



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE
CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES
INDUSTRIALES POR MICROORGANISMOS DE LA ISLA DECEPTION,
ANTÁRTICA**

VIVIANA LÓPEZ COLORADO

Foz de Iguazú
2023

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES
INDUSTRIALES POR MICROORGANISMOS DE LA ISLA DECEPTION, ANTÁRTICA**

VIVIANA LÓPEZ COLORADO

Conclusión del Curso Trabajo presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, como requisito parcial para obtener el título de Licenciatura en Biotecnología.

Asesor: Prof. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Foz de Iguazú
2023

VIVIANA LÓPEZ COLORADO

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES
INDUSTRIALES POR MICROORGANISMOS DE LA ISLA DECEPTION, ANTÁRTICA**

Trabajo de Finalización de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de Licenciatura en Biotecnología.

JURADO EXAMINADOR


Tutor: Doctor. Michel Rodrigo Zambrano Passarini
UNILA

J@rdenas L.
Profe. MSc. Jorge Alonso Cárdenas Leon
U.D.F.J.C


Profe. MSc. Heana Romea Cárdenas Manosalva
U.D.F.J.C

Foz do Iguaçu, 06 de noviembre de 2023

PLAZO DE PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ACADÉMICOS

Nombre completo del autor: VIVIANA LÓPEZ COLORADO

Curso: BIOTECNOLOGÍA

	tipo de documento
(X) graduación	(.....) artículo
(.....) Especialización	(X) proyecto final de curso
(.....) maestría	(.....) monografía
(.....) doctorado	(.....) disertación
	(.....) tesis
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuales
	(.....)

Título del trabajo académico: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES INDUSTRIALES POR MICROORGANISMOS DE LA ISLA DECEPTION, ANTÁRTICA

Nombre del asesor: Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Fecha de defensa: 06/11/2023

Licencia de distribución no exclusiva

El autor antes mencionado:

a) Usted declara que el documento entregado es su obra original, y que tiene derecho a otorgar los derechos contenidos en esta licencia. También declara que la entrega del documento no infringe, a su leal saber y entender, los derechos de ninguna otra persona o entidad.

b) Si el documento entregado contiene material del cual usted no posee los derechos de autor, declara que ha obtenido la autorización del titular de los derechos de autor para otorgar a UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana los derechos requeridos por esta licencia, y que este material cuyos derechos pertenecen a terceros esté claramente identificado y reconocido en el texto o contenido del documento entregado.

Si el documento entregado se basa en un trabajo financiado o apoyado por una institución distinta a la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, declara haber cumplido con las obligaciones requeridas en el respectivo contrato o convenio.

Como titular de los derechos sobre el contenido antes mencionado, el autor autoriza a la Biblioteca Latino-Americana – BUNILA a poner la obra a disposición, de forma gratuita y de acuerdo con la licencia pública. *Bienes comunes creativos* **Licencia 3.0 no portada.**

Foz do Iguaçu, 06 de noviembre de 2023.

Firma del responsable

Dedico este trabajo a la Vida. Especialmente a los microorganismos antárticos, pues en los últimos meses me han enseñado sobre resiliencia, lucha y a ver la belleza en lo pequeño. Que su potencial y sus secretos inspiren siempre nuestro camino.

DEDICATORIA

A UNILA, por brindarme experiencias genuinamente latinoamericanas y permitirme estudiar una carrera de ensueños.

Profe Michel, por sus palabras precisas y certeras, por su energía tranquila y la libertad que me brindó para la realización de este trabajo, por su paciencia, respeto y educación. No se preocupe si no llegamos a la ceremonia, porque lo importante no es el destino, sino disfrutar del camino. Gracias por devolverme la esperanza, llevaré conmigo sus lecciones y los mejores recuerdos del G011.

Profe Jorge Cardenas & Profe Ileana, por su tiempo, comprensión y asesorías. Por su apoyo, empatía y calidez. Y sobre todo, por su disposición, inclusive para trabajar en días festivos. Espero algún día volvernos a encontrar.

