tratamiento (Zhang *et al.*, 2024). Este producto presenta concentraciones de DQO de 77.900 mg/L, nitrógeno total de 1.400 mg/L y 464 mg/L de fósforo total (Stratigakis *et al.*, 2024).

Estos residuos plantean desafíos para la industria de alimentos, ya que los métodos convencionales de tratamiento suelen ser costosos y no siempre logran reducir eficazmente la carga de contaminantes (Alva-Araujo *et al.*, 2021). En este sentido, las bacterias lácticas, especialmente las que provienen de ambientes extremos como la Antártica, ofrecen una alternativa novedosa para la biorremediación por sus amplias capacidades de adaptación (Balboa-Luna y Vergara-González, 2021).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) antárticas han despertado el interés científico por su capacidad de adaptarse a condiciones extremas, lo que las hace atractivas para aplicaciones que requieren alta resiliencia, como en el caso del tratamiento de aguas residuales agropecuarias (Krishnan *et al.*, 2016). Su capacidad para mantenerse activas en condiciones adversas les otorga una ventaja en la biorremediación, especialmente en regiones con mayor variabilidad climática, donde los métodos convencionales pierden eficiencia (Chen *et al.*, 2022). Esto implica que algunas BAL pueden degradar compuestos orgánicos complejos del purín y suero, transformándolos en productos menos dañinos o en compuestos de interés biotecnológico como las bacteriocinas o los exopolisacáridos (Krishnan *et al.*, 2016).

El uso de BAL en el tratamiento de residuos agroindustriales ha ganado respaldo científico, reflejando potencial en la valorización de efluentes y la mejora de la sostenibilidad agrícola. Estas bacterias son efectivas en la fermentación de residuos, como el purín de cerdo, en donde pueden transformar compuestos orgánicos complejos en productos más simples y útiles. Este proceso, además de aumentar la biodisponibilidad orgánica, permite recuperar nutrientes esenciales que pueden ser reutilizados en la agricultura (Rama *et al.*, 2019; Patel *et al.*, 2021). Numerosos estudios han respaldado la capacidad de las BAL para metabolizar azúcares y otros compuestos presentes en los residuos agropecuarios. Por ejemplo, la fermentación de lactosa, produce ácido láctico, lo que no solo mejora la calidad del producto alimenticio, sino que también disminuye la carga orgánica del efluente (Li *et al.*, 2020). La implementación de BAL en la biorremediación de aguas residuales ha mostrado resultados prometedores, evidenciando su eficacia en la biodisponibilidad de nutrientes (DQO) y reducción de

contaminantes (Vasmara *et al.*, 2021). Este respaldo indica la capacidad de las BAL para reducir microorganismos patógenos y mejorar la calidad del suelo. Estas bacterias no solo inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*, sino que también promueven el crecimiento de plantas al mejorar la disponibilidad de nutrientes (Akpogheli *et al.*, 2025). Su uso podría representar una alternativa viable a los fertilizantes inorgánicos, contribuyendo a prácticas agrícolas más sostenibles. Además, el desarrollo de tecnologías que integren el uso de BAL en sistemas de tratamiento de aguas residuales ha sido objeto de estudios recientes, sugiriendo que estas bacterias pueden ser clave en la implementación de economías circulares en el sector agropecuario. La valorización de residuos agroindustriales a través de la fermentación con BAL, permite no solo recuperar nutrientes sino también disminuir el impacto ambiental asociado a la gestión de estos residuos (De Jesús *et al.*, 2024).

El purín de cerdo, debido a su alto contenido de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, puede causar eutrofización en cuerpos de agua, lo que a su vez lleva a la proliferación de algas y la disminución de oxígeno en el agua, afectando negativamente la vida acuática (Trabue *et al.*, 2019). De manera similar, el suero de queso, aunque rico en nutrientes, presenta un reto cuando se descarga sin tratamiento, ya que puede causar problemas de contaminación orgánica en los cuerpos de agua receptores (Vasmara *et al.*, 2021). En consecuencia, la implementación de métodos de tratamiento biológico, como la biorremediación con bacterias lácticas, no solo contribuye a la mitigación de estos problemas ambientales, sino que también mejora la sostenibilidad de estas industrias (Krishnan *et al.*, 2016). Este enfoque ayuda a reducir la carga de materia orgánica y nutrientes en el agua tratada y ofrece la oportunidad de revalorizar residuos en productos útiles, como biofertilizantes o suplementos para alimentación animal (Camesasca *et al.*, 2021). La investigación sobre el uso de BAL para la biorremediación está aún en una etapa incipiente, con estudios que se han centrado principalmente en la producción de compuestos bioactivos bajo condiciones controladas (Paladhi *et al.*, 2022). Las bacterias ácido lácticas antárticas destacan por su capacidad de adaptación a condiciones extremas. En un lugar con escasez de vegetación, bajas temperaturas y

ciclos de congelación-descongelación, estos microorganismos han desarrollado mecanismos bioquímicos únicos que les permiten sobrevivir y prosperar (Shivaji *et al.*, 2017). A diferencia de las BAL tradicionales, que suelen ser más sensibles a cambios en su entorno, las cepas antárticas muestran resistencia a condiciones salinas, lo que las convierte en candidatas ideales para aplicaciones en la remediación ambiental y la recuperación de nutrientes desde efluentes agropecuarios (Shivaji *et al.*, 2017). Además, producen metabolitos beneficiosos, como el ácido láctico mencionado anteriormente, que además de mejorar la calidad de los alimentos, podría enriquecer los purines con nutrientes valiosos (Sánchez-Pascuala *et al.*, 2017; Anumudu *et al.*, 2024). Este potencial para metabolizar carbohidratos y transformar sustratos complejos en nutrientes más accesibles aumenta el valor agronómico de los purines, promoviendo la salud del suelo y apoyando prácticas agrícolas más sostenibles (Wang *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2023). Las BAL antárticas no solo son una fuente prometedora de innovación biotecnológica, sino que también representan una alternativa viable y amigable con el medio ambiente en comparación con las cepas convencionales, contribuyendo así a la economía circular y al aprovechamiento de residuos agroindustriales (Gou *et al.*, 2019; Mora-Villalobos *et al.*, 2020).

Se espera que la implementación de BAL se constituya como una alternativa innovadora para la biorremediación, destacando su capacidad de adaptación a condiciones extremas. En este contexto, se anticipa que la aplicación de BAL promoverá una hidrólisis eficiente de los compuestos presentes en el purín y suero, lo que resultará en aumento en la demanda química de oxígeno (DQO), como consecuencia de la actividad metabólica bacteriana (Camesasca *et al.*, 2021; Meruvu, 2023). Este incremento en la DQO señalará una mayor biodisponibilidad de compuestos orgánicos. Adicionalmente, se espera un aumento en la producción de exopolisacáridos, los cuales están relacionados con la estabilidad microbiana y la formación de biopelículas, elementos cruciales para la viabilidad y funcionalidad de las BAL en medios complejos.

La investigación actual sobre la utilización de BAL para la biorremediación se encuentra todavía en una fase inicial, con estudios enfocados en la producción de compuestos

bioactivos bajo condiciones controladas (Paladhi *et al.*, 2022). Sin embargo, este capítulo tiene como objetivo evaluar el funcionamiento de las BAL en la degradación de contaminantes orgánicos presentes en el purín de cerdo con el fin de generar agua tratada que pueda ser reutilizada como biofertilizante en fertirriego. Su uso podría complementar o reducir la necesidad de aplicar métodos convencionales de tratamiento, que suelen ser más costosos y demandan un mayor consumo de energía y químicos. El aprovechamiento de estos compuestos bioactivos en el proceso de biorremediación, además de tener un impacto positivo en la gestión de residuos agropecuarios, puede generar oportunidades para la biorremediación de metales pesados o hidrocarburos, ampliando la aplicabilidad en la gestión de residuos agroindustriales (Ameen *et al.*, 2020; Machado *et al.*, 2020).

En este estudio se prestará atención a la producción de bacteriocinas y exopolisacáridos. Las primeras son proteínas o péptidos antimicrobianos producidos de manera natural por bacterias que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o matar a otras bacterias, especialmente aquellas que son competidoras o patógenas (Yi *et al.*, 2022). Están siendo cada vez más reconocidas como compuestos potenciales en diversas aplicaciones de la biotecnología ambiental debido a sus propiedades antimicrobianas específicas y su capacidad para intervenir en la dinámica microbiana sin causar efectos negativos sobre el medio ambiente (Fischer *et al.*, 2024). En este contexto, las bacteriocinas pueden ser aprovechadas para tratar contaminantes, controlar microorganismos patógenos y mejorar procesos biológicos que favorecen la remediación ambiental (Gu, 2023). Por otra parte, los exopolisacáridos son secretados por algunas bacterias y tienen diversas aplicaciones industriales (Daba *et al.*, 2021). Estos compuestos pueden optimizar las propiedades físicas y funcionales de los productos alimentarios, actuar como agentes espesantes o estabilizantes, poseer propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Korczy y Varga, 2021). Su producción durante el tratamiento de aguas residuales no solo contribuye a la revalorización de los residuos, sino que también puede ofrecer beneficios adicionales para la sostenibilidad del sector (Hualpa-Cutipa *et al.*, 2022).

Además, la generación de exopolisacáridos fomenta la formación de biopelículas, que mejoran la eficiencia de la biorremediación con un entorno microbiano más estable y resiliente (Mouro *et al.*, 2024). Así, el aprovechamiento de estos compuestos bioactivos en el proceso de biorremediación promovería el impacto positivo de las bacterias lácticas en la gestión de residuos agropecuarios. Esta doble aproximación tiene como meta no solo mejorar la calidad del efluente tratado, al aprovechar al máximo el potencial biotecnológico de las bacterias lácticas que contribuyen a la economía circular y a la sostenibilidad de la industria agropecuaria (De Jesús *et al.*, 2024).

Esta investigación puede sentar las bases para tecnologías biológicas en otras industrias con desafíos similares en el manejo de sus efluentes (Jiang *et al.*, 2019). El uso de bacterias lácticas antárticas en el tratamiento de aguas residuales agroindustriales aborda problemas ambientales críticos y amplía las aplicaciones biotecnológicas, promoviendo la sostenibilidad y la revalorización de residuos (Hualpa-Cutipa *et al.*, 2022).

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Preparación de medio de cultivo**

#### **4.2.1.1. Purín**

La muestra de purín se extrajo de un plantel porcino en la Región de Ñuble (36°44'4.58"S 72°17'21.46"O), siendo almacenada en un bidón de poliuretano a 4 °C en el Laboratorio de Biomasa y Bioenergía de la Facultad de Ingeniería Agrícola para así mantener las características intactas del purín.

#### **4.2.1.2. Suero de queso**

La fuente de carbono seleccionada para este estudio fue el permeado de suero de queso, que se obtuvo en formato de polvo de la empresa Colún S.A., sin reconstituir. Este tipo de fuente de carbono ha demostrado ser efectivo en el crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL) y en la producción de ácido láctico, según lo indicado en investigaciones anteriores (Mazzoli *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019). Para garantizar la esterilidad del suero, se sometió a un tratamiento con luz UV durante 4 horas en un

gabinete de bioseguridad, modelo 11231BBC86 de Biobase. Durante la investigación, se llevaron a cabo diversas pruebas utilizando diferentes concentraciones de suero de queso en polvo, específicamente 1, 4, 5 y 8 g/L, para evaluar su impacto en el proceso de fermentación. De todas estas concentraciones, se identificó que 5 g/L era la más baja que generaba resultados positivos. Esta elección se basó en la necesidad de optimizar los costos del tratamiento, dado que el suero de queso en polvo es un producto comercial que puede incrementar el costo si se utilizan mayores cantidades. Al optar por esta concentración, se garantiza tanto una fermentación efectiva como una mayor viabilidad económica del proceso, lo que permitiría escalarlo en el futuro.

#### **4.2.1.3. Preparación del medio purín**

El purín se centrifugó por 20 minutos a 9.000 rpm y 4 °C (Sigma, 3-16 KL). Posteriormente, el sobrenadante fue filtrado por un sistema de vacío y filtro de fibra de vidrio con tamaño de poro de 1 µm. Se le realizó un análisis fisicoquímico con el equipo multiparamétrico HI98194 (Hanna Instruments) (Tabla 4.1). Posteriormente, fue sometido al proceso de esterilización con reactor UV, el cual se detalla a continuación: durante 8 horas el purín filtrado fue recirculado en el reactor comercial LTC-UV 40 W y una lámpara UV G25WT5. Luego de esto, se le agregaron 5 g/L de suero de queso en polvo, el cual se encontraba esterilizado y se disolvió. Después, se añadieron 4 mL de este medio a tubos de ensayo con tapa rosca. Al purín filtrado y tratado por UV se le realizó una prueba de patógenos por medio de placas Petri con Plate Count Agar (PCA) para evaluar la presencia de microorganismos patógenos. Este método permite asegurar que el purín esterilizado efectivamente no contenga una carga microbiana significativa, garantizando así que el tratamiento ha sido efectivo en la reducción de patógenos antes de su utilización en los experimentos posteriores. Al verificar la ausencia de crecimiento bacteriano en las placas, fue posible validar el proceso de esterilización (De Sousa *et al.*, 2005).

Tabla 4.1. Parámetros fisicoquímicos iniciales de purín de cerdo.

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	19,05
pH	7,51
ORP (potencial óxido-reducción) (mV)	-0,3
OD (oxígeno disuelto) (%)	50,5
OD (ppm)	4,55
Conductividad eléctrica (us/cm)	4.225
STD (sólidos totales disueltos) (ppm)	2.113
Salinidad (psu)	2,25

## 4.2.2. Ensayos

### 4.2.2.1. Ensayo de crecimiento en medio purín

Para determinar las cepas con mejor crecimiento en el medio purín, se incubaron 100 µL de las 30 BAL que pudieron ser identificadas genéticamente, en tubos de ensayo con tapa rosca que contenían 4 mL de medio purín. La fermentación ocurrió durante 48 h a 37 °C, midiendo absorbancia a 48 h a una longitud de onda de 500 nm, utilizando el espectrofotómetro Spectroquant® Prove 600, y el pH se determinó con el equipo HI5522 de Hanna Instruments. Como control se utilizaron tubos con 4 mL de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Alemania). Una vez finalizado este experimento se seleccionaron cinco cepas con menor valor de pH y mayor valor de absorbancia, que fueron estadísticamente distintas del resto, para los ensayos posteriores. El pH inicial del medio purín fue de 7,15 y la absorbancia 0,001. Se utilizó medio purín como control.

Para la fermentación láctica, se agregaron 4 mL de las cinco cepas de BAL seleccionadas, en matraces Erlenmeyer de 150 mL con tapa rosca, agregando suero de queso esterilizado a una concentración de 5 g/L y 46 mL de medio purín y fueron incubados durante 48 h a 37 °C. Como control se utilizó purín filtrado y tratado con luz ultravioleta. Todas las muestras se ensayaron en duplicado, obteniendo 100 mL de cada medio fermentado para los análisis. Al finalizar las 48 horas los matraces se sometieron a un golpe de frío (12 h a 4 °C) para detener los procesos metabólicos.

#### **4.2.2.2. Ensayo de actividad antibacteriana**

La actividad antibacteriana del sobrenadante y del cultivo en caldo se basó en el método de difusión de pocillos, descrito por Kouhi *et al.* (2022) con algunas modificaciones. Las cinco cepas de BAL seleccionadas fueron cultivadas en MRS durante 18 h a 37 °C. El sobrenadante fue obtenido de la centrifugación a 9.500 rpm, 15 min y 4 °C. Se prepararon placas de agar blando Mueller-Hinton y luego con un sacabocado se hicieron agujeros (pocillos) en cada placa, procurando que no quedaran tan próximos uno de otro. Posteriormente, se prepararon suspensiones MacFarland N°0,5 de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella enterica* ATCC 13076. Cada una de estas suspensiones se sembró en toda la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton, cubriendo totalmente la superficie. En cada pocillo de las placas de agar Mueller-Hinton se depositó aproximadamente 0,1 mL del cultivo total (pellet y caldo MRS) de las cepas, en otra placa se utilizó el sobrenadante, y como control fue utilizado caldo MRS y suero fisiológico. Luego las placas fueron incubadas por 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, se consideró como inhibición ausente un halo de 1 mm, como inhibición leve un halo de 2 mm, como inhibición fuerte un tamaño de halo comprendido entre 2 a 5 mm y como inhibición muy fuerte un halo de tamaño mayor a 5 mm alrededor de cada pocillo.

#### **4.2.2.3. Ensayo de hidrofobicidad en superficie**

El ensayo de hidrofobicidad se realizó según la metodología indicada anteriormente en el Capítulo III, con la variante de que se utilizó hexadecano como solvente.

#### **4.2.2.4. Medición de materia orgánica a través de demanda química de oxígeno (DQO)**

A las 48 h, una vez terminada la fermentación láctica, se midió la DQO utilizando el test en cubetas por el método fotométrico 50-500 mg/L Spectroquant (114541, Merck, Alemania) con el espectrofotómetro Spectroquant® Prove 600, de la misma marca (Cazaudehore *et al.*, 2019). Se utilizó como primer control el purín filtrado esterilizado.

Como segundo control se utilizó una mezcla del purín tratado con suero de queso esterilizado. Para llevar a cabo la cuantificación, todas las muestras se diluyeron 1:50. Como blanco químico se utilizó agua destilada. Se midió además a tiempo inicial, una muestra de purín filtrado. El análisis se realizó en triplicado y se aplicaron pruebas de normalidad para determinar distribución de los datos, a posterior, pruebas para evaluar diferencias significativas. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ .

#### **4.2.2.5. Análisis de exopolisacáridos (EPS)**

La metodología para la extracción de exopolisacáridos (EPS) se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Zhang *et al.* (2013), aunque con algunas modificaciones para optimizar el proceso. Una vez finalizada la fermentación, se tomó una muestra de 30 mL y se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Este procedimiento permitió separar la muestra en tres fracciones de 10 mL cada una. El sobrenadante resultante se trató con ácido tricloroacético (TCA) puro (Merck) para eliminar las proteínas que podrían interferir en los análisis posteriores. Se ajustó la concentración de TCA a un 20% (v/v) en la muestra. Tras 30 minutos de agitación, la muestra se centrifugó nuevamente, pero esta vez a 9.500 rpm por 30 minutos a 4°C. A continuación, se procedió a la precipitación de los EPS mediante la adición de dos volúmenes de etanol absoluto (Sigma Aldrich). Esta mezcla se dejó reposar a 4°C durante toda la noche, permitiendo que los EPS se acumulen adecuadamente. Posteriormente, se centrifugó a 9.500 rpm durante otros 30 minutos. El pellet que contenía los EPS se resuspendió en agua mili-Q estéril, en una proporción de 1/10 del volumen inicial del cultivo, y se sometió a un proceso de diálisis usando membranas de diálisis con un tamaño de poro de 140.000 Da (Sigma Aldrich). Esta diálisis se realizó frente a 10 L de agua mili-Q a 4°C durante 48 horas, realizando cuatro cambios de agua para asegurar una adecuada purificación. Para determinar la concentración de EPS, se utilizó el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico, tal como lo describen DuBois *et al.* (1956), modificado según el trabajo de Grobber *et al.* (1998). En este procedimiento, a 1 mL de la solución de EPS purificada se le añadieron 0,5 mL de fenol al 5% (Sigma Aldrich) y 2,5 mL de ácido sulfúrico (Merck) al 95,5%. Se

agitó la mezcla mediante un vórtex durante 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La concentración de EPS se determinó midiendo la absorbancia a 490 nm, enfocándose en las hexosas, utilizando el espectrofotómetro Spectroquant Prove 600. Para calcular la concentración exacta de las muestras, se generó una curva de calibración, empleando soluciones de dextrano comercial (dextrano 70, Merck,) a diferentes concentraciones. Adicionalmente, se llevaron a cabo controles utilizando purín filtrado tratado con luz UV (denominado P), suero de queso esterilizado con luz UV (denominado S) y una mezcla de ambos (denominada P+S). Todas las muestras fueron analizadas en triplicado, garantizando la replicabilidad y confiabilidad de los resultados.

#### **4.2.2.6. Análisis fisicoquímico del agua tratada**

Se analizaron las cinco cepas seleccionadas y una muestra de purín crudo filtrado según los métodos de análisis de agua para riego (Sadzawka, 2006). Entre los parámetros analizados se evaluaron: pH, conductividad eléctrica, nitratos, amonio, fósforo, potasio, calcio, magnesio, sodio, hierro, manganeso y zinc.

#### **4.2.2.7. Análisis microbiológico del agua tratada**

Se sembraron placas Petri con agar MRS en diluciones seriadas hasta  $10^{-7}$  para cuantificar las BAL (De Man *et al.*, 1960). Para evaluar la eficiencia de inhibición de patógenos, se cuantificó *Escherichia coli* mediante el método selectivo agar coliforme Chromocult® (Chromocult; Merck, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante, a 37°C por 24 horas. Para las colonias en este agar, se utilizaron los siguientes criterios para la identificación: las colonias de color azul oscuro a violeta se consideraron *E. coli*, mientras que las colonias de color salmón se consideraron Enterobacteriaceae clasificadas como coliformes, la suma de ambas se consideró coliformes totales. Se midió la cantidad de *E. coli* a tiempo inicial al purín filtrado. Los resultados se transformaron a log UFC/mL.

#### 4.2.2.8. Ensayo de fitotoxicidad

Se utilizaron semillas de rábano (*R. sativus*) en una placa Petri y se lavaron con agua desionizada. Se realizó un bioensayo de toxicidad aguda basado en el propuesto por Parra-Orobio *et al.* (2021) con algunas modificaciones. Para esto se prepararon placas Petri de plástico (100 x 15 mm) a las cuales se les colocó un disco de papel filtro como medio de soporte, adicionando en seguida 5 mL de cada fermentado en dilución 1:250; una vez realizado esto, con ayuda de unas pinzas se colocaron diez semillas por placa, las cuales posteriormente se taparon y fueron selladas para ser llevadas finalmente a una incubadora por un lapso de 120 horas (5 días) a una temperatura de  $21 \pm 1$  °C. El experimento se realizó por triplicado. Como control se utilizó agua desionizada, de igual manera se sometió a este ensayo una muestra de purín sin tratamiento y fermentado, además de una mezcla de purín tratado filtrado y tratado por UV y suero de queso esterilizado bajo campana UV.

Con la finalidad de evaluar el efecto producido, se evaluó al día 5 el porcentaje de germinación y se determinó el porcentaje de germinación relativa de semilla (% GRS), empleando la ecuación 4.1. Terminado el tiempo de exposición se llevó a cabo una observación general del estado de las plantas y se registró cualquier indicador de daño tanto en los tratamientos como los controles. Finalmente, se midió la raíz principal, para obtener el porcentaje de crecimiento radicular relativo (% CRR) (ecuación 4.2) y el índice de germinación (%IG) (ecuación 4.3) (Hoekstra *et al.*, 2002).

*Ecuación para calcular porcentaje de germinación relativa de semilla*

$$GRS(\%) = \frac{N^{\circ} \text{ semillas germinadas con muestra}}{N^{\circ} \text{ semillas germinadas con agua control}} * 100 \quad (4.1)$$

*Ecuación para calcular porcentaje de crecimiento radicular relativo*

$$CRR(\%) = \frac{\text{Long promedio de la radícula con muestra}}{\text{Long promedio de la radícula con agua control}} * 100 \quad (4.2)$$

*Ecuación para calcular índice de germinación*

$$IG(\%) = \frac{GRS * CRR}{100} \quad (4.3)$$

### **4.2.3. Análisis estadístico de los resultados**

Para el análisis estadístico de los resultados, en primera instancia se realizó un test de Shapiro Willks para determinar el tipo de distribución que presentaban los datos. Se aplicó test de Levene para verificar homogeneidad de la varianza. Posteriormente se realizó el análisis de varianza y test de Tukey para muestras con distribución normal; y, por otro lado, se aplicó el test de Kruskall Wallis y U de Mann Whitney para variables no paramétricas, utilizando el software SPSS versión 29.0.2.0. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ . Estos análisis se realizaron para los ensayos de crecimiento en medio purín, ensayo de hidrofobicidad en superficie, medición de materia orgánica a través de demanda química de oxígeno (DQO), producción de exopolisacáridos, análisis microbiológico del agua tratada y ensayo de fitotoxicidad.

## **4.3 Resultados y discusión**

### **4.3.1. Ensayo de crecimiento en medio purín**

Para la variable pH existen diferencias significativas (valor  $p < 0,05$ ) entre el conjunto de cepas 14, 43, 58, 157 y 171 en comparación con las demás cepas estudiadas según la prueba de Kruskall Wallis, considerando una distribución no normal de los datos (Figura 4.1). Para el caso de la absorbancia, el estadístico ANOVA, aplicado debido a la distribución normal de los datos, arrojó un valor  $p < 0,05$ , por lo que, para ambos casos, el grupo de cepas 14, 43, 58, 157 y 171 difieren significativamente del resto (Figura 4.2). El valor del pH y la absorbancia del control a 48 h fue de  $6,98 \pm 0,05$  y  $0,089 \pm 0,021$ , respectivamente. La actividad de acidificación es una de las características tecnológicas más importantes para la selección de BAL. Estos resultados mostraron que las cinco cepas ya mencionadas poseen una capacidad acidificante estadísticamente distinta.

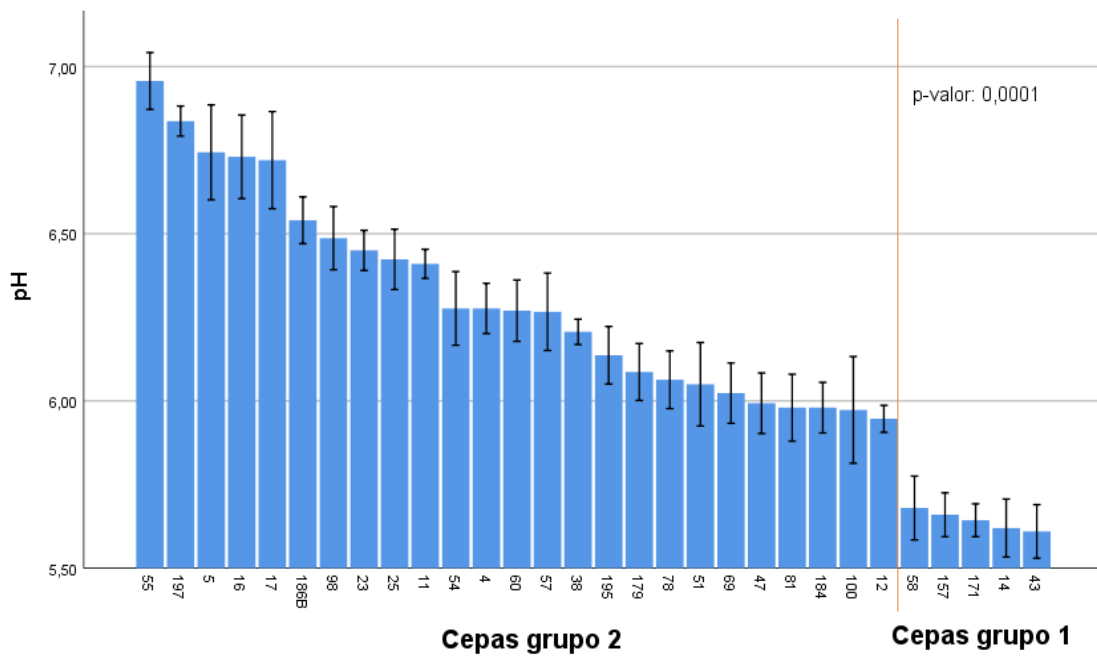


Figura 4.1. Variación de pH en la fermentación láctica de diversas cepas de BAL antártica en medio purín. Se presentan valores medios con su desviación estándar (n=3).

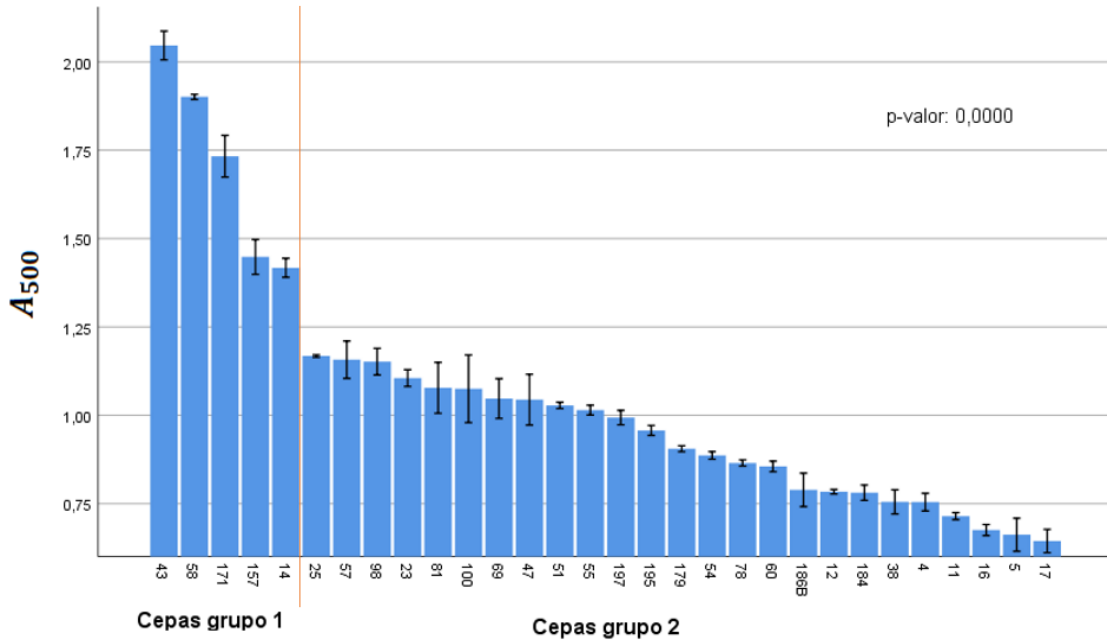


Figura 4.2. Variación de absorbancia ( $A_{500}$ ) en la fermentación láctica de diversas cepas de BAL antártica en medio purín. Se presentan valores medios con su desviación estándar (n=3).

En esta prueba preliminar se determinó el potencial de acidificación y generación de biomasa de 30 cepas de BAL antárticas. De acuerdo a la identificación genética presentada en la Tabla 3.4 del Capítulo III, las cinco cepas que evidenciaron menores valores de pH son la cepa 43 perteneciente a la especie *Enterococcus faecium* con un valor de 5,61, seguida de las cepas 14 (5,62), 171 (5,64), 157 (5,66) y 58 (5,68) correspondientes a *Pediococcus pentosaceus*. Estas cepas presentaron también los valores más altos de absorbancia, lo que es indicador de su buena capacidad para desarrollarse en este medio complejo. La cepa 43 presentó la mayor absorbancia (2,046), seguida de las cepas 58 (1,901), 171 (1,733), 157 (1,448) y 14 (1,417). En este caso, la mayor absorbancia sugiere que la cepa bacteriana ha proliferado eficazmente en el medio de cultivo, lo que implica un buen crecimiento y una capacidad efectiva para utilizar los nutrientes disponibles en ese medio. Por lo tanto, las cepas con mayores valores de absorbancia, como la cepa 43 de *Enterococcus faecium*, presentan un desarrollo y adaptación más favorable a las condiciones del medio, lo que es un indicador positivo de su potencial en aplicaciones biotecnológicas.

La cepa 43, aislada desde fecas de Petrel antártico, se destaca en este experimento por ser la que presenta un valor menor de pH y al mismo tiempo una mayor absorbancia, lo cual es un indicio de su capacidad de generar ácidos orgánicos y biomasa en un medio de cultivo de purín de cerdo que puede considerarse complejo. Estos resultados coinciden con otros estudios relacionados con las características de *E. faecium*, una bacteria Gram-positiva, con forma de cocos individuales o cadenas cortas, no esporulada, catalasa-negativa, anaerobia facultativa y homofermentativa, cuyo principal producto de fermentación es el ácido láctico (Kavitake *et al.*, 2023). Esta bacteria muestra resistencia y versatilidad para prosperar en distintos hábitats, incluso en aquellos que son ricos en nutrientes y con presencia de patógenos, como por ejemplo heces de aves marinas (Kim *et al.*, 2018). Estos resultados concuerdan con los estudios de Mao *et al.* (2020) y Özkan *et al.* (2021), quienes demostraron que *E. faecium* tiene una alta capacidad de desarrollarse en ambientes hostiles. Esta especie podría haber desarrollado un sistema

ventajoso en términos de consumo nutricional, lo cual sería un potencial favorecedor en aplicaciones industriales donde son requeridos el crecimiento de biomasa y producción de ácidos orgánicos.

Las demás cepas corresponden a *P. pentosaceus*, bacterias Gram-positivas, no formadoras de esporas, inmóviles, con forma de coco y homofermentativas (Semjonovs y Zikmanis, 2008). Estas fueron aisladas desde diversas fuentes, lo que podría dar explicación de las variaciones obtenidas en el experimento. La cepa 14, aislada desde heces de pinnípedo, 58, aislada de fecas de lobo fino antártico y las cepas 157 y 171, aisladas de intestinos de los peces *Notothenia antarctica* y *Harpagifer antarcticus*, dan evidencia del potencial adaptativo de esta especie en condiciones donde los recursos nutricionales son limitados y los factores del nicho ecológico les exigen mayor resistencia y desarrollo metabólico (Verma *et al.*, 2023). Se ha estudiado que las heces de animales antárticos cuentan con bacterias generadoras de enzimas capaces de depurar amoníaco, las cuales mayoritariamente son de origen intestinal y que poseen ácido úrico psicrófilico, además de proteínas y bacterias que son capaces de degradar compuestos (Grzesiak *et al.*, 2020). Por otra parte, el intestino de los peces es un ecosistema complejo que alberga una población específica de microbiota (Talwar *et al.*, 2018). Actualmente, muchas BAL han sido profundamente investigadas por sus efectos probióticos y beneficiosos para la salud del huésped dentro de estos aislados (Dhruv *et al.*, 2021). De esta manera, la versatilidad y adaptabilidad que poseen estas especies para crecer y desarrollarse en condiciones poco favorables sugiere que estas cepas aisladas de la fauna autóctona de la Antártica son promisorias para potenciales aplicaciones biotecnológicas y/o probióticas que requieran robustez y adaptabilidad a medios de desarrollo ricos en nutrientes y aguas residuales complejas.

Es importante reconocer limitaciones relacionadas con la medición de absorbancia. Aunque es un indicador útil de la biomasa y la actividad metabólica de los microorganismos en cultivo, su interpretación no es siempre directa. Factores como la turbidez del medio, presencia de compuestos colorantes e interferencias de otros elementos pueden distorsionar los resultados, llevando a conclusiones erróneas sobre la

eficiencia del proceso (Li *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2023). Es importante considerar que la absorbancia mide la cantidad de luz absorbida por la muestra, lo que puede no correlacionarse linealmente con la concentración de materia orgánica presente. Esto es relevante en medios complejos como el purín, donde la diversidad de compuestos puede alterar la relación esperada entre la absorbancia y la concentración expresada como DQO (Wang *et al.*, 2022). De esta manera, mientras que un aumento en la absorbancia puede sugerir un crecimiento microbiano efectivo, no necesariamente indica una mejora en la calidad del efluente tratado si no se complementa con un análisis químico que evalúe la reducción de contaminantes específicos (Mao *et al.*, 2020). La interpretación de estos datos debe considerar las limitaciones mencionadas para evitar decisiones erróneas en la optimización de los sistemas de biorremediación (Dahiya *et al.*, 2018; Akpoghelie *et al.*, 2025).

La variación del pH durante el proceso de fermentación es un indicador de actividad metabólica, ya que refleja la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. A medida que estas bacterias metabolizan azúcares y otros compuestos presentes en los sustratos, se produce una acidificación del medio, lo que es esencial para el crecimiento de estos microorganismos y además puede influir en la solubilidad y biodisponibilidad de nutrientes, favoreciendo su asimilación (Rama *et al.*, 2019). Un pH más bajo, como el observado en las cepas estudiadas, indica un metabolismo activo donde la producción de ácido láctico puede ser suficiente para inhibir a patógenos y microorganismos competidores, mejorando la calidad del efluente (Krishnan *et al.*, 2016). Es importante considerar que una reducción excesiva de pH puede ser perjudicial, ya que podría llevar a condiciones desfavorables para el crecimiento de las BAL (Zhao *et al.*, 2023). El control del pH es fundamental no solo para optimizar el rendimiento del proceso, sino también para asegurar la estabilidad del ecosistema microbiano en el tratamiento de aguas residuales pecuarias (Mao *et al.*, 2020).

### 4.3.2. Ensayo de actividad antimicrobiana

Los resultados muestran variabilidad de las cepas en la actividad antimicrobiana en función del patógeno, y el tipo de extracto (sobrenadante o cultivo en caldo) (Tabla 4.2), reflejando la capacidad de estas BAL para producir metabolitos antimicrobianos. El cultivo en caldo para todas las cepas logró una inhibición muy fuerte sobre *S. enterica* (Figura 4.3).

Tabla 4.2. Actividad antibacteriana del sobrenadante y del cultivo en caldo de aislados antárticos contra patógenos comunes.