Sooro Renner, mismo sin vernos personalmente depositaron su confianza y brindaron gran apoyo para la colecta y envío de muestras. Admiro muchísimo su empresa, compromiso ambiental y visión de una economía circular.

277 CRAFT BEER, por su buen recibimiento y tour durante la elaboración de su Pilsen. Por permitir a esta desconocida entrar a su fábrica, escabullirse en el proceso y salir con una maleta de viaje llena de muestras. Les deseo un futuro prometedor, por favor continúen produciendo esas cervezas increíbles y deliciosas. Salud.

PROANTAR y MYCOANTAR por su maravillosa labor y pesquisas, ustedes son los pioneros en la búsqueda del conocimiento sobre el continente antártico y los límites de la vida con adaptaciones extremas, son ustedes quienes que incentivan la producción científica brasileña en esta área.

Los técnicos del laboratorio, en la medida de lo posible siempre se mostraron amables y colaboradores, además de soportar el ruido incesante de mis filtraciones al vacío, aprendí cositas valiosas con ustedes.

Guardas de seguridad y demás trabajadores de la UNILA, por su compañerismo en las largas jornadas de trabajo en el laboratorio, e inclusive por cuidar de mí en las noches. Obrigada!

A Rochi y Naty, por su amistad incondicional y complicidad. Por estar en las buenas y en las malas. Por no renunciar a esta amiga ausente.

A mi familia, por su coraje y determinación ante la dificultad. Para que sea esta una señal del fin de nuestro idilio y podamos al fin cambiar el capítulo. Para que la próxima década sea mejor que las anteriores y podamos disfrutar de la belleza de la vida.

A mi 'tal para cual', por estos últimos años de felicidad. Aún con miles de kilómetros de distancia, nunca sentí a alguien tan próximo. Sí, nuestra historia es un *la la land*, pero Querido, con esto cumplimos nuestra promesa, ahora cada cuál puede seguir con su destino.

Teodoro y Ágatha, por ser la familia que siempre deseé. Son ustedes mi motor y fortaleza. Son el amor y la inocencia reencarnados en peluditos de cuatro patas.

Al Chef Confitero Diego y a MABU, por aceptarme en su equipo. Ustedes me ayudaron, ahora es mi turno de retribuirlos.

A las bandas de hard rock y metal sinfónico que me brindaron la energía que necesitaba en las noches de desvelo, hasta el 'fin' de este trabajo.

Çagan Irmak por sus maravillosas e inspiradoras producciones, las cuales me recuerdan quién soy y las decisiones que tomé. Adoro como ilustra la realidad humana, la pasión por la ciencia, las ganas de conocer el mundo, la riqueza de las diferencias, el respeto por la vida y la necesidad indiscutible de la compasión.

A todos ustedes, perdón si causé algún contratiempo. Y más mil veces, muchas gracias de todo corazón. Mis mejores deseos.

*La naturaleza es el único libro que ofrece contenido
valioso en todas sus páginas.*
Johann Wolfgang von Goethe