Aislado	<i>E. coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>S. enterica</i>	
	Sobrenadante	Cultivo en caldo	Sobrenadante	Cultivo en caldo	Sobrenadante	Cultivo en caldo
14	+++	-	+++	+++	-	+++
43	-	+++	+++	+++	-	+++
58	-	-	-	-	++	+++
157	-	+++	-	-	+++	+++
171	+++	+++	-	+++	+++	+++

-: sin inhibición, + inhibición leve (tamaño de halo de hasta 2 mm), ++: inhibición fuerte (halo entre 2 a 5 mm), +++: inhibición muy fuerte (halo de más de 5 mm).



Figura 4.3. Actividad antimicrobiana del cultivo en caldo para los cinco aislados (14, 43, 58, 157, 171) de BAL antártica sobre *Salmonella enterica*.

La cepa 58 fue la que presentó menor actividad antimicrobiana tanto en el sobrenadante como en el cultivo en caldo, en contraste con la cepa 171 que fue la que tuvo mayor actividad contra estos patógenos. Estas diferencias podrían explicarse por variaciones en la producción de compuestos con actividad antimicrobiana explicaría debido a variaciones en la producción de compuestos con actividad antimicrobiana, tales como bacteriocinas, ácidos orgánicos o peróxido de hidrogeno. La cepa 171, aislada del intestino de *Harpagifer antarcticus*, probablemente compitió con un mayor número de colonizadores microbianos; por ende, la selección natural favorecería la evolución de mecanismos antimicrobianos más efectivos. La cepa 58, en cambio, aislada de un lobo fino antártico, estuvo expuesta a presiones selectivas distintas resultando en la acción

antimicrobiana encontrada. Adicionalmente, diferencias en la regulación genética de estos mecanismos, expresión de enzimas degradativas y susceptibilidad de los patógenos a cada compuesto degradante también influirían en esta variabilidad. Las cepas 14 y 171 presentaron inhibición muy fuerte al patógeno *E. coli* en el sobrenadante, lo que indica que estos aislados producen compuestos antimicrobianos capaces de inhibir bacterias Gram-negativas en el medio extracelular. Por otra parte, no hubo actividad antimicrobiana contra *E. coli* del cultivo en caldo para la cepa 14 ni para la 58, pero sí para las cepas 157 y 171. Lo anterior podría indicar que la actividad antimicrobiana de la especie *P. pentosaceus* aislada desde intestino de pez antártico depende de la presencia de células activas o de metabolitos que se mantienen a mayor concentración en el cultivo en caldo, pero no en el sobrenadante. Lo anterior también es atribuible al comportamiento de *E. faecium*, al tener actividad antimicrobiana solo en el cultivo en caldo; Ozkan *et al.* (2021), reportaron actividad nula del sobrenadante de *E. faecium* sobre *E. coli*.

Para el patógeno *S. aureus*, las cepas 14 y 43 mostraron inhibición muy fuerte tanto en el sobrenadante como en el cultivo en caldo, indicando la producción de bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos activos contra bacterias Gram-positivas, lo cual coincide con estudios previos sobre la capacidad de *E. faecium* y *P. pentosaceus* para producir compuestos con actividad antimicrobiana específica contra *S. aureus* (Rahmeh *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2022). Por otro lado, las cepas 58, 157 y 171 no presentaron inhibición contra este patógeno, lo cual podría atribuirse a diferencias en los compuestos producidos o bien, una menor efectividad de las bacteriocinas frente al patógeno *S. aureus*. La cepa 171 mostró actividad en el cultivo en caldo, no así en el sobrenadante, lo cual indicaría que los metabolitos antibacterianos que produce son inestables o necesitan la presencia de células para mantener su actividad.

Todos los cultivos en caldo presentaron inhibición muy fuerte contra *S. enterica*, lo que sugiere una acción uniforme de los compuestos antimicrobianos producidos por estas bacterias lácticas. Para el caso del sobrenadante mostraron variabilidad entre las cepas: la 157 y 171 lograron una inhibición muy fuerte, mientras que la cepa 58 inhibió en menor grado. Esto puede indicar que las cepas de *P. pentosaceus* aisladas desde intestino de

pez producen metabolitos capaces de mantener su actividad antimicrobiana extracelularmente, generando compuestos antibacterianos específicos para inhibir bacterias de este género. Hu *et al.* (2021), registraron actividad antibacteriana de *P. pentosaceus* sobre *S. enterica*.

Estudios indican que algunas especies de *Pediococcus* generan bacteriocinas, tales como la pediocina, que limitan la proliferación de BAL (Porto *et al.*, 2017; Komora *et al.*, 2020), El hecho de reducir el pH durante la fermentación, también contribuye en la inhibición del crecimiento de patógenos u otros microorganismos no deseados (Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2018). Los diversos resultados entre el sobrenadante y cultivo en caldo para las cepas pueden explicarse por las diversas fuentes desde las que fueron aisladas. La hostilidad del intestino de peces o las heces tanto de aves como de mamíferos antárticos, pudo haber favorecido la adaptación de las BAL para producir una gama diversa de compuestos antimicrobianos, muchos de los cuales pueden tener una especificidad elevada contra patógenos potencialmente comunes en estos hábitats. Por ejemplo, la actividad de *Enterococcus faecium* contra *S. aureus* podría estar vinculada a la producción de enterocinas, que presentan actividad contra patógenos grampositivos. Tilwani *et al.* (2022), reportaron buena actividad antimicrobiana de *E. faecium* sobre *S. enterica*. Cabe mencionar que la literatura encontrada aborda la actividad del sobrenadante sobre el patógeno, pero no se encontraron experimentos con el cultivo en caldo para lograr contrastar los resultados de este estudio.

La literatura reporta las propiedades antimicrobianas y la caracterización funcional de las BAL; por ejemplo, en cepas como *Fructobacillus* y *Lactiplantibacillus* en el contexto de la bioconservación y la mejora de alimentos. Estas bacterias destacan por su capacidad para fermentar carbohidratos y producir ácido láctico, y han tenido un amplio uso en la industria alimentaria, no solo por sus propiedades probióticas, sino también por su potencial para combatir patógenos. En el trabajo de Bhavadharan *et al.* (2023), las BAL son fundamentales en la producción de alimentos fermentados, ya que generan una variedad de metabolitos que son beneficiosos para la salud humana. Estos incluyen no solo ácido láctico, sino también bacteriocinas, exopolisacáridos y ácidos grasos de

cadena corta. Su capacidad para descomponer macromoléculas alimentarias y actuar como probióticos resalta su importancia en la mejora del bienestar corporal. El estudio de De Simone *et al.* (2023) evidencia la capacidad de *L. plantarum* y *F. fructosus*, aisladas de miel artesanal, para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y hongos; esta información abre nuevas posibilidades para su uso en la bioconservación.

El efecto combinado de ácidos orgánicos y bacteriocinas revela una potencial mejora de la actividad antimicrobiana. Estas bacterias, adaptadas a condiciones extremas, han desarrollado mecanismos únicos de resistencia y adaptación, lo que las hace especialmente valiosas en la búsqueda de soluciones biotecnológicas (Casillo *et al.*, 2017). Otros estudios han demostrado la efectividad de estas combinaciones en condiciones controladas, pero aún se requiere más investigación para comprender completamente sus interacciones y optimizar su aplicación en sistemas naturales (Tamang *et al.*, 2024).

Estos resultados son sugerentes de que varias BAL antárticas no solo son adaptables a medios de cultivo ricos en proteínas y nutrientes complejos, sino que también poseen capacidades antimicrobianas que podrían tener aplicaciones significativas contra patógenos. Sin embargo, como el análisis fue más bien cualitativo, no se generaron datos numéricos que permitieran realizar un análisis estadístico. Esto limitó la capacidad para comparar de manera precisa cómo cada cepa afectaba la inhibición de los patógenos, lo cual es una debilidad que debe ser considerada para estudios posteriores.

#### **4.3.3. Ensayo de hidrofobicidad en superficie**

Los datos de la hidrofobicidad de superficie celular para los aislados 14, 43, 58, 157 y 171 de BAL antártica presentaron una distribución normal según el test de Shapiro Willks y una homogeneidad de la varianza según el test de Levene. Al realizar el análisis de varianza no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los aislados. Se puede vislumbrar que las cepas de *P. pentosaceus* y *E. faecium* poseen una hidrofobicidad mayor a 84% (Figura 4.4), clasificándose en la categoría de hidrofobicidad

alta. Esto se traduce en una alta afinidad entre cepas e hidrocarburos, lo cual implica una mayor adhesión a superficies no polares.

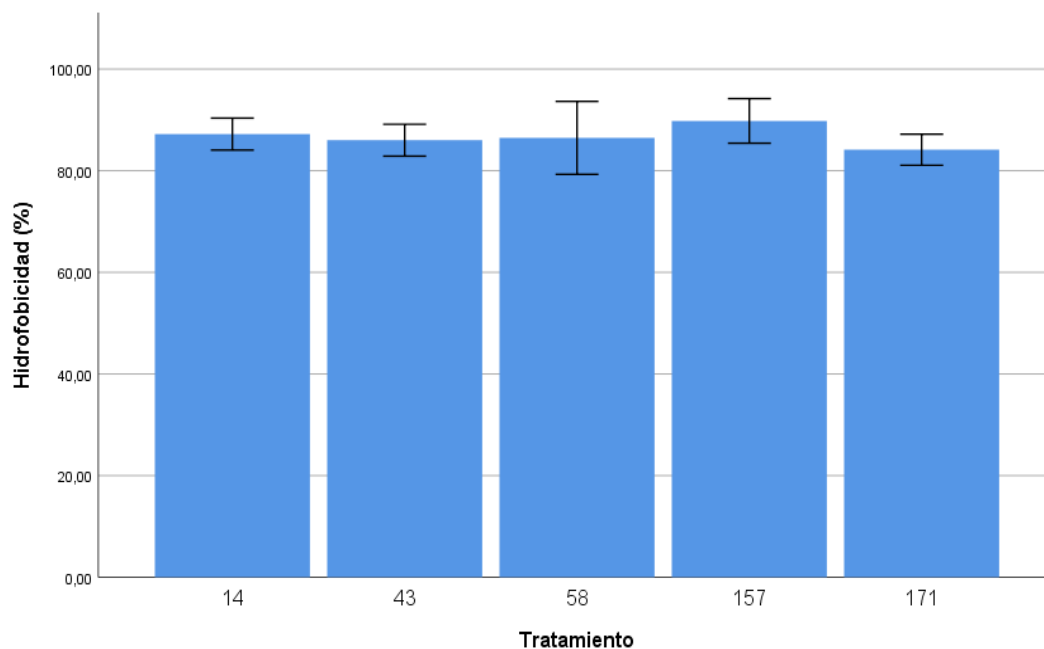


Figura 4.4. Valores de hidrofobicidad de superficie celular para aislados de BAL antártica. Valores expresados como promedio y barra de error corresponde a desviación estándar (n=3).

Los valores de hidrofobicidad encontrados en las cepas indicarían mecanismos de adaptación a ambientes extremos. Esta característica de adhesión permitiría competir con una amplia cantidad de microorganismos y sobrevivir en condiciones adversas del ambiente. Otros autores también han reportado altos valores de hidrofobicidad para estas especies de BAL (Rehaiem *et al.*, 2014; Son *et al.*, 2018; Tilwani *et al.*, 2022). Estas cepas son prometedoras en el ámbito de la biotecnología y la protección del medio ambiente (Hüet y Puchooa, 2017), destacándose en áreas como la conservación de alimentos y la defensa contra patógenos en contextos donde la formación de biofilms y la adherencia a superficies son beneficiosas. La combinación de su notable hidrofobicidad junto con la actividad antimicrobiana observada indica que estas cepas podrían ser utilizadas en estrategias de control biológico, aprovechando tanto su capacidad de adherirse como su

efecto antimicrobiano para suprimir patógenos en diversos entornos (Sakandar y Zhang, 2021; Ozkan *et al.*, 2021). Estos resultados son consistentes con otros estudios donde la hidrofobicidad de BAL está sobre el 40%, el cual es el límite a considerar para evaluar propiedades probióticas de una cepa (Son *et al.*, 2018).

La alta hidrofobicidad evidencia la capacidad para competir y prosperar en ambientes adversos, como las aguas residuales porcinas (Erginkaya y Konuray-Altun, 2022). Esto se traduce en una mayor afinidad hacia superficies no polares, facilitando la adhesión a diversos sustratos, lo que es crucial para la supervivencia y eficacia en aplicaciones de biorremediación (Ascanta *et al.*, 2025). Estudios previos han demostrado que la hidrofobicidad sobre 80% mejora la capacidad para adherirse a superficies y está relacionada con la capacidad para formar biopelículas, asociadas a la producción de exopolisacáridos (EPS) (De Souza *et al.*, 2019). Estas biopelículas ofrecen protección contra condiciones ambientales adversas y patógenos, lo que se traduce en una mayor efectividad en la degradación de compuestos tóxicos (Bravo *et al.*, 2020; Vasmara *et al.*, 2021). La producción de EPS es un indicador de la adaptabilidad de estas cepas a condiciones ambientales inhóspitas, ya que actúan como protectores, mejorando la resistencia a factores como la salinidad y variaciones de temperatura (Mouro *et al.*, 2024). La síntesis de estos compuestos se asocia con un mecanismo de defensa que permite a las BAL prosperar donde otros microorganismos no podrían. De lo anterior se infiere que existe una relación entre la hidrofobicidad, la producción de EPS y la capacidad de las cepas para enfrentar el estrés ambiental. Este enfoque abre nuevas vías para la investigación futura, centrándose en la optimización de estas características en un contexto industrial, contribuyendo a un manejo responsable de los residuos potencialmente aprovechables.

#### 4.3.4. Medición de materia orgánica a través de demanda química de oxígeno (DQO)

En este experimento el valor inicial de DQO de purín crudo filtrado fue de 5.100 mg/L. Luego, se midió la demanda química de oxígeno (DQO) al finalizar la fermentación láctica. Los datos seguían una distribución normal y presentaban diferencias estadísticamente significativas entre sí. Los resultados para las diferentes condiciones experimentales se presentan en la Figura 4.5, además de las diferencias significativas entre los controles y las cepas en la Tabla 4.3. La concentración de materia orgánica varió, traduciéndose en diferente nivel de actividad metabólica y descomposición de la materia orgánica.

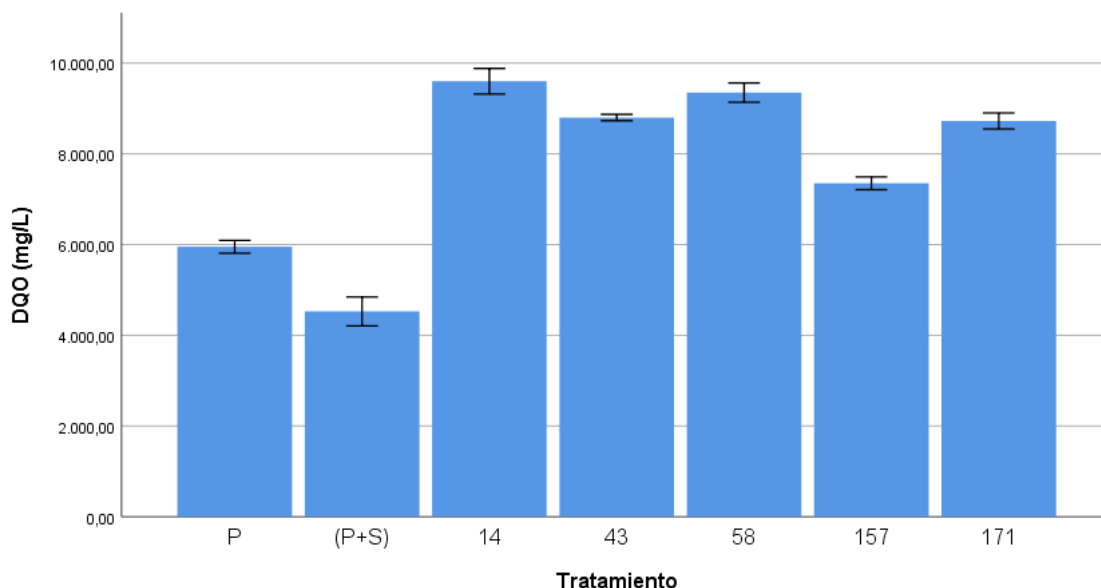


Figura 4.5. Demanda química de oxígeno para bacterias ácido lácticas antárticas. P: purín solo; P+S: medio purín. Valores expresados como promedio y barra de error corresponde a desviación estándar (n=3).

Tabla 4.3. Diferencias estadísticamente significativas (\*) según el test de Tukey HSD entre los valores de DQO para las cepas antárticas y los controles.

Muestra	Comparación	p-valor
P	P+S	0,003 *
	14	0,000 *
	43	0,000 *
	58	0,000 *
	157	0,000 *

	157	0,003 *
	171	0,000 *
P+S	14	0,000 *
	43	0,000 *
	58	0,000 *
	157	0,000 *
	171	0,000 *
14	43	0,057
	58	0,873
	157	0,000 *
	171	0,038 *
43	58	0,240
	157	0,002 *
	171	1,000
58	157	0,000 *
	171	0,157
157	171	0,003 *

Los resultados muestran una variabilidad en la DQO entre los diferentes tratamientos. En general, las muestras tratadas con purín y suero de queso esterilizado (P+S) presentaron valores de DQO más bajos en comparación con el resto, lo sugiere una menor generación de compuestos simples.

La comparación entre grupos presentó un valor  $p < 0,05$  en la mayoría de las muestras, por lo que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, exceptuando la muestra 43 que no presenta diferencias con las muestras 14, 58 y 171. Además, la muestra 58 no presenta diferencias con el tratamiento 171. La cepa 14 de *P. pentosaceus*, aislada de heces de pinnípedo antártico, presentó el mayor valor de DQO de 9.600 mg/L, indicativo de la alta demanda de oxígeno necesaria para la degradación de compuestos orgánicos complejos. Este valor fue significativamente mayor con respecto a otras cepas, en particular con la cepa 157 (valor- $p=0,002$ ) y la cepa 171 (valor- $p=0,038$ ), lo que sugiere no solo las capacidades metabólicas, sino también la adaptación a condiciones de alta carga orgánica como en el sistema digestivo de pinnípedo,

alimentado de proteína y rico en grasa. La cepa 43, aislada de heces de petrel antártico, presentó una DQO de 8.800 mg/L, más baja que la de la cepa 14, pero aún relativamente alta en comparación con otras cepas. Este valor fue significativamente superior a la cepa 157 (valor- $p=0,004$ ). *E. faecium* es conocido por su capacidad de metabolizar una amplia gama de sustratos; por lo tanto, es altamente probable que haya desarrollado adaptación metabólica para degradar varios compuestos presentes en su ambiente de aislamiento, como las heces de ave marina polífaga. La cepa 58 de *P. pentosaceus*, aislada del lobo fino antártico, presentó un valor de DQO de 9.350 mg/L, sin diferencias con respecto a la cepa 14 con  $p = 0,873$ . Por lo tanto, al igual que la cepa anterior, la conexión con un entorno rico en proteínas y grasas sugiere degradación de compuestos complejos y, en consecuencia, una alta demanda de oxígeno.

La cepa 157 (*P. pentosaceus*) aislada del intestino de *Notothenia* arrojó una DQO de 7.350 mg/L, lo cual difiere significativamente de las cepas 14 y 43. Esto implica el uso de compuestos orgánicos presentes en el medio de cultivo, lo cual podría relacionarse fácilmente con la adaptación a un ambiente con menor disponibilidad de nutrición. Dentro del intestino de los peces los nutrientes son menos disponibles, lo que posiblemente favorezca la adaptación metabólica de la cepa. La cepa 171 (*P. pentosaceus*) aislada del intestino del *Harpagifer antártico*, presentó una DQO de 8.725 mg/L, el cual es significativamente menor al de la cepa 14 ( $p=0,038$ ). A pesar de que también proviene de un ambiente con poca disponibilidad nutricional, su DQO implica una menor eficiencia metabólica que la cepa 157, lo cual podría relacionarse con diferencias en dieta y microbioma intestinal de *Notothenia*. En general, estos resultados indican que las bacterias aisladas de la Antártica presentan perfiles metabólicos diferenciados según su especie y ambiente de origen, lo que se refleja en la variación de DQO.

La concentración de DQO se usa ampliamente para representar la cantidad aproximada de materia orgánica disuelta en el caldo de fermentación (Wang *et al.*, 2022). La cepa 43 arrojó un valor de 8.830 mg/L, mientras que *P. pentosaceus* indicó valores desde 7.350 a 9.630 mg/L, lo que representa diversa actividad metabólica. El proceso anaeróbico de fermentación láctica produce ácido láctico a partir de los azúcares, lo que aumenta la

DQO porque los productos fermentativos acumulados elevan la carga orgánica en el medio (Lian *et al.*, 2024). Es posible mencionar que las cepas bacterianas aisladas de los ambientes antárticos revelaron una alta capacidad para metabolizar la materia orgánica. *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium* juegan un papel importante en el ciclo de los nutrientes en el ecosistema antártico. Desempeñan una función ecológica y tienen un significado biotecnológico en este extremo hábitat, siendo esenciales para transformar los nutrientes en compuestos más simples, proporcionando sustratos para la generación de ácidos orgánicos (Zhao *et al.*, 2019).

La DQO indica la efectividad de BAL antárticas en el tratamiento de purines de cerdo, al lograr aumentar la biodisponibilidad de los compuestos presentes en estas aguas residuales. Es importante tener en cuenta que el propio proceso de fermentación, aunque tiene por objeto descomponer los compuestos orgánicos complejos, puede aumentar este indicador. A medida que las bacterias metabolizan azúcares y otros sustratos disponibles, producen ácidos orgánicos (Camesasca *et al.*, 2021; Meruvu, 2023), que contribuyen a la carga orgánica global del medio. Se debe evaluar si los compuestos orgánicos complejos y recalcitrantes se están convirtiendo en formas más simples y biodegradables. La actividad de las BAL generalmente lleva a una disminución del pH, la cual inhibe patógenos y crea un entorno favorable para la proliferación de BAL, mejorando potencialmente la calidad general del efluente (Lamssali *et al.*, 2024). La producción de EPS es un indicador de la adaptabilidad de las BAL, ya que contribuyen a la formación de biopelículas, que pueden mejorar la estabilidad y actividad de esta comunidad bacteriana. Un biofilm robusto puede conducir a un aumento de la biodisponibilidad de nutrientes consistente en el tiempo. Sin embargo, los EPS son polímeros orgánicos y contribuyen también a la carga orgánica global (Chen *et al.*, 2020). Por lo tanto, una elevada producción de EPS sin la correspondiente disminución de otras fracciones orgánicas podría no representar una mejora de la calidad del agua residual. Un enfoque considerando DQO, pH, EPS y otros parámetros relevantes como la absorbancia (Lamssali *et al.*, 2024), es esencial para una evaluación completa de las BAL antárticas en el tratamiento de aguas residuales.

### 4.3.5. Análisis de exopolisacáridos (EPS)

La cuantificación de la concentración de EPS para las distintas condiciones evaluadas se realizó mediante el método de DuBois. Los resultados de las concentraciones de EPS para cada condición se muestran en la Figura 4.6. El análisis estadístico arrojó que los aislados presentaron distribución no normal con diferencias significativas. Las diferencias significativas entre tratamientos se presentan en la Tabla 4.4.

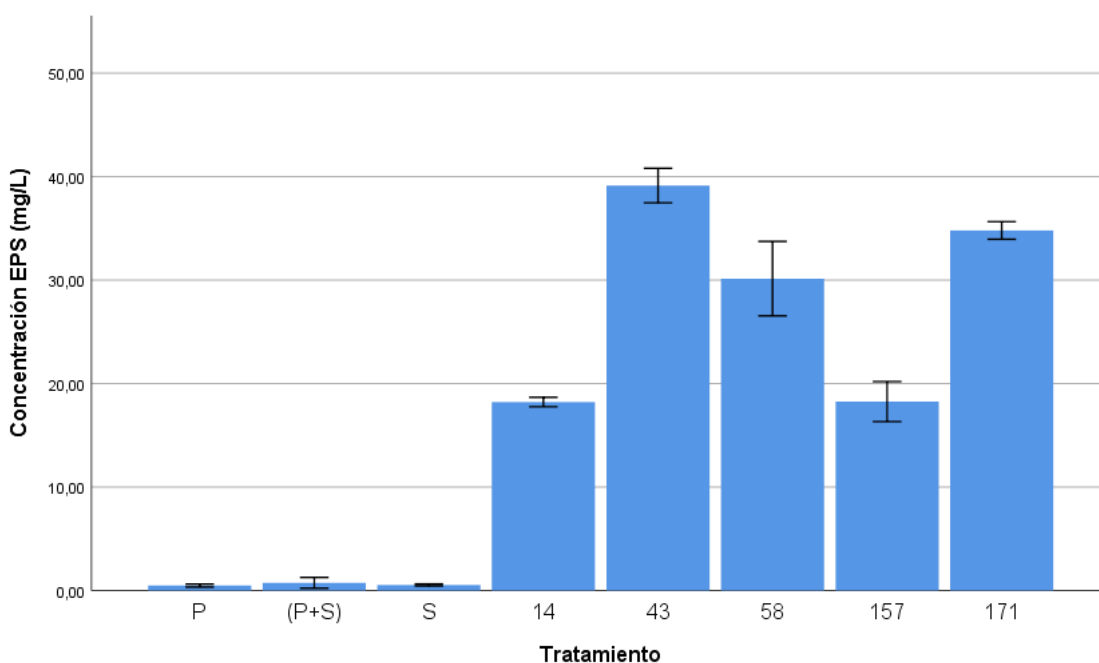


Figura 4.6. Concentraciones de EPS producidas por diversas cepas de BAL antárticas y sus controles. Valores expresados como promedio y barra de error corresponde a desviación estándar.

Tabla 4.4. Diferencias estadísticamente significativas (\*) según el test de U de Mann Whitney entre los valores de EPS para las cepas antárticas y los controles.

Muestra	Comparación	p-valor
P	(P+S)	0,513
	S	0,658
	14	0,046 *
	43	0,049 *
	58	0,049 *

	157	0,049 *
	171	0,049 *
P+S	S	0,513
	14	0,046 *
	43	0,049 *
	58	0,049 *
	157	0,049 *
	171	0,049 *
S	14	0,046 *
	43	0,049 *
	58	0,049 *
	157	0,049 *
	171	0,049 *
14	43	0,046 *
	58	0,046 *
	157	0,507
	171	0,046 *
43	58	0,049 *
	157	0,049 *
	171	0,049 *
58	157	0,049 *
	171	0,049 *
157	171	0,049 *

Los valores de EPS fueron considerablemente más bajos en las muestras de medio purín (P+S), purín solo (P) y suero de queso (S) en comparación con el resto. La concentración más alta de EPS se observó en la muestra 43 con un valor de 39,14 mg/L. Las cepas 14, 58, 157 y 171 presentaron concentraciones que variaron entre 18,22 mg/L y 34,80 mg/L. Los valores son significativamente diferentes entre muestras (Tabla 4.5). Se puede observar que las muestras P, S y P+S no presentan diferencias significativas entre ellas, pero sí las presentan con el resto de las muestras; estas últimas arrojan un valor  $p < 0,05$  con las demás muestras, exceptuando a las muestras 14 y 157. Por lo que se desprende que las muestras para purín, suero de queso y medio purín tienen una cantidad de EPS significativamente menor que las restantes. Sin embargo, aunque ambas proporcionan

una relación significativa, el valor de p está al límite del umbral convencional de significancia.

Analizar la producción de exopolisacáridos en diversas muestras bacterianas ofrece información valiosa sobre la capacidad de estos aislamientos para sintetizar compuestos que pueden incidir en su viabilidad y funcionalidad en entornos extremos como los de la Antártida. Los promedios de productividad de EPS de las cepas aisladas en *Pediococcus pentosaceus* son más altos que el purín de cerdo y suero de queso. Las cepas bacterianas presentan una cantidad de producción de EPS notoria, lo cual es una estrategia adaptativa que les facilita la viabilidad en condiciones adversas en las que escasean los nutrientes y la presión extra de las condiciones del ambiente antártico (Ibrahim *et al.*, 2022).

Dentro de las cepas analizadas, *Enterococcus faecium* registró el valor de producción de EPS más elevado, lo cual podría estar relacionada con la posibilidad que tiene esta cepa en colonizar y sobrevivir en el sistema digestivo de aves marinas en donde enfrenta condiciones adversas y nutrientes variados. Existen muchos beneficios asociados con los EPS, sin embargo, la información sobre las propiedades de EPS secretados por *E. faecium* es limitada y se fomentan más estudios sobre su potencial biológico. De Brito *et al.*, (2024) indican que *E. faecium* es capaz de generar EPS con alta estabilidad térmica, actividad antioxidante contra los principales radicales libres y un efecto inhibitorio contra patógenos, provocando la inhibición y disrupción de biopelículas de microorganismos patógenos.

Por otro lado, las cepas de *Pediococcus pentosaceus* también mostraron una producción importante de EPS. Estos valores varían de 18,22 mg/L para la cepa 14 hasta 34,80 mg/L para la cepa 171. Como se mencionó anteriormente, estas variaciones pueden depender de la fuente de aislamiento de la cepa. Las cepas aisladas de heces de mamíferos e intestinos de peces antárticos pueden adquirir formas diferentes de capacidad de producción de EPS debido a condiciones específicas de su hábitat. La capacidad de producción de EPS en estas bacterias puede estar relacionada con su capacidad de fermentar carbohidratos y producir ácido láctico. A su vez, esto también

puede influir en la formación de biofilms, lo que puede actuar como barrera contra patógenos. De esta manera, esta variabilidad resalta la capacidad de adaptación de las diferentes cepas al entorno antártico, contribuyendo con su supervivencia y funcionamiento en el ecosistema extremo (Ibrahim *et al.*, 2022). Se han investigado comunidades microbianas en ambientes hostiles y el rol crucial de los EPS, el cual es crítico para la adhesión de los extremófilos a las partículas y, lo que es más importante, para proporcionar crioprotección. Los EPS protegen la célula de condiciones adversas, como las temperaturas extremas, la salinidad, la radiación, los cambios en el pH y varios otros factores medioambientales. La capa de EPS permite a los extremófilos evitar los efectos extremos de este medio adverso (Ibrahim *et al.*, 2022).

La producción de EPS es un proceso influenciado por diversos factores, como el pH, tiempo de fermentación y disponibilidad de nutrientes. Se ha observado que un pH óptimo, situado en torno a 5,5 a 6,5, favorece la actividad metabólica de las BAL, lo que resulta en una mayor producción de EPS (Martha-Lucero *et al.*, 2023). Por ejemplo, *Enterococcus faecium* mostró una capacidad notable para acidificar el medio, alcanzando un pH final de 5,61, lo que sugiere su potencial para la producción eficiente de EPS. El tiempo de fermentación es otro factor, ya que un período prolongado permitiría una mayor proliferación de las bacterias y, en consecuencia, una mayor síntesis de EPS. Sin embargo, es fundamental encontrar un equilibrio, ya que tiempos excesivos pueden llevar a una disminución en la calidad de los productos obtenidos (Krishnan *et al.*, 2016). Este estudio indicó que las cepas de BAL pueden seguir produciendo EPS durante 48 horas de fermentación, lo que sugiere que se pueden optimizar y/o extender estos tiempos para maximizar la producción. Los resultados indican que la adición de suero de queso como fuente de carbono fue efectiva en la producción de EPS por *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium*, lo que concuerda con otros estudios (Zhang *et al.*, 2024). Estas bacterias, al metabolizar azúcares presentes en el suero, pueden generar EPS, lo que a su vez mejora sus propiedades funcionales. Los EPS producidos no solo tienen un impacto en la industria alimentaria, sino que también tienen aplicaciones tecnológicas en la formación de

biopelículas. Estas biopelículas son cruciales en el contexto del tratamiento de aguas residuales, ya que actúan como barreras contra patógenos y ayudan a estabilizar los cultivos bacterianos en entornos adversos (Camesasca *et al.*, 2021). Además, proporcionan protección frente a estrés osmótico, permitiendo la viabilidad de las BAL en efluentes agropecuarios, donde las concentraciones de nutrientes pueden variar drásticamente (Bravo *et al.*, 2020). Estos hallazgos no solo tienen implicaciones para la biotecnología y la industria alimentaria, sino que también ofrecen soluciones sostenibles para la gestión de residuos y la mejora de la salud del suelo en prácticas agrícolas (De Jesús *et al.*, 2024).

#### 4.3.6. Análisis fisicoquímico del agua tratada

El análisis fisicoquímico de las muestras de purín y las cepas se presenta en la Tabla 4.5. Se observaron variaciones en la concentración de los minerales y nutrientes en los cultivos, indicando el potencial metabólico de las cepas.

Tabla 4.5. Parámetros fisicoquímicos para cepas de BAL antárticas fermentadas en medio purín y criterios de calidad de agua según la norma chilena NCh 1333.

Parámetro	P	14	43	58	157	171	No hay riesgo	Riesgo medio	Riesgo alto
Conductividad eléctrica (dS/m)	13,17	10,96	11,68	11,8	11,94	11,99	0,5-0,75	0,75-3,0	>3,0
Nitratos (N-NO <sub>3</sub> ) (mg L <sup>-1</sup> )	2,66	2,15	3,14	2,49	2,66	2,41			
Amonio (N-NH <sub>4</sub> ) (mg L <sup>-1</sup> )	1.139	1.040	1.089	1.089	1.089	1.139	<5,0	5,0-30,0	>30,0
Fósforo (P-PO <sub>4</sub> ) (mg L <sup>-1</sup> )	188,5	108,9	114,5	105,0	110,6	130,3	-	-	-
Potasio (K <sup>+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	530	740	730	710	760	640	-	-	-
Calcio (Ca <sup>2+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	171	207	206	212	174	186	20-100	100-200	>200

Tabla 4.5 (continuación)

Magnesio (Mg <sup>2+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	91	41	40	36	37	54	<63	>63	-
Sodio (Na <sup>+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	680	510	550	590	630	510	<70	70-180	>180
Hierro (Fe <sup>2+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	18,9	3,2	7,0	1,0	1,9	8,1	<0,2	0,2-1,5	>1,5
Manganeso (Mn <sup>2+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	0,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	<0,1	0,1-1,5	>1,5
Zinc (Zn <sup>2+</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	15,2	4,6	5,1	5,8	5,0	4,8	2,00	>2,00	-
Cobre (Cu) (mg L <sup>-1</sup> )	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,20	>0,20	-

Se observan valores similares entre las distintas cepas respecto a los parámetros medidos. El purín difiere de los demás, mayoritariamente en conductividad eléctrica, fósforo, potasio, magnesio, sodio, hierro, manganeso, zinc y cobre.

Las cepas presentaron una tendencia al decrecimiento en la conductividad eléctrica, desde 13,17 dS/m del purín hasta 10,96 dS/m, lo que sugiere asimilación de sales y nutrientes por bacterias ácido lácticas adaptadas a ambientes extremos en la Antártida. El nitrato presentó variaciones respecto al purín, sugiriendo limitada asimilación y una posible preferencia de fuentes de nitrógeno más reducidas. El amonio se mantuvo en todas las muestras. El fósforo disminuyó, en especial para *P. pentosaceus* (58), sugiriendo una considerable capacidad de asimilación de fósforo por esta cepa. El potasio y calcio aumentó su concentración en los tratamientos con BAL. El hierro fue bajo en todas las cepas, el cual fue notorio respecto a la cantidad presente en el purín, mostrando niveles bajos. El zinc también redujo su concentración en las cepas, principalmente para la cepa 14. Los resultados sugieren que las cepas *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium*, aislados de fuentes antárticas, presentaron capacidades diferenciadas para la asimilación de minerales y nutrientes del medio; probablemente debido a su fuente de origen. Debido a que estos minerales son limitados allí, las cepas presentaron una capacidad metabólica para la adquisición de los primeros. La capacidad

de las bacterias para modificar la composición mineral del purín demuestra su potencial de aprovechamiento de residuos agroindustriales, incrementando su valor como biofertilizantes. Durante la fermentación, las BAL pueden modificar la disponibilidad de estos nutrientes a través de procesos metabólicos como la acidificación del medio, la asimilación parcial de ciertos compuestos y la generación de metabolitos secundarios. Por ejemplo, la disminución en las concentraciones de fósforo tras la fermentación puede estar relacionada con su integración en biomasa microbiana o su transformación a formas más biodisponibles. La bioconversión de residuos es necesaria para una gestión eficaz de los desechos y el establecimiento de una economía circular. Dahiya *et al.* (2018), concluyeron que los biofertilizantes derivados del purín de cerdo contienen nutrientes esenciales para los cultivos agrícolas, reduciendo o reemplazando la utilización de fertilizantes sintéticos, contribuyendo con la bioeconomía agrícola (Magri *et al.*, 2019). En Chile, la norma chilena NCh 1333 establece los criterios para la calidad del agua, especificando límites para parámetros como nitratos, amonio y conductividad eléctrica. La reutilización de aguas residuales adecuadamente tratadas reduce la demanda de fuentes de agua dulce, y además minimiza la carga contaminante en cuerpos de agua receptores, promoviendo una gestión más responsable de los recursos hídricos. Según la FAO (2020), la utilización de agua residual puede ser una estrategia clave para la adaptación al cambio climático, lo que pone en evidencia la relevancia de este estudio en el contexto actual. Sin embargo, es importante realizar análisis continuos de la calidad del agua tratada para asegurar la conformidad con las normativas establecidas, como las pautas de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés), que enfatizan la importancia de evaluar no solo los parámetros fisicoquímicos, sino también la presencia de contaminantes emergentes y su impacto potencial en la salud humana y el medio ambiente (EPA, 2021). Se observó que los valores obtenidos para cada aislado y el control se mantenían por encima de los límites permisibles establecidos en la norma chilena NCh 1333. Sin embargo, dado que se planea trabajar con diluciones para su uso en fertirriego, estos valores se ajustarían considerablemente, cumpliendo así con lo indicado por la normativa. Es importante destacar que los niveles de nitratos en el agua

tratada se alinean con el criterio que establece que no hay riesgo en su utilización, incluso sin necesidad de dilución. Esto sugiere que el agua es segura para el riego, asegurando que no se generarán efectos negativos en los cultivos o en el suelo. La posibilidad de diluir el agua tratada a un nivel que cumpla con las regulaciones pertinentes no solo optimiza su uso, sino que también promueve prácticas agrícolas más sostenibles. El purín mostró diferencias marcadas en su composición mineral, especialmente en conductividad eléctrica, fósforo, potasio, magnesio, sodio, hierro, manganeso, zinc y cobre. Estos resultados pueden atribuirse a que las cepas, adaptadas a ambientes extremos han logrado asimilar eficazmente sales y nutrientes, lo que es indicativo de su capacidad metabólica (Zayed *et al.*, 2023). La variación en la conductividad eléctrica indica que las bacterias han utilizado los nutrientes presentes en el medio. Además, el comportamiento observado en el nitrato, con variaciones que apuntan a una asimilación limitada, sugiere que las cepas prefieren formas de nitrógeno más reducidas, lo que también es un indicativo de su adaptación metabólica (Yang *et al.*, 2020). El uso de suero de queso en polvo como fuente de carbono proporciona un medio adecuado para el crecimiento de las BAL, potenciando también su actividad biológica, permitiendo que cepas como *Pediococcus pentosaceus* asimilen fósforo, como se evidencia en la disminución de este nutriente durante el proceso (Shen *et al.*, 2019). La fermentación lleva a la acidificación del medio y a la generación de metabolitos secundarios, lo que mejora la disponibilidad de nutrientes. Estas transformaciones son fundamentales para una gestión eficaz de los desechos y la promoción de una economía circular sostenible (Dahiya *et al.*, 2018; Magri *et al.*, 2019).