RESUMEN

La contaminación por efluentes industriales se ha convertido en un problema global importante que requiere atención inmediata ya que compromete el bienestar de los ecosistemas y la salud humana. La industria alimentaria es una de las principales contribuyentes a la contaminación mundial, ya que produce desechos con un alto contenido orgánico en el medio ambiente. El suero, un subproducto de la producción de queso, a menudo se desecha y se le conoce como la sustancia más contaminante debido a sus altos valores de DBO. La industria cervecera también genera residuos, parte de ellos procedente de la fase de cocción del mosto, colectados y usados para la realización de este estudio. Para la degradación de dichos compuestos puede hacerse uso de microorganismos, ya sean nativos de los propios efluentes y/o con otro tipo de origen como los ambientes extremos y con características únicas. En la Isla Deception (Antártica), existen diversidad de microorganismos como los psicrófilos (o criófilos) que se modifican para nutrir, replicar y retener sus actividades metabólicas y prosperan incluso durante los inviernos antárticos. La alta actividad enzimática a bajas temperaturas implica una característica importante para el ahorro energético. Así mismo, poseen potenciales enzimas activas en frío con diversos usos en los sectores comercial y de investigación en biotecnología. Por ello, el objetivo de este trabajo es evaluar el potencial biotecnológico de microorganismos presentes en muestras recolectadas de sedimentos marinos en la Isla Deception en la Antártica para tolerar y/o degradar material orgánico de efluentes industriales. Se desarrolló la reactivación de microorganismos conservados y se realizaron pruebas enzimáticas. Se implementaron distintas etapas, desde la reactivación de los microorganismos antárticos hasta la evaluación de consorcios en efluentes industriales cerveceros y de suero de leche, ejecutándose diversos experimentos y técnicas para estudiar extremófilos. Fueron seleccionadas dos bacterias y un hongo para constituir un consorcio, este último se evaluará posteriormente para conocer su potencial de tolerancia y/o degradación de material orgánico presente en muestras industriales colectadas. Fueron caracterizadas colonias con alta actividad exoenzimática en las pruebas de 'caseína' e 'hidrólisis de almidón'. En el caso de las proteasas, su producción enzimática indica su utilización en la degradación de compuestos típicamente proteicos, como sangre y leche; por ello fueron evaluados consorcios en efluentes provenientes de la industria quesera y del reaprovechamiento del suero de leche, ambos suministrados por la empresa 'Sooro Renner'. Por otra parte, las amilasas descomponen (hidrolizan) el almidón contenido en diversas muestras, como en las colectadas de la industria '277 Craft Beer', pues la malta puede contener en torno de 60% de almidón. Fue corroborada la producción de amilasas y proteasas microbianas con potencial aplicación biotecnológica, principalmente en el área ambiental, pues se demuestra la sobrevivencia de microorganismos antárticos a diversos factores, además de la capacidad de degradación de compuestos proteicos y amilolíticos presentes en efluentes.

Palabras clave: *Antártica; Biorremediación; Efluentes Industriales; Microorganismos Antárticos.*

RESUMO

A poluição por efluentes industriais tornou-se um problema global importante que requer atenção imediata, pois compromete o bem-estar dos ecossistemas e da saúde humana. A indústria alimentar é uma das principais contribuintes para a poluição mundial, produzindo resíduos com alto teor orgânico no meio ambiente. O soro, um subproduto da produção de queijo, muitas vezes é descartado e é conhecido como a substância mais poluente devido aos seus altos valores de DBO. A indústria cervejeira também gera resíduos, parte deles proveniente da fase de cozimento do mosto, coletados e usados para a realização deste estudo. Para a degradação desses compostos, pode-se fazer uso de microrganismos, sejam eles nativos dos próprios efluentes e/ou de outro tipo de origem, como ambientes extremos e com características únicas. Na Ilha Deception (Antártica), há uma diversidade de microrganismos, como os psicrófilos (ou criófilos), que se modificam para nutrir, replicar e reter suas atividades metabólicas e prosperam mesmo durante os invernos antárticos. A alta atividade enzimática em baixas temperaturas implica uma característica importante para a economia de energia. Da mesma forma, eles possuem potenciais enzimas ativas em frio com diversos usos nos setores comercial e de pesquisa em biotecnologia. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial biotecnológico de microrganismos presentes em amostras coletadas de sedimentos marinhos na Ilha Deception na Antártica para tolerar e/ou degradar material orgânico de efluentes industriais. Foram implementadas várias etapas, desde a reativação de microrganismos antárticos e testes enzimáticos, até a avaliação de consórcios em efluentes industriais cervejeiros e de soro de leite, executando diversos experimentos e técnicas para estudar extremófilos. Foram selecionadas duas bactérias e um fungo para constituir um consórcio, este último será avaliado posteriormente para conhecer seu potencial de tolerância e/ou degradação de material orgânico presente em amostras industriais coletadas. Foram caracterizadas colônias com alta atividade exoenzimática nos testes de 'caseína' e 'hidrólise de amido'. No caso das proteases, sua produção enzimática indica sua utilização na degradação de compostos tipicamente proteicos, como sangue e leite; por isso, foram avaliados consórcios em efluentes provenientes da indústria de laticínios e do reaproveitamento do soro de leite, ambos fornecidos pela empresa 'Sooro Renner'. Por outro lado, as amilases hidrolisam o amido contido em várias amostras, como as coletadas na indústria '277 Craft Beer', pois o malte pode conter cerca de 60% de amido. Foi corroborada a produção de amilases e proteases microbianas com potencial aplicação biotecnológica, principalmente na área ambiental, pois se demonstra a sobrevivência de microrganismos antárticos a diversos fatores, além da capacidade de degradação de compostos proteicos e amilolíticos presentes em efluentes.