#### **4.3.7. Análisis microbiológico del agua tratada**

En cuanto a la caracterización microbiológica el purín solo a tiempo inicial presentó un valor medio de *E. coli* de  $5,01 \pm 0,24$  Log UFC mL<sup>-1</sup> de acuerdo los análisis realizados en triplicado. Respecto a la viabilidad celular de las cepas (Tabla 4.6), la cepa 43 mostró el mayor aumento, pasando de 8,00 a 9,85 Log UFC mL<sup>-1</sup>, con una desviación estándar baja ( $\pm 0,18$ ), lo que indica una mayor consistencia en el crecimiento de esta cepa. Las

otras cepas también mostraron aumentos en la viabilidad, con la cepa 14 mostrando un incremento de 7,98 a 8,86, y la cepa 171 un incremento de 7,48 a 8,63 Log UFC mL<sup>-1</sup>. Los aislados presentaron una distribución normal, con homocedasticidad y diferencias significativas a las 0 horas, para los coliformes y para la presencia de *E. coli* (Tabla 4.6). A las 48 horas no se registraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4.6. Análisis microbiológico durante el proceso de fermentación de BAL en medio purín. Valores corresponden a promedio con su respectiva desviación estándar (n=3).

Aislado	Viabilidad 0 h (Log UFC mL <sup>-1</sup> )	Viabilidad 48 h (Log UFC mL <sup>-1</sup> )	Coliformes (Log UFC mL <sup>-1</sup> )	<i>E. coli</i> (Log UFC mL <sup>-1</sup> )
14	7,98 ± 0,48	8,86 ± 0,90	5,35 ± 0,82	4,70 ± 0,30
43	8,00 ± 0,48	9,85 ± 0,18	8,05 ± 0,85	0
58	7,80 ± 0,49	8,72 ± 0,67	5,81 ± 0,81	5,57 ± 0,49
157	7,68 ± 0,61	8,74 ± 0,56	5,44 ± 0,61	5,00 ± 0,32
171	7,48 ± 0,55	8,63 ± 0,67	5,60 ± 0,65	4,88 ± 0,40

Tabla 4.7. Comparación estadística con diferencia significativa (\*) según test de Tukey HSD para la viabilidad a 0 horas, coliformes y *E. coli*.

0 horas			Coliformes			<i>E. coli</i>		
Muestra	Comparación	p valor	Muestra	Comparación	P valor	Muestra	Comparación	P valor
14	43	0,944	14	43	1,000	14	43	0,794
	58	0,006*		58	0,595		58	0,000*
	157	0,000*		157	0,677		157	0,878
	171	0,000*		171	0,366		171	0,995
43	58	0,002*	43	58	0,112	43	58	0,000*
	157	0,000*		157	0,018*		157	0,311
	171	0,000*		171	0,028*		171	0,590

Tabla 4.7 (Continuación)

58	157	0,256	58	157	0,138	58	157	0,000*
	171	0,005*		171	0,397		171	0,000*
157	171	0,152	157	171	0,555	157	171	0,978

En general, las variaciones entre la viabilidad inicial y a las 48 horas fueron moderadas, lo que sugiere un crecimiento adecuado en todos los casos. En cuanto a los coliformes totales, la cepa 43 mostró la mayor cantidad de coliformes con un valor de  $8,05 \pm 0,85$  Log UFC/mL, seguida de la cepa 171 con  $5,60 \pm 0,65$  Log UFC/mL. Las cepas 14, 58 y 157 mostraron valores intermedios, con  $5,35 \pm 0,82$ ,  $5,81 \pm 0,81$  y  $5,44 \pm 0,61$  Log UFC/mL, respectivamente. Es importante resaltar que la cepa 43, además de tener la mayor cantidad de coliformes, mostró nula presencia de *E. coli*, lo que podría indicar una diferente capacidad de inhibir este patógeno en comparación con las otras cepas. Finalmente, en lo que respecta a *Escherichia coli*, la cepa 43 fue la única que no presentó ninguna cantidad detectable de esta bacteria, con un valor 0 Log UFC/mL. Las otras cepas mostraron niveles detectables de *E. coli*, siendo la cepa 58 la que presentó el valor más alto con  $5,57 \pm 0,49$  Log UFC/mL. La cepa 171 presentó un valor de  $4,88 \pm 0,4$  Log UFC/mL, mientras que la cepa 14 mostró  $4,7 \pm 0,30$  Log UFC/mL. La cepa 157, por su parte, presentó  $5,00 \pm 0,32$  Log UFC/mL.

La cepa 43 fue la que más se destacó debido a su elevada densidad de colonias viables en comparación con las demás cepas ensayadas. Eso podría ser explicado por su origen aislado de las heces de petrel antártico. Debido a que las heces son un compartimento biológico con alta carga microbiana, es posible que, al cultivarse en ese ambiente, haya desarrollado mecanismos de supervivencia más resistentes. Por otro lado, su eficacia para inhibir la presencia de *Escherichia coli* y otros coliformes fecales podría deberse también a la producción de bacteriocinas u otros metabolitos antimicrobianos, lo que resulta beneficioso no solo para la viabilidad de la cepa, sino que también disminuye la presencia concurrente de patógenos. Esta respuesta muestra su potencial biotecnológico para su aplicación en sistemas de biorremediación y mejora de la calidad microbiológica de desechos líquidos.

La ausencia de *E. coli* en la cepa 43 podría reflejar una actividad antagonista o un efecto inhibitorio de esta cepa sobre dicho patógeno, lo cual es relevante desde el punto de vista de seguridad alimentaria y biorremediación. Además, concuerda con los resultados en el ensayo de actividad antimicrobiana de este capítulo, donde se obtuvo que *E. faecium* presenta fuerte inhibición contra este patógeno. En general, estos resultados destacan el potencial de las cepas antárticas para sobrevivir y proliferar en condiciones de cultivo específicas, mostrando además algunas características de inhibición selectiva de microorganismos indeseables, lo que sugiere aplicaciones en procesos de fermentación y control de patógenos, además de potencial probiótico. En porcicultura, los géneros probióticos incluyen a *Pediococcus* y *Enterococcus* (Vieco-Saiz *et al.*, 2019). Estos se utilizan en todas las etapas de la crianza de cerdos, desde lechones hasta cerdos en crecimiento y finalización (Barba-Vidal, *et al.*, 2019). Joysowal *et al.* (2018), estudiaron el efecto de un probiótico de *Pediococcus* sobre el crecimiento, la digestibilidad de los nutrientes, el estado de salud, la calidad de la carne y la morfología intestinal en cerdos, mejorando el rendimiento de crecimiento. Es necesario para la porcicultura mantener un tracto gastrointestinal saludable y contar con una estrategia para combatir enfermedades causadas por enteropatógenos, esto permitiría una mejor digestión y absorción de nutrientes (Liao y Nyachoti, 2017).

Las variaciones en los parámetros reflejan el tratamiento con bacterias ácido lácticas. Dichos cambios, además de estar relacionados con la mejora de la calidad del agua, se relacionan con variables funcionales como lo son el crecimiento bacteriano, la producción de EPS y reducción de patógenos. *Enterococcus faecium* mostró una notable capacidad de crecimiento y viabilidad, reduciendo la carga microbiana, incluyendo la eliminación de *Escherichia coli* (Tabla 4.6). Este efecto se atribuye a la producción de metabolitos antimicrobianos y la capacidad para del aislado para metabolizar compuestos orgánicos complejos, lo que se relaciona con una mejora en los parámetros del agua tratada (Bravo *et al.*, 2020; Akpoghelie *et al.*, 2025). La producción de EPS, como se observó en los resultados, influye en la calidad del agua. *E. faecium*, produjo más cantidad de EPS, que mejora la estabilidad microbiana, contribuyendo a la formación de biopelículas como fue

previamente mencionado (Ibrahim *et al.*, 2022; Kaur y Dey, 2023). La capacidad de estas bacterias para generar EPS en un medio complejo como el purín de cerdo resalta su potencial para la remediación de aguas residuales. Por otra parte, la reducción de patógenos, evidenciada en el ensayo de actividad antimicrobiana, muestra la eficacia de las BAL en la inhibición de microorganismos dañinos, lo cual es fundamental para mejorar la calidad del agua tratada y permitir su uso en fertirriego (Rahmeh *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021). La combinación de estos factores da cuenta de que los cambios observados son atribuibles principalmente a la actividad biológica de las BAL.

Una de las limitaciones que se presentó en este estudio es la falta de un control que utilice purín sin tratar. Esto es importante porque sin este grupo de comparación, es difícil apreciar de manera clara el verdadero efecto que las bacterias tienen en la calidad del agua, por lo que es esencial considerar la inclusión de controles adecuados en investigaciones futuras. Esto no solo enriquecería el análisis, sino que también permitiría obtener conclusiones más robustas.

Las bacterias ácido lácticas han ganado interés en el área de la microbiología, especialmente por su aplicación en la alimentación animal. Estas bacterias son reconocidas por su habilidad para inhibir el crecimiento de patógenos, influir de manera positiva en la microbiota gastrointestinal y fortalecer el sistema inmunológico, lo que las transforma en probióticos altamente valorados (Casarotti *et al.*, 2017). La especificidad en función de la cepa vislumbra la necesidad de buscar nuevas variedades, sobre todo aquellas que provienen de entornos singulares. En lo que se refiere a calidad del agua, se evidencia que la acidificación es un factor determinante en la eliminación de contaminantes (Marchwińska y Gwiazdowska, 2021). Las BAL, mediante la producción de ácidos orgánicos, no solo ayudan a bajar el pH del medio, sino que también crean un ambiente desfavorable para el crecimiento de microorganismos patógenos. Este mecanismo de acidificación permite a las BAL competir con éxito por los recursos en un entorno que, de otra manera, podría ser dominado por bacterias patógenas (He *et al.*, 2019). Por tanto, la producción de ácido láctico no solo actúa como un mecanismo defensivo contra los patógenos, sino que también fomenta el crecimiento de las BAL al

crear un contexto más favorable para su desarrollo (Sirichokchatchawan *et al.* 2018). Otro aspecto clave que resalta en los estudios sobre BAL es la competencia por nutrientes. La habilidad de estas bacterias para aprovechar eficientemente los recursos disponibles, como carbohidratos y proteínas, les permite no solo multiplicarse, sino también suprimir a otros microorganismos no deseados (De Souza *et al.* 2019). En cuanto a EPS, estos compuestos no solo ayudan en la formación de biopelículas que estabilizan las comunidades microbianas, sino que también aumentan la capacidad de adhesión y colonización de las BAL. De esta forma, estas bacterias poseen potencial gracias a su capacidad de acidificación, competencia por nutrientes y producción de compuestos beneficiosos.

La relación entre el pH y la temperatura radica en que estas bacterias, al producir ácidos orgánicos durante su metabolismo contribuyen a la disminución del pH del medio, creando un entorno hostil para patógenos, los cuales también poseen una sensibilidad a cambios en la temperatura (Marchwińska y Gwiazdowska, 2021). Algunos estudios han indicado que la viabilidad de las BAL mejora en condiciones de baja temperatura, lo que sugiere que el almacenamiento y la manipulación de estas cepas debe considerar estos factores para maximizar su efectividad (Ren *et al.*, 2019). Además, la capacidad de estas bacterias para adaptarse a diferentes pH y temperaturas es crucial para su aplicación en la alimentación animal y en procesos de bioconversión, donde la estabilidad y actividad funcional son esenciales para obtener resultados óptimos en la mejora de la salud animal y la calidad del agua tratada (He *et al.*, 2019; Sirichokchatchawan *et al.*, 2018).

#### **4.3.8. Ensayo de fitotoxicidad**

El índice de germinación de las semillas de *Raphanus sativus* expuestas a diferentes tratamientos, mostró variaciones entre los grupos (Figura 4.7). El tratamiento con purín obtuvo un índice de germinación de 56,36%, mientras que el tratamiento con purín tratado por UV (P UV) presentó un valor de 53,55%. Por otro lado, el tratamiento con purín tratado con suero esterilizado (P+S) mostró el índice de germinación más bajo, con un 46,39%. En cuanto a las cepas de BAL, las muestras 14, 58, 157 y 171 mostraron índices de

germinación de 62,18%, 83,81%, 82,17% y 80,04%, respectivamente. De los tratamientos aplicados, la cepa 43 presentó diferencias estadísticamente significativas con todos los tratamientos (Tabla 4.8), y además presentó el índice de germinación más alto, con un 109,46%, además del mayor crecimiento radicular (Figura 4.8) seguido por las cepas 58, 157 y 171.

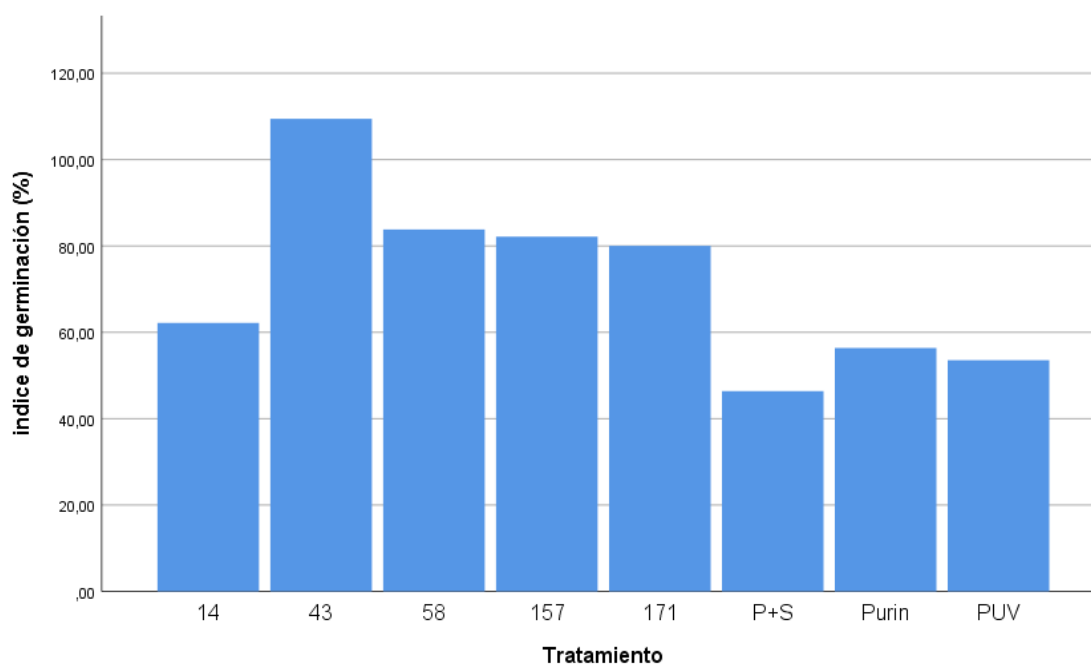


Figura 4.7. Índices de germinación para semillas de *R. sativus* sometidas a ensayo con medio purín fermentado con BAL antártica.

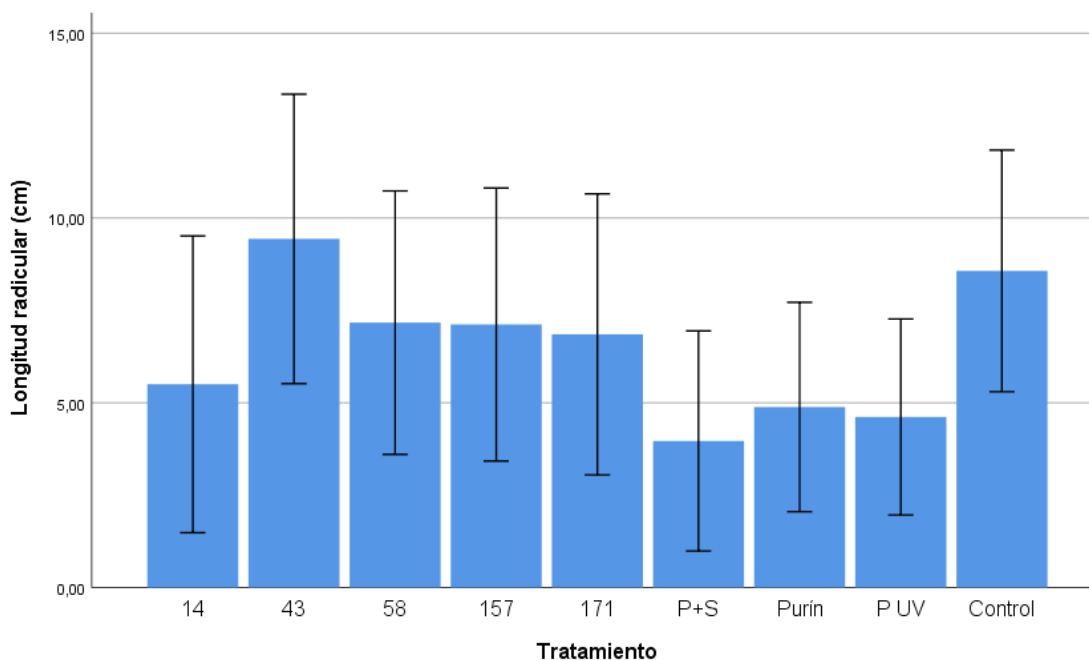


Figura 4.8. Longitud radicular para cada tratamiento fermentado con aislado de BAL antártica. Valores corresponden a la media con la desviación estándar (n=3).

Tabla 4.8. Comparación estadística con diferencias significativas (\*) según test de U de Mann Whitney entre los valores crecimiento radicular para aislados antárticos y los controles.

Muestra	Comparación	p-valor
Control	Purín	0,000 *
	P UV	0,000 *
	P+S	0,000 *
	14	0,002 *
	43	0,051
	58	0,069
	157	0,050
	171	0,041 *
	P UV	0,659
	P+S	0,338
Purín	14	0,263
	43	0,000 *
	58	0,001 *
	157	0,002 *
	171	0,004 *
P UV	P+S	0,641

Tabla 4.8 (continuación)		
	14	0,137
	43	0,000 *
	58	0,000 *
	157	0,000 *
	171	0,001 *
	14	0,042 *
	43	0,000 *
P+S	58	0,000 *
	157	0,000 *
	171	0,000 *
	43	0,000 *
14	58	0,053
	157	0,116
	171	0,145
	58	0,000 *
43	157	0,000 *
	171	0,000 *
58	157	0,522
	171	0,495
157	171	0,910

*Enterococcus faecium* podría producir metabolitos o modificar el medio de manera que favorezca la germinación y el crecimiento de las radículas, lo cual es consistente con el perfil de *E. faecium* en otros estudios, donde se ha observado que puede contribuir a la mejora de la calidad de sustratos. Las cepas de *Pediococcus pentosaceus* presentaron una variabilidad en la producción de compuestos que influyen en el crecimiento de las plantas según la fuente de aislamiento. En conjunto, estos resultados sugieren que algunas cepas de origen antártico pueden tener un efecto benéfico en la reducción de la fitotoxicidad del purín y podrían ser útiles en la biorremediación y bioestimulación del crecimiento de plantas en suelos tratados con desechos animales. Existen estudios que sostienen que algunas cepas de BAL son candidatas prometedoras como biorremediadoras de diversos tipos de agua residual (Saxena *et al.*, 2020; Sreedevi *et al.*, 2022; Liaqat *et al.*, 2023; Lejri *et al.*, 2024). El fertirriego con BAL antártica podría posicionarse como una alternativa sostenible en la agricultura, ya que se evidencia que estas cepas afectan la calidad química de los sustratos y la biodisponibilidad de los

nutrientes. Es necesario estudiar más a fondo los metabolitos específicos producidos por cada cepa y su mecanismo de acción, si bien estos resultados son preliminares, establecen una base para futuras investigaciones sobre el tema.

El índice de germinación (IG) es el parámetro de fitotoxicidad que se emplea mayoritariamente para evaluar la toxicidad en plantas. Para respaldar la afirmación de que el producto de fermentación no genera efectos fitotóxicos, se debe considerar previamente normativas que regulan la seguridad de los productos utilizados en la agricultura. No se encontró un valor umbral de IG para agua residual tratada en la normativa nacional, aunque la Norma Chilena NCh 2880, que establece requisitos para el compost, indica que el producto final debe cumplir con tolerancias específicas a microorganismos patógenos, como coliformes fecales y *Salmonella*, lo que asegura que el compost y sus aditivos sean seguros para el uso agrícola. Además, el compost debe ser evaluado en términos de su madurez y calidad, asegurando que no contenga niveles perjudiciales de metales pesados ni organismos patógenos que puedan afectar negativamente el crecimiento de las plantas. El proceso de compostaje, al ser aeróbico y controlado, permite la pasteurización del producto, lo que minimiza la presencia de microorganismos dañinos (NCh 2880). Investigaciones previas también respaldan estos hallazgos, ya que estudios han demostrado que el uso de ciertas cepas de microorganismos en compost no solo es seguro, sino que puede promover un crecimiento saludable en las plantas y mejorar la calidad del suelo (FAO, 2023).

Algunos autores, como Zucconi *et al.* (1981), Varnero *et al.* (2006) y Parra-Orobio (2021) señalan que el IG entrega una visión que integra el porcentaje de germinación y el crecimiento relativo de las raíces. En muchos países se ha introducido este término para evaluar la calidad del tratamiento aplicado (Da Ros *et al.*, 2018). Según Zucconi *et al.* (1981), un  $IG \geq 80\%$  indica a ausencia de sustancias que puedan considerarse fitotóxicas o una muy baja concentración de ellas; un  $IG \leq 50\%$  señala una fuerte presencia sustancias fitotóxicas, mientras que valores entre 50% y 80% son indicadores de una presencia moderada. Según los resultados, el aislado 43 (*E. faecium*) alcanzó aproximadamente un 110% de IG, superando el umbral del 80% establecido por Zucconi

*et al.* (1981). Esto indica que no hay sustancias fitotóxicas presentes en concentraciones significativas en este tratamiento. En este estudio se realizó la correlación de Spearman (para datos no paramétricos), obteniendo una correlación positiva (0,857) entre el IG y la producción de EPS, por lo que hay una relación consistente entre ambas variables. Esto implica que los EPS podrían estar contribuyendo de manera beneficiosa al crecimiento de las plantas. Esta relación podría contribuir a que se esté facilitando la absorción de nutrientes o creando mejores condiciones en el sustrato donde se siembran las semillas. Con el valor obtenido en el IG de la cepa 43, se puede interpretar un efecto positivo en el desarrollo de las semillas, lo que representa un hallazgo significativo en la investigación sobre el uso de estos microorganismos para mejorar los suelos y promover prácticas agrícolas más sostenibles. Así, se tiene se concluye que la cepa de mayor índice de germinación, además de ser segura, tiene el potencial de ser aplicada en prácticas de valorización agrícola, contribuyendo a un manejo más sostenible de los recursos naturales.

#### **4.4. Conclusiones**

Los resultados de esta investigación podrían sustentar un cambio de paradigma en las prácticas de gestión de residuos en la industria agropecuaria, impulsando nuevas tecnologías limpias, acoplándose a las técnicas ya utilizadas, además de contribuir con una economía circular. Para la industria, el uso de bacterias lácticas en la fermentación de purines representa una solución eficiente para reducir la carga microbiana patógena, estabilizar nutrientes esenciales y disminuir la toxicidad de los residuos. Lo anterior, puede traducirse en una solución nutritiva orgánica utilizada en fertirriego de bajo costo y alta calidad, reduciendo la dependencia de insumos químicos y mejorando la rentabilidad. Además, la biodisponibilidad de la carga orgánica en los purines minimiza la probabilidad de generar impactos ambientales negativos por los patógenos, vectores y eutrofización y promueve una imagen más responsable y sostenible de la actividad agropecuaria.

La síntesis de los experimentos marca diferencias entre el desempeño de las cinco cepas, considerando su especie y valor nutricional. *Enterococcus faecium* (43), fue la mejor productora de exopolisacáridos, superando a las demás cepas en un 50%, con capacidad antimicrobiana contra *E. coli*, considerándose un buen candidato para la biotecnología en el sector porcino. *Enterococcus faecium* (43) fue la más viable, inhibidora de *E. coli*, con un rendimiento que fue 1,5 veces superior al de las cepas menos efectivas en términos de viabilidad microbiana, constituyéndose como una buena opción para usar el control microbiológico en purín.

*Enterococcus faecium* y *Pediococcus pentosaceus* mostraron un rendimiento sobresaliente en la producción de EPS, alcanzando concentraciones de 39,14 y 34,8 mg/L respectivamente, lo que resalta su potencial como formadores de biopelículas. En lo que respecta a la demanda química de oxígeno (DQO), la cepa 14 de *P. pentosaceus* presentó el valor más alto, con 9.600 mg/L, lo que indica su habilidad para degradar compuestos orgánicos complejos y dejarlos biodisponibles. *E. faecium* mostró una DQO de 8.800 mg/L, lo que evidencia su eficacia en la asimilación de materia orgánica. Estas variaciones en la DQO reflejan diferencias en la actividad metabólica de cada aislado, aspectos importantes a considerar para la optimización de los procesos de tratamiento de aguas residuales. En el análisis microbiológico del agua tratada, se observó que *E. faecium* no presentó *E. coli* detectable, señalando su potencial en el control biológico de patógenos en los efluentes. Además, la cepa 43 mostró un efecto sobresaliente en el índice de germinación de semillas de rábano, lo que sugiere que su uso no solo ayuda a reducir la carga orgánica y mejora la calidad del agua tratada, sino que también favorece el crecimiento de las plantas. En conclusión, las cepas analizadas no solo se destacaron en la producción de EPS y el aumento de la biodisponibilidad de nutrientes, sino que también demostraron un rendimiento superior en la inhibición de patógenos y en el fomento del crecimiento de las plantas.

En particular, *Pediococcus pentosaceus*, tuvo resultados promedios en casi todos los parámetros, destacando su utilización de nutrientes. Los aislados 157 y 58 tuvieron valores más bajos en antimicrobianos y exopolisacáridos, subrayando una aplicabilidad

muy específica. Este marco experimental apoya la necesidad de selección de cepas con características apropiadas para producir los máximos sobre esta manipulación de residuos y también proporciona un fundamento para la investigación futura en relación con la optimización de explotación de estos conceptos.

Cuando los desechos tratados se incorporan al suelo como biofertilizantes, se cierra el ciclo de nutrientes, lo que mejora su calidad y promueve la captura nutritiva. Este enfoque también permitiría reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, como metano y amoníaco, relacionadas con el almacenamiento y la gestión inadecuados del purín. En resumen, la intersección de la ciencia ambiental, la biotecnología y la microbiología antártica proporciona beneficios no solo para la industria, sino también al medio ambiente, en un esfuerzo por instaurar un futuro más sostenible y eficiente.

La hipótesis plantea que las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de ambientes antárticos pueden mejorar el tratamiento de aguas residuales porcinas, incrementando la biodisponibilidad de nutrientes y favoreciendo la producción de exopolisacáridos. Entre los logros destacados, se encuentra la capacidad de cepas como *Enterococcus faecium* y *Pediococcus pentosaceus* para desarrollarse en esta agua residual compleja. Esto sugiere que estas bacterias son efectivas en la hidrólisis de compuestos complejos, incrementando la biodisponibilidad de nutrientes. Asimismo, la producción de exopolisacáridos implica que estas cepas pueden contribuir a la formación de biopelículas, lo que mejora la estabilidad del sistema microbiano y garantiza su viabilidad en condiciones desafiantes. Es fundamental considerar las limitaciones que podrían influir en esta hipótesis. Aunque los resultados son alentadores, la variabilidad en la eficacia de las cepas en distintas condiciones de tratamiento puede ser un punto a tener en cuenta. Las diferencias en los valores de DQO y en la producción de exopolisacáridos entre las cepas indican que no todas tienen el mismo potencial, lo que podría complicar la estandarización del proceso a nivel industrial. Además, aunque la ausencia de *E. coli* en algunas cepas es un dato positivo, también genera dudas sobre su capacidad para competir con otros microorganismos en un entorno de tratamiento real, donde la diversidad microbiana es considerable, por lo que considerar el tratamiento con un

consorcio microbiano es un factor a tener en cuenta. Otros parámetros como la temperatura y el pH también pueden afectar la actividad de estas cepas, limitando su aplicabilidad a mayor escala. Aunque los logros alcanzados respaldan la hipótesis y muestran un gran potencial para estas cepas de bacterias ácido-lácticas en el tratamiento de aguas residuales porcinas, es esencial abordar las limitaciones identificadas, ya que la variabilidad en su rendimiento y las condiciones de aplicación deben ser evaluadas para validar su uso como biofertilizantes en un contexto agrícola más amplio.

En el alineamiento de las conclusiones del Capítulo IV con los objetivos de la tesis, es preciso visualizar cómo los resultados obtenidos se vinculan con cada uno de ellos.

Primeramente, en relación con el objetivo específico OE2, que busca evaluar el potencial de los aislados bacterianos para la recuperación y aprovechamiento de nutrientes presentes en aguas residuales porcinas, se concluye que, aunque no se logró una recuperación de nutrientes en el sentido estricto, sí se evidenció un aprovechamiento de estos, ya que estaban incluidos en el agua tratada. Esto indica que las cepas de BAL pueden mejorar la calidad del agua, lo que representa un potencial valioso para la gestión de purines. Respecto al objetivo OE3, que se centra en caracterizar los aislados bacterianos en función de su posible aplicación como biofertilizante, se identificó el aislado 43 (*Enterococcus faecium*) que presentó un índice de germinación superior al 100%. Este hallazgo no solo respalda la viabilidad de utilizar estos aislados como biofertilizantes, sino que también resalta su capacidad para fomentar el crecimiento de las plantas y su efectividad en el ámbito agrícola.

#### **4.5. Referencias**

Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K., & Sanni, A. I. 2018. Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based Nigerian fermented food products. *Food Control*, 92, 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.062>

- Akpoghelie, P. O., Edo, G. I., Ali, A. B. M., Yousif, E., Zainulabdeen, K., Owheruo, J. O., Isoje, E. F., Igbuku, U. A., Essaghah, A. E. A., Makia, R. S., Ahmed, D. S., Umar, H., & Alamiery, A. A. 2025. Lactic acid bacteria: Nature, characterization, mode of action, products and applications. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 152, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.02.010>.
- Alva-Araujo, J. P., Cano-Arcos, G. A., Juscamaita-Morales, J. G., & Quipuzco Ushñahua, L. 2021. Reduction of pH by homolactic fermentation as indicator of fecal coliform inactivation in wastewater. *Ecología Aplicada*, 20(1), 93. <https://doi.org/10.21704/rea.v20i1.1693>
- Ameen, F. A., Hamdan, A. M., & El-Naggar, M. Y. 2020. Assessment of the heavy metal bioremediation efficiency of the novel marine lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* MF042018. *Scientific Reports*, 10(1), 314. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57210-3>
- Anumudu, C. K., Miri, T., & Onyeaka, H. 2024. Multifunctional Applications of Lactic Acid Bacteria: Enhancing Safety, Quality, and Nutritional Value in Foods and Fermented Beverages. *Foods*, 13(23), 3714. <https://doi.org/10.3390/foods13233714>.
- Ascanta, P., Hanganu, A., Marinas, I. C., Hidalgo, J., Gradisteanu-Pircalabioru, G., Chifiriuc, M. C., & Tenea, G. N. 2025. Probiotic potential and exopolysaccharide characterization of two native lactic acid bacteria for functional applications. *Food Bioscience*, 68(106600), 106600. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106600>
- Balboa-Luna, C., & Vergara-González, L. 2021. Potencial aplicación de bacterias ácido lácticas en sistemas de tratamiento de agua. *Ecosistemas: revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 30 (2), 1–9. <https://doi.org/10.7818/ecos.2224>
- Barba-Vidal, E., Martín-Orúe, S. M., & Castillejos, L. 2019. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review. *Livestock Science*, 223, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.02.017>
- Bhavadharani, M., Joseph, B., Sivanandham, V., Krishnamoorthy, S., & Baskaran, N. 2023. Metabolites of lactic acid bacteria (LAB): Production, formulation and potential applications in food industries (pp. 139–228). *Prospective Research and Technological*

Advancements in Food and Health Sciences. Scientific Publishers.  
<https://doi.org/10.22573/spg.023.978-93-90357-07-9/6>

Bravo, C. M., Quijano, R. R., Gálvez López, D., Albores, V., & Vázquez Ovando, A. 2020. Antifungal ability of chitosan biofilms containing lactic acid bacteria. *Journal of Negative & No Positive Results*, 5(10), 1071–1096.  
<https://doi.org/https://dx.doi.org/10.19230/jonnpr.3545>

Camesasca, L., de Mattos, J. A., Vila, E., Cebreiros, F., & Lareo, C. 2021. Lactic acid production by *Carnobacterium* sp. isolated from a maritime Antarctic lake using eucalyptus enzymatic hydrolysate. *Biotechnology Reports*, 31, e00643.  
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00643>

Casarotti, S. N., Carneiro, B. M., Todorov, S. D., Nero, L. A., Rahal, P., & Penna, A. L. B. 2017. In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiology*, 67(4), 289–301. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1258-2>

Casillo, A., Parrilli, E., Sannino, F., Mitchell, D. E., Gibson, M. I., Marino, G., Lanzetta, R., Parrilli, M., Cosconati, S., Novellino, E., Randazzo, A., Tutino, M. L., & Corsaro, M. M. (2017). Structure-activity relationship of the exopolysaccharide from a psychrophilic bacterium: A strategy for cryoprotection. *Carbohydrate Polymers*, 156, 364–371.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.037>

Cazaudehore, G., Schraauwers, B., Peyrelasse, C., Lagnet, C., & Monlau, F. 2019. Determination of chemical oxygen demand of agricultural wastes by combining acid hydrolysis and commercial COD kit analysis. *Journal of Environmental Management*, 250(109464), 109464. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109464>

Chen, C., Xiong, Y., Xie, Y., Zhang, H., Jiang, K., Pang, X. N., Huang, M. 2022. Metabolic characteristics of lactic acid bacteria and interaction with yeast isolated from light-flavor Baijiu fermentation. *Food Bioscience*, 50 (Part A), 102102.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102102>.