Palavras-chave: *Antártica; Biorremediação; Efluentes Industriais; Microrganismos Antárticos.*

ABSTRACT

Pollution by industrial effluents has become an important global problem that requires immediate attention because it compromises the well-being of ecosystems and human health. The food industry is one of the main contributors to global pollution, producing waste with high organic content in the environment. Whey, a byproduct of cheese production, is often discarded and is known as the most polluting substance due to its high BOD values. The brewing industry also generates waste, some of which comes from the wort boiling phase, collected and used for this study. Degradation of these compounds is possible using microorganisms, both native to the effluents themselves or with another type of origin from external environments such as the one found on Deception Island (Antarctic), where we found a diversity of microorganisms such as psychrophiles or cryophiles that are modified to nourish, replicate and retain their metabolic activities and thrive even during harsh Antarctic winters. The high enzymatic activity at low temperatures enables energy savings and, as they are cold active, have various uses in commercial and biotechnology sectors. Therefore, the objective of this work is to evaluate the biotechnological potential of microorganisms present in samples collected from marine sediments on Deception Island in Antarctica to tolerate and/or degrade organic material from industrial effluents. Several stages were implemented, from the reactivation of Antarctic microorganisms and enzymatic tests to the evaluation of consortia in brewery and whey industrial effluents, performing various experiments and techniques to study extremophiles. Two bacteria and one fungus were selected to constitute a consortium, the latter will be evaluated later to know its potential for tolerance and/or degradation of organic material present in collected industrial samples. Colonies with high exoenzymatic activity were characterized in the 'casein' and 'starch hydrolysis' tests. In the case of proteases, their enzymatic production indicates their use in the degradation of typically proteinaceous compounds, such as blood and milk; therefore, consortia were evaluated in effluents from the dairy industry and the reuse of whey, both supplied by the company 'Sooro Renner'. On the other hand, amylases hydrolyze the starch contained in various samples, such as those collected in the '277 Craft Beer' industry, as malt can contain around 60% starch. The production of microbial amylases and proteases with potential biotechnological application, mainly in the environmental area, was corroborated, as the survival of Antarctic microorganisms to various factors is demonstrated, in addition to the capacity for degradation of proteinaceous and amylolytic compounds present in effluents.

Keywords: *Antarctica; Bioremediation; Industrial Effluents; Antarctic Microorganisms.*

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1 - Mapa de la Antártica y ubicación del archipiélago Shetlands del Sur....	23
Figura 2 - Principales etapas metodológicas del proyecto.....	38
Figura 3 - Medición y ecuación para el cálculo del Índice Enzimático.....	40
Figura 4 - Descripción macroscópica según forma, elevación y bordes de las colonias.....	41
Figura 5 - Algunas de las morfologías microscópicas encontradas	67
Figura 6 - Morfología microscópica de FAR18	68
Figura 7 - Morfología macroscópica de FAR18	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Promedio de Índice Enzimático para Proteasa (Primera medición) ...	53
Gráfico 2 - Promedio de Índice Enzimático para Amilasa (Primera medición)	57
Gráfico 3 - Relación de temperatura en el Índice Enzimático (Proteasa