Chen, B., Zhu, Y., Wu, M., Xiao, Y., Huang, J., Lin, C., & Weng, B. 2024. Research Advancements in Swine Wastewater Treatment and Resource-Based Safe Utilization

- Management Technology Model Construction. *Water*, 16(5), 661. <https://doi.org/10.3390/w16050661>
- Da Ros, C., Libralato, G., Ghirardini, A. V., Radaelli, M., & Cavinato, C. (2018). Assessing the potential phytotoxicity of digestate from winery wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.029>
- Daba, G. M., Elnahas, M. O., & Elkhateeb, W. A. 2021. Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.110>
- Dahiya, S., Kumar, A. N., Shanthi Sravan, J., Chatterjee, S., Sarkar, O., & Mohan, S. V. 2018. Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 248, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.176>
- De Brito, L. P., da Silva, E. C., Lins, L. F., Severo de Medeiros, R., Silva, F. C. O., Pastrana, L., Cavalcanti, I. D. L., de Britto Lira-Nogueira, M. C., Cavalcanti, M. T. H., & Porto, A. L. F. 2024. Optimization, structural characterization, and biological applications of exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecium* KT990028. *International Journal of Biological Macromolecules*, 282(136926), 136926. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136926>
- De Jesús, R. A., Łukasik, N., Kumar, A., & Ferreira, L. F. R. 2024. Innovative strategies: Combining treatments for advanced wastewater purification (pp. 275–291). *Advances in Chemical Pollution, Environmental Management and Protection* 10, 275-291. <https://doi.org/10.1016/bs.apmp.2023.08.007>
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *The Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- De Simone, N., Rocchetti, M. T., la Gatta, B., Spano, G., Drider, D., Capozzi, V., Russo, P., & Fiocco, D. 2023. Antimicrobial Properties, Functional Characterisation and Application of *Fructobacillus fructosus* and *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from

- Artisanal Honey. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(5), 1406–1423.  
<https://doi.org/10.1007/s12602-022-09988-4>
- De Sousa, GB, Tamagnini, LM, González, RD y Budde, CE 2005. Evaluation of Petrifilm method for enumerating aerobic bacteria in Crottin goat cheese. *Revista Argentina de Microbiología*, 37 (4), 214–216. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01250-x>
- de Souza, B. M. S., Borgonovi, T. F., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., & Penna, A. L. B. 2019. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* strains isolated from mozzarella cheese: Probiotic potential, safety, acidifying kinetic parameters and viability under gastrointestinal tract conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 382–396.  
<https://doi.org/10.1007/s12602-018-9406-y>
- Dhruv, D., Pandya, D., Prajapati, C., & Bhatt, S. 2021. Assessing probiotic potential of gut microflora from Indian major carps. *Advances in BioResearch* 12 (5): 85-92.  
<https://doi.org/10.15515/abr.0976-4585.12.5.8592>
- Du, R., Ping, W., & Ge, J. 2022. Purification, characterization and mechanism of action of enterocin HDX-2, a novel class IIa bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* HDX-2. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 153(112451), 112451. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112451>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- El-Sheshtawy, H. S., Fahim, I., Hosny, M., & El-Badry, M. A. 2022. Optimization of lactic acid production from agro-industrial wastes produced by *Kosakonia cowanii*. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 100228.  
<https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100228>
- Erginkaya, Z., & Konuray-Altun, G. 2022. Potential biotherapeutic properties of lactic acid bacteria in foods. *Food Bioscience*, 46(101544), 101544.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101544>
- Fischer, S., López-Ramírez, V., & Asconapé, J. 2024. Historical advancements in understanding bacteriocins produced by rhizobacteria for their application in

- agriculture. Rhizosphere, 31(100908), 100908.  
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100908>
- Gou, Y., Yang, S., Cheng, Y., Song, Y., Qiao, P., Li, P., Ma, J. 2019. Enhanced anoxic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aged soil pretreated by hydrogen peroxide. Chemical Engineering Journal, 356, 524-533.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.09.059>.
- Grzesiak, J., Kaczyńska, A., Gawor, J., Żuchniewicz, K., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Gromadka, R., & Zdanowski, M. K. 2020. A smelly business: Microbiology of Adélie penguin guano (Point Thomas rookery, Antarctica). The Science of the Total Environment, 714(136714), 136714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136714>
- Grobben, G. J., Chin-Joe, I., Kitzen, V. A., Boels, I. C., Boer, F., Sikkema, J., Smith, M. R., de Bont, J. A. M. 1998. Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. Applied and Environmental Microbiology, 64(4), 1333–1337.  
<https://doi.org/10.1128/aem.64.4.1333-1337>.
- Gu, Q. 2023. Agriculture. In: Bacteriocins (pp. 127–152). Springer Nature Singapore.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-99-2661-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-99-2661-9_7)
- He, T., Zhu, Y.-H., Yu, J., Xia, B., Liu, X., Yang, G.-Y., Su, J.-H., Guo, L., Wang, M.-L., & Wang, J.-F. 2019. *Lactobacillus johnsonii* L531 reduces pathogen load and helps maintain short-chain fatty acid levels in the intestines of pigs challenged with *Salmonella enterica* *Infantis*. Veterinary Microbiology, 230, 187–194.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.003>
- Hoekstra, N. J., Bosker, T., & Lantinga, E. A. 2002. Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). Agriculture, Ecosystems & Environment, 93(1–3), 189–196.  
[https://doi.org/10.1016/s0167-8809\(01\)00348-6](https://doi.org/10.1016/s0167-8809(01)00348-6)
- Hu, D., Wu, J., Jin, L., Yuan, L., Li, J., Chen, X., & Yao, J. 2021. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains as probiotic adjunct cultures for soybean milk post-fermentation.

- Food Research International, 148, 110570.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110570>
- Hualpa-Cutipa, E., Acosta, R. A. S., Cariga, O. J. M., Espinoza-Medina, M. A., Hansen-Reyes, M., Medina-Cerna, D., Cortez-Lázaro, A. A. 2022. Omics insights into cold environments: Cold-tolerant microorganisms and their potential use in bioremediation. In: V. Kumar, & I.S. Thakur (Eds.), *Omics Insights in Environmental Bioremediation* (pp. 437-453). Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-4320-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-19-4320-1_19)
- Huët, M. A. L., & Puchooa, D. 2017. Bioremediation of heavy metals from aquatic environment through microbial processes: A potential role for probiotics? *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.7324/jabb.2017.50603>
- Ibrahim, H. A. H., Abou Elhassayeb, H. E., & El-Sayed, W. M. M. 2022. Potential functions and applications of diverse microbial exopolysaccharides in marine environments. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 20(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00432-2>
- Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor, P. G., Hu, Z., McCabe, M., Cormican, P., Zhan, X., & Gardiner, G. E. 2019. Exploring the roles of and interactions among microbes in dry co-digestion of food waste and pig manure using high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1344-0>
- Joysowal, M., Saikia, B. N., Dowarah, R., Tamuly, S., Kalita, D., & Choudhury, K. B. D. 2018. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* FT28 on growth performance, nutrient digestibility, health status, meat quality, and intestinal morphology in growing pigs. *Veterinary World*, 1669–1676. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1669-1676>
- Kaur, N., & Dey, P. 2023. Bacterial exopolysaccharides as emerging bioactive macromolecules: from fundamentals to applications. *Research in Microbiology*, 174 (4), 104024. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.104024>
- Kavitake, D., Devi, P. B., Delattre, C., Reddy, G. B., & Shetty, P. H. (2023). Exopolysaccharides produced by *Enterococcus* genus — An overview. *International*

- Journal of Biological Macromolecules, 226, 111–120.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.042>
- Kharangate-Lad, A., & D'Souza, N. C. 2021. Current approaches in bioremediation of toxic contaminants by application of microbial cells; biosurfactants and bioemulsifiers of microbial origin. In: V. Kumar, R. Prasad, & M. Kumar (Eds.), *Rhizobiont in Bioremediation of Hazardous Waste* (pp. 217-263). [https://doi.org/10.1007/978-981-16-0602-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-16-0602-1_11).
- Kim, B.-M., Ahn, D.-H., Kim, J.-H., Jung, J.-W., Rhee, J.-S., & Park, H. 2018. De novo assembly and annotation of the blood transcriptome of the southern giant petrel *Macronectes giganteus* from the South Shetland Islands, Antarctica. *Marine Genomics*, 42, 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2018.05.003>
- Komora, N., Maciel, C., Pinto, C. A., Ferreira, V., Brandão, T. R. S., Saraiva, J. M. A., Castro, S. M., & Teixeira, P. 2020. Non-thermal approach to *Listeria monocytogenes* inactivation in milk: The combined effect of high pressure, pediocin PA-1 and bacteriophage P100. *Food Microbiology*, 86(103315), 103315. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103315>
- Korczyk, E., & Varga, L. 2021. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014>
- Kouhi, F., Mirzaei, H., Nami, Y., Khandaghi, J., & Javadi, A. 2022. Potential probiotic and safety characterisation of enterococcus bacteria isolated from indigenous fermented motil cheese. *International Dairy Journal*, 126, 105247. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105247>.
- Krishnan, A., Convey, P., Gonzalez-Rocha, G., & Alias, S. A. 2016. Production of extracellular hydrolase enzymes by fungi from King George Island. *Polar Biology*, 39(1), 65–76. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1606-7>.
- Lamssali, M., Mantripragada, S., Deng, D., & Zhang, L. (2024). Enhancing Swine Wastewater Treatment: A Sustainable and Systematic Approach through Optimized

- Chemical Oxygen Demand/Sulfate Mass Ratio in Attached-Growth Anaerobic Bioreactor. *Environments*, 11(8), 162. <https://doi.org/10.3390/environments11080162>
- Lejri, R., Mekki, A., Ellafi, A., Henchiri, S., Giner Tarazón, J., Valero Tebar, J., D'Auria, G., Chamkha, M., Chaieb, M., Džunková, M., & Ben Younes, S. 2024. Genomic features of metal-resistant bacteria suitable for tannery effluent bioremediation. *Journal of Water Process Engineering*, 68, 106406. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106406>
- Li, W., Ren, M., Duo, L., Li, J., Wang, S., Sun, Y., Li, M., Ren, W., Hou, Q., Yu, J., Sun, Z., Sun, T. 2020b. Fermentation characteristics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from naturally fermented dairy products and screening of potential starter isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11:1794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01794>.
- Lian, T., Zhang, W., Cao, Q., Yin, F., Wang, S., Zhou, T., Wei, X., Zhang, F., Zhang, Z., & Dong, H. 2024. Enzyme enhanced lactic acid fermentation of swine manure and apple waste: Insights from organic matter transformation and functional bacteria. *Journal of Environmental Management*, 356, 120573. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120573>
- Liao, S. F., & Nyachoti, M. 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition* 3 (4), 331–343. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.007>
- Liaqat, I., Khalid, A., Rubab, S., Rashid, F., Latif, A. A., Naseem, S., Bibi, A., Khan, B. N., Ansar, W., Javed, A., Afzaal, M., Summer, M., Majid, S., Ali, S., & Aftab, M. N. 2023. In vitro biofilm-mediated biodegradation of pesticides and dye-contaminated effluents using bacterial biofilms. *Microorganisms*, 11 (9), 2163. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092163>
- López-Sánchez, A., Silva-Gálvez, A. L., Aguilar-Juárez, Ó., Senés-Guerrero, C., Orozco-Nunnally, D. A., Carrillo-Nieves, D., & Gradilla-Hernández, M. S. 2022. Microalgae-based livestock wastewater treatment (MbWT) as a circular bioeconomy approach: Enhancement of biomass productivity, pollutant removal and high-value compound production. *Journal of Environmental Management*, 308(114612), 114612. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114612>

- Machado, T. S., Decesaro, A., Cappellaro, Â. C., Machado, B. S., Reginato, K. van S., Reinehr, C. O., Thomé, A., & Colla, L. M. 2020. Effects of homemade biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* on bioremediation efficiency of a clay soil contaminated with diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110798. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110798>
- Magri, M. E., Carlon, P., Cruz, L. J. M., & Dalri-Cecato, L. 2019. Closing the loop on biogas plants: Recycling digestate and sludge on agriculture and microbial risk assessment. In *Biofuel and Biorefinery Technologies* (pp. 257–275). Springer International Publishing.
- Mao, Q., Sun, X., Sun, J., Zhang, F., Lv, A., Hu, X., & Guo, Y. 2020. A candidate probiotic strain of *Enterococcus faecium* from the intestine of the crucian carp *Carassius auratus*. *AMB Express*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-00973-0>
- Marchwińska, K., & Gwiazdowska, D. 2021. Isolation and probiotic potential of lactic acid bacteria from swine feces for feed additive composition. *Archives of Microbiology*, 204(1), 61. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02700-0>
- Martha-Lucero, N., Viniestra-González, G., González-Olivares, L., & Cruz-Guerrero, A. 2023. Biofilm formation by agave epiphytic lactic acid bacteria fed with agave fructans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(11), 299. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03749-3>
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E. A., & Pessione, E. 2014. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*, 32 (7), 1216–1236. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.005>.
- Meléndez, J. A., Lemos, M. M., Domínguez, I., & Oviedo, R. 2018. Reutilización de aguas grises domésticas para el uso eficiente del recurso hídrico: aceptación social y análisis financiero. Un caso en Portugal. *Revista UIS Ingenierías*, 18 (1), 222–236. <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistauisingenierias/article/view/8781/8680>
- Meruvu, H. 2023. Strategy for Revalorization of Cheese Whey Streams to Produce Phenyllactic Acid. *Eng. Proc.*, 37(1), 88. <https://doi.org/10.3390/ecp2023-14708>

- Mora-Villalobos, J.A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., López-Gómez, J.P. 2020. Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation* 6:23. doi:10.3390/fermentation6010023.
- Mouro, C., Gomes, A. P., & Gouveia, I. C. 2024. Microbial Exopolysaccharides: Structure, Diversity, Applications, and Future Frontiers in Sustainable Functional Materials. *Polysaccharides*, 5(3), 241-287. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides5030018>
- Özkan, E. R., Demirci, T., & Akin, N. 2021. In vitro assessment of probiotic and virulence potential of *Enterococcus faecium* strains derived from artisanal goatskin casing Tulum cheeses produced in central Taurus Mountains of Turkey. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 141(110908), 110908. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110908>
- Paladhi, A. G., Joshi, J. T., George, A., Manohar, M. V., Vallinayagam, S., & Malik, J. A. 2022. Lipase and lactic acid bacteria for biodegradation and bioremediation. In: J.A. Malik (Ed.), *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation* (pp. 265-286). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90452-0.00004-9>.
- Parra-Orobio, B. A., Rotavisky-Sinisterra, M. P., Pérez-Vidal, A., Marmolejo-Rebellón, L. F., & Torres-Lozada, P. 2021. Physicochemical, microbiological characterization and phytotoxicity of digestates produced on single-stage and two-stage anaerobic digestion of food waste. *Sustainable Environment Research*, 31(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s42834-021-00085-9>
- Patel, M., Prasad W., Naithani H., Nataraj B.H., Arora S., Behare P.V. 2021. Comparative evaluation of in situ and ex-situ iron-complexing ability of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria in whey medium. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie (Food Science and Technology)*, 147, 111598. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111598>.
- Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M., & Oliveira, R. P. S. 2017. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers.

- Biotechnology Advances, 35(3), 361–374.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>
- Rahmeh, R., Akbar, A., Alonaizi, T., Kishk, M., Shajan, A., & Akbar, B. 2020. Characterization and application of antimicrobials produced by *Enterococcus faecium* S6 isolated from raw camel milk. *Journal of Dairy Science*, 103(12), 11106–11115.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18871>
- Rama, G., Kuhn, D., Beux, S., Jachetti Maciel, M., Volken de Souza, C.F. 2019. Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *International Dairy Journal*, 98, 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.012>.
- Rehaiem, A., Belgacem, Z. B., Edalatian, M. R., Martínez, B., Rodríguez, A., Manai, M., & Guerra, N. P. 2014. Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA. *Food Control*, 37, 343–350.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.044>
- Ren, H., Zentek, J., & Vahjen, W. 2019. Optimization of Production Parameters for Probiotic *Lactobacillus* Strains as Feed Additive. *Molecules*, 24(18), 3286.  
<https://doi.org/10.3390/molecules24183286>
- Sadzawka R., A. 2006. Métodos de análisis de agua para riego [en línea]. Santiago: Serie Actas - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 37. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/8542>.
- Sakandar, H. A., & Zhang, H. 2021. Trends in Probiotic(s)-Fermented milks and their in vivo functionality: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 55–65.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.054>
- Sánchez-Pascuala, A., de Lorenzo, V., & Nikel, P. I. 2017. Refactoring the Embden-Meyerhof-Parnas pathway as a whole of portable GlucoBricks for implantation of glycolytic modules in gram-negative bacteria. *ACS Synthetic Biology*, 6(5), 793–805.  
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00230>.
- Saxena, G., Purchase, D., Mulla, S. I., & Bharagava, R. N. 2020. Degradation and detoxification of leather tannery effluent by a newly developed bacterial consortium GS-

- TE1310 for environmental safety. *Journal of Water Process Engineering*, 38(101592), 101592. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101592>
- Semjonovs, P., y Zikmanis, P. 2008. Evaluación de una nueva cepa de *Pediococcus pentosaceus* positiva a la lactosa y productora de exopolisacáridos para alimentos fermentados. *European Food Research and Technology*, 227 (3), 851–856. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0796-4>
- Serrano, V., Gaime, I., & Pérez, M. L. 2019. Evaluación de las características probióticas de bacterias ácido lácticas aisladas de ensilados de pulpa de café. *Investig. Desarro. Cienc. Tecnol. Aliment*, 4, 133–141. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/2/18.pdf>.
- Shivaji, S., Reddy, G. S. N., & Chattopadhyay, M. K. 2017. Bacterial biodiversity, cold adaption and biotechnological importance of bacteria occurring in Antarctica. *Proceedings of the Indian National Science Academy. Part A. Physical Sciences*, 83(2), 327-352. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2017/48956>.
- Sirichokchatchawan, W., Pupa, P., Praechansri, P., Am-In, N., Tanasupawat, S., Sonthayanon, P., & Prapasarakul, N. 2018. Autochthonous lactic acid bacteria isolated from pig faeces in Thailand show probiotic properties and antibacterial activity against enteric pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 119, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.031>
- Sobrero, M.C., Ronco, A. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. En: *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México.* (P. Ramírez Romero y A. Mendoza Cantó, Comp.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México pp. 55-68
- Son, S.-H., Yang, S.-J., Jeon, H.-L., Yu, H.-S., Lee, N.-K., Park, Y.-S., & Paik, H.-D. 2018. Antioxidant and immunostimulatory effect of potential probiotic *Lactobacillus paraplantarum* SC61 isolated from Korean traditional fermented food, jangajji. *Microbial Pathogenesis*, 125, 486–492. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.018>

- Sreedevi, P. R., Suresh, K., & Jiang, G. 2022. Bacterial bioremediation of heavy metals in wastewater: A review of processes and applications. *Journal of Water Process Engineering*, 48(102884), 102884. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102884>
- Stratigakis, N. C., Nazos, T. T., Chatzopoulou, M., Mparka, N., Spantidaki, M., Lagouvardou-Spantidaki, A., & Ghanotakis, D. F. 2024. Cultivation of a naturally resilient *Chlorella* sp.: A bioenergetic strategy for valorization of cheese whey for high nutritional biomass production. *Algal Research*, 82(103616), 103616. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103616>
- Talwar, C., Nagar, S., Lal, R., & Negi, R. K. 2018. Fish gut microbiome: Current approaches and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 58(4), 397–414. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0760-y>
- Tamang, S., Sharma, P., Kumar, S., & Thakur, N. 2024. Bacterial community structure, adaptations and prevalence of antimicrobial resistance in bacteria from Antarctica: A review. *Polar Science*, 40(101034), 101034. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2023.101034>
- Tilwani, Y. M., Lakra, A. K., Domdi, L., Jha, N., & Arul, V. 2022. Characterization of potential probiotic bacteria *Enterococcus faecium* MC-5 isolated from the gut content of *Cyprinus carpio specularis*. *Microbial Pathogenesis*, 172(105783), 105783. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105783>
- Tortajada, C. 2021. Water reuse to address water security. *International Journal of Water Resources Development*, 37(4), 581–583. <https://doi.org/10.1080/07900627.2021.1928911>
- Trabue, S., Scoggin, K., Tyndall, J., Sauer, T., Hernandez-Ramirez, G., Pfeiffer, R., & Hatfield, J. 2019. Odorous compounds sources and transport from a swine deep-pit finishing operation: A case study. *Journal of Environmental Management*, 233, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.110>
- U.S. Department of Agriculture. [USDA]. 2024. Production - Pork. Foreign Agricultural Service. <https://fas.usda.gov/data/production/commodity/0113000>

- Valta, K., Damala, P., Angeli, E., Antonopoulou, G., Malamis, D., Haralambous, K. J. 2017. Current treatment technologies of cheese whey and wastewater by Greek cheese manufacturing units and potential valorisation opportunities. *Waste and Biomass Valorization*, (8), 1649-1663. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9862-8>.
- Varnero, M., Orellana, R., Rojas, C., Santibañez, C. 2006. Evaluación de especies sensibles a metabolitos fitotóxicos mediante bioensayos de germinación. *El Medioambiente en Iberoamérica: Visión desde la Física y la Química en los albores del Siglo XXI*. Editor Juan F. Gallardo Lancho. Sociedad Iberoamericana de Física y Química Ambiental. Badajoz, España. Tomo III, 363-369.
- Vasmara, C., Marchetti, R., Carminati, D. 2021. Wastewater from the production of lactic acid bacteria as feedstock in anaerobic digestion. *Energy*, 229, 120740. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.120740>.
- Verma, S. K., Iram, D., Sansi, M. S., Pandey, K. K., Vij, S., & Sood, S. K. 2023. Sustainable utilization of dairy waste paneer whey by *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 for lactic acid production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47(102588), 102588. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102588>
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. 2019. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>
- Wang, L., Addy, M., Liu, J., Nekich, C., Zhang, R., Peng, P., Cheng, Y., Cobb, K., Liu, Y., Wang, H., & Ruan, R. 2019. Integrated process for anaerobically digested swine manure treatment. *Bioresource Technology*, 273, 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.050>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. 2021b. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

- Wang, Y., Sun, P., Guo, H., Zheng, K., Zhu, T., & Liu, Y. 2022. Performance and mechanism of sodium percarbonate (SPC) enhancing short-chain fatty acids production from anaerobic waste activated sludge fermentation. *Journal of Environmental Management*, 313(115025), 115025. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115025>
- Yi, Y., Li, P., Zhao, F., Zhang, T., Shan, Y., Wang, X., Liu, B., Chen, Y., Zhao, X., & Lü, X. 2022. Current status and potentiality of class II bacteriocins from lactic acid bacteria: structure, mode of action and applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 120, 387–401. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.018>
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z., & Li, S. 2013. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.12.037>
- Zhang, K., Liu, S., Liang, S., Xiang, F., Wang, X., Lian, H., Li, B., & Liu, F. 2024. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, biological activity, structure-activity relationship, and application in the food industry: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 257, 128733. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128733>.
- Zhao, J., Jing, Y., Zhang, J., Sun, Y., Wang, Y., Wang, H., & Bi, X. 2019. Aged refuse enhances anaerobic fermentation of food waste to produce short-chain fatty acids. *Bioresource Technology*, 289(121547), 121547. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121547>
- Zhao, X., Tang, F., Cai, W., Peng, B., Zhang, P., & Shan, C. 2023. Effect of fermentation by lactic acid bacteria on the phenolic composition, antioxidant activity, and flavor substances of jujube–wolfberry composite juice. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 184, 114884. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114884>
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertolli, M. 1981. Evaluating toxicity in immature compost. *En: Biocycle* 22: 54–57.

## CAPÍTULO V: Discusión general

La investigación sobre aislados de bacterias ácido lácticas provenientes de la Antártica ha revelado un potencial en el tratamiento de purines de cerdo, destacando su capacidad para degradar materia orgánica compleja y su funcionalidad en la generación de metabolitos bioactivos que pueden mejorar la calidad del agua que se someta a este tratamiento. A lo largo de los ensayos experimentales, se observaron diferencias en el rendimiento de las cepas estudiadas, en particular *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium*. En el ensayo de crecimiento en medio purín, las cepas 14 (*P. pentosaceus*), 43 (*E. faecium*), 58 (*P. pentosaceus*), 157 (*P. pentosaceus*) y 171 (*P. pentosaceus*) mostraron capacidad acidificante y producción de biomasa, destacándose la cepa 43 por su menor pH y mayor absorbancia, lo que indica un entorno relativamente favorable para su crecimiento, sugiriendo una mayor efectividad en aplicaciones biotecnológicas. En cuanto a la actividad antimicrobiana, las cepas variaron en su eficacia contra patógenos, siendo la cepa 171 la que sobresalió en la inhibición de *S. enterica*, mientras que la cepa 58 mostró una menor actividad, lo que sugiere que la adaptación a los ambientes de aislamiento influyó en su capacidad para producir metabolitos antimicrobianos. Además, todas las cepas presentaron niveles de hidrofobicidad superiores al 84%, indicando su potencial para adherirse a superficies no polares, lo cual es ventajoso en entornos donde la competencia microbiana es intensa. En el análisis de la demanda química de oxígeno (DQO), la cepa 14 mostró la mayor DQO, lo que sugiere una alta capacidad para degradar materia orgánica compleja, permitiendo biodisponibilizar los nutrientes del medio. La producción de exopolisacáridos también varió entre las cepas, siendo la cepa 43 la más productiva, lo que demuestra su capacidad para sintetizar compuestos que inciden en su viabilidad en ambientes extremos y que pueden influir en la formación de biofilms, relevantes para el tratamiento de efluentes. En el análisis fisicoquímico del agua tratada, se observaron variaciones en la concentración de minerales, indicando capacidades diferenciadas para asimilar nutrientes, lo que es crucial para su efectividad como biofertilizantes. En el análisis microbiológico, la cepa 43 destacó por su capacidad de inhibir *E. coli*, sugiriendo un potencial significativo en el

control de patógenos en sistemas de biorremediación. Finalmente, el ensayo de fitotoxicidad reveló que la cepa 43 presentó el índice de germinación más alto, lo que sugiere que puede tener un efecto positivo en el crecimiento de plantas.

El uso de purín como matriz modelo en la aplicación de BAL presenta varios sesgos y limitaciones. Una de ellas es la variabilidad en la composición del purín, la cual puede influir en los resultados. El purín de cerdo es un residuo heterogéneo que contiene distintos niveles de materia orgánica, nutrientes y microorganismos, lo que puede generar resultados inconsistentes en los ensayos de fermentación y biorremediación (López-Sánchez *et al.*, 2022). Además, puede tener diferentes concentraciones de contaminantes y compuestos tóxicos, lo que puede afectar la actividad metabólica de las cepas de BAL y limitar su eficacia en el tratamiento (Tortajada, 2021). Esta complejidad podría indicar que los resultados a escala laboratorio pueden no ser representativos de lo que se encontraría en condiciones de campo.

Otro aspecto relevante es la falta de regulación en el uso de bacterias no registradas en entornos productivos. La aplicación de BAL aisladas de ambientes antárticos plantea desafíos regulatorios significativos, especialmente en lo que respecta a la seguridad alimentaria y la salud pública. Las cepas de bacterias que no están registradas deben someterse a los procesos de evaluación de riesgos que garantizan su seguridad en aplicaciones agrícolas (Jiang *et al.*, 2019). Esto genera incertidumbre en entornos donde podría haber un impacto en el medio ambiente. Por otra parte, su introducción en nuevos entornos podría llevar a interacciones imprevistas con las comunidades microbianas locales, alterando los ecosistemas.

La introducción de microorganismos no nativos en un hábitat puede provocar desequilibrios ecológicos, lo que es una preocupación legítima en el contexto de la biotecnología aplicada (Krishnan *et al.*, 2016). En cuanto a antecedentes en el mundo, el uso de BAL provenientes de ambientes extremos, como la Antártica, ha sido objeto de interés en diversas investigaciones. Sin embargo, estos estudios son todavía limitados. En el contexto chileno, la investigación sobre el uso de BAL antárticas es algo reciente, aunque se ha comenzado a explorar su potencial en el tratamiento de residuos

agropecuarios y en la producción de biofertilizantes (Hualpa-Cutipa *et al.*, 2022). A nivel global, se han realizado estudios que destacan las propiedades únicas de estas bacterias en la biorremediación y la producción de metabolitos bioactivos, pero el uso práctico en aún está en fase exploratoria (Daba *et al.*, 2021). Así, aunque las BAL antárticas presentan un gran potencial para la biotecnología, su aplicación a escala debe ser abordada de manera precavida. La investigación futura deberá enfocarse en la evaluación de estas cepas, garantizando su seguridad y eficacia antes de considerar su implementación en entornos productivos.

La hipótesis planteada, la cual indica que la aplicación de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de ambientes antárticos en el tratamiento de aguas residuales porcinas incrementa la biodisponibilidad de nutrientes, ha sido evaluada críticamente a lo largo del Capítulo IV. A partir de los resultados obtenidos, se puede afirmar que la hipótesis no puede ser rechazada. Se encontró un respaldo significativo en los datos recopilados que valida esta afirmación. Los experimentos realizados indican que cepas de BAL, especialmente *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus faecium*, mostraron una notable capacidad para aumentar la biodisponibilidad de nutrientes. En particular, la cepa 14 mostró la mayor DQO, lo cual sugiere una alta capacidad para degradar compuestos orgánicos complejos presentes en el purín. Esto se asocia directamente con la recuperación de nutrientes, como nitratos y fosfatos, que son esenciales para el crecimiento vegetal. Los análisis fisicoquímicos también evidenciaron cambios en la concentración de estos nutrientes, corroborando la hipótesis de que las BAL optimizan la biodisponibilidad de nutrientes en el medio tratado. Los resultados en la producción de EPS son un aspecto significativo que refuerza la hipótesis. La cepa 43 produjo la mayor concentración de EPS, lo que contribuye a la formación de biopelículas, indicando además estabilidad del sistema microbiano. La formación de biopelículas es crucial en contextos de tratamiento de aguas residuales, ya que permite una mayor resiliencia del consorcio microbiano frente a variaciones ambientales. Estos resultados concuerdan con otros estudios que indican que la producción de EPS puede influir positivamente a la

formación de estructuras microbianas complejas, mejorando la eficiencia en la degradación de compuestos (Ibrahim *et al.*, 2022; Kaur y Dey, 2023). Siguiendo con el contraste con la literatura, esta investigación entrega resultados que pueden ser alineados con hallazgos sobre el potencial de las BAL para uso en agricultura y gestión de residuos. Se ha reportado que el uso de estos microorganismos en sistemas de tratamiento de aguas residuales aumenta la biodisponibilidad de nutrientes, ofreciendo beneficios adicionales en reducción del impacto ambiental (Dahiya *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019).

El ensayo de actividad antimicrobiana sugiere que estas cepas pueden contribuir a la reducción de la carga patógena en los efluentes, indicando su capacidad para mejorar la calidad del agua tratada, constituyéndose como potencial biofertilizante. La producción de metabolitos podría ayudar a controlar patógenos en entornos agrícolas, lo que es crucial para asegurar la salud de los cultivos y la seguridad alimentaria. Por otro lado, los resultados del ensayo de fitotoxicidad mostraron que las BAL antárticas, especialmente *E. faecium*, disminuyeron la toxicidad del purín y favorecieron la germinación de *Raphanus sativus*.

De esta forma, los resultados de esta investigación brindan un respaldo a la hipótesis planteada, ya que demuestran que las cepas de BAL aisladas de ambientes antárticos incrementan la biodisponibilidad de nutrientes en el tratamiento de aguas residuales favoreciendo la producción de exopolisacáridos, contribuyendo a la formación de biopelículas y mejorando la estabilidad del sistema microbiano.

La aplicabilidad de las BAL *Enterococcus faecium* y *Pediococcus pentosaceus* se presenta como una oportunidad para optimizar procesos de fermentación y biofertilización en agricultura sostenible. Estas bacterias ofrecen capacidades para transformar residuos orgánicos en productos de valor agregado y mejoran la biodisponibilidad de nutrientes para el crecimiento y desarrollo de cultivos. El uso de estas cepas en procesos de fermentación puede resultar en un balance de nutrientes significativamente mejorado, que permitiría medir el consumo de compuestos orgánicos y la liberación de nutrientes biodisponibles, como nitratos y fosfatos. Al establecer estos

balances, se podrá determinar el rendimiento de transformación, que es un indicador crítico de la eficiencia del proceso de fermentación. La producción de EPS contribuye a la formación de biopelículas, influyendo en la retención de nutrientes en el suelo. Lo anterior debe ser analizado mediante tasas cinéticas, evaluando cómo la producción de estos afecta la estabilidad del sistema microbiano. Al implementar estos análisis, se podría establecer un modelo predictivo con las condiciones de fermentación, maximizando producción de nutrientes y compuestos bioactivos. Para avanzar en la implementación de esta tecnología, es fundamental establecer un marco de Technology Readiness Level (TRL). Este marco permite evaluar la madurez de la tecnología propuesta y guiar su desarrollo hacia aplicaciones prácticas. En este sentido, se podría considerar que las cepas de BAL se encuentran en un TRL de 4 a 5, donde se han demostrado sus capacidades en entornos de laboratorio, pero se requiere escalar su efectividad con ensayos de campo. Futuras etapas del desarrollo tecnológico podrían considerar, por ejemplo, la validación a gran escala con distintos tipos de suelos y cultivos; desarrollo de consorcios bacterianos para potenciar la sinergia entre las cepas, evaluación de impacto ambiental, para visualizar la escalabilidad de estas tecnologías y su contribución con la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero; desarrollo de protocolos con directrices para la aplicación de biofertilizantes producidos a partir de estas cepas y un escalamiento considerando viabilidad económica y logística de producción, siendo accesible para los agricultores.

Dentro de las limitaciones identificadas en esta investigación está el tiempo dedicado a la purificación y diferenciación morfológica de las cepas. Además, los resultados obtenidos en el Capítulo III, donde se examinó la capacidad biotecnológica de *Weissella confusa*, resultaron contradictorios respecto a los datos del Capítulo IV, donde las cepas aisladas de heces de mamíferos, aves antárticas e intestinos de peces mostraron un mejor desempeño en el medio de cultivo. Aunque la versatilidad metabólica de *W. confusa* es prometedora, su rendimiento no alcanzó el mismo nivel que las cepas de *P. pentosaceus* y *E. faecium*. Sin embargo, un análisis más exhaustivo de los metabolitos presentes en los sobrenadantes y cultivos en caldo habría permitido una comprensión

más profunda de sus potenciales aplicaciones industriales. Los resultados de la investigación sugieren que *P. pentosaceus* y *E. faecium* son altamente robustas en un medio complejo, lo que indica que se podrían optimizar las condiciones para fomentar la generación de biomasa y compuestos bioactivos. Ajustar nuevamente las concentraciones de suero de queso, por ejemplo, podría mejorar aún más su rendimiento en la producción de metabolitos. La capacidad de estas bacterias para metabolizar fuentes de carbono heterogéneas y su resistencia a condiciones desfavorables las convierten en candidatas ideales para aplicaciones agrícolas y de tratamiento de aguas residuales. Asimismo, aunque se encontró que la hidrofobicidad superior al 84% es prometedora para aplicaciones probióticas, no se evaluó cómo se comportan estas cepas en condiciones industriales reales o en sistemas naturales, lo cual debe considerarse para estudios posteriores. El ensayo de fitotoxicidad también arrojó resultados alentadores, evidenciando que las BAL antárticas, especialmente *E. faecium*, pueden reducir la toxicidad del purín y favorecer la germinación de *Raphanus sativus*; sin embargo, la falta de identificación de los metabolitos responsables de estos efectos limita la certeza sobre su potencial aplicación a gran escala. Este punto es crítico, ya que la viabilidad de esta tecnología dependerá de su eficacia comprobada en situaciones del mundo real. La síntesis de metabolitos funcionales junto con la producción de compuestos secundarios indeseados son factores a tener en cuenta, lo que añade incertidumbre a los resultados. El potencial de estas cepas para la valorización de residuos agroindustriales es considerable, especialmente en el tratamiento y reutilización de aguas residuales porcinas. Este enfoque puede facilitar su transformación en biofertilizantes, contribuyendo a la sostenibilidad agrícola. Aunque los resultados de este trabajo permiten no rechazar la hipótesis sobre el potencial de las BAL antárticas, especialmente *P. pentosaceus* y *E. faecium*, crean la necesidad de futuras investigaciones que profundicen en la caracterización de las propiedades y aplicabilidad en contexto industrial. Este estudio puede ser considerado una línea base en el desarrollo de tecnologías sostenibles en el tratamiento de aguas residuales y la producción de biofertilizantes, abriendo nuevas oportunidades en el campo de la biotecnología.

## 5.1 Referencias

- Daba, G.M., Elnahas, M.O., Elkhateeb, W.A. 2021. Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 173:79-89. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.01.110.
- Hualpa-Cutipa, E., Acosta, R. A. S., Cariga, O. J. M., Espinoza-Medina, M. A., Hansen-Reyes, M., Medina-Cerna, D., Cortez-Lázaro, A. A. 2022. Omics insights into cold environments: Cold-tolerant microorganisms and their potential use in bioremediation. In: V. Kumar, & I.S. Thakur (Eds.), *Omics Insights in Environmental Bioremediation* (pp. 437-453). Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-4320-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-19-4320-1_19)
- Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor, P. G., Hu, Z., McCabe, M., Cormican, P., Zhan, X., & Gardiner, G. E. 2019. Exploring the roles of and interactions among microbes in dry co-digestion of food waste and pig manure using high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1344-0>
- Krishnan, A., Convey, P., Gonzalez-Rocha, G., & Alias, S. A. 2016. Production of extracellular hydrolase enzymes by fungi from King George Island. *Polar Biology*, 39(1), 65–76. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1606-7>.
- López-Sánchez, A., Silva-Gálvez, A. L., Aguilar-Juárez, Ó., Senés-Guerrero, C., Orozco-Nunnally, D. A., Carrillo-Nieves, D., & Gradilla-Hernández, M. S. 2022. Microalgae-based livestock wastewater treatment (MbWT) as a circular bioeconomy approach: Enhancement of biomass productivity, pollutant removal and high-value compound production. *Journal of Environmental Management*, 308, 114612. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114612>

Tortajada, C. 2021. Water reuse to address water security. *International Journal of Water Resources Development*, 37(4), 581–583.  
<https://doi.org/10.1080/07900627.2021.1928911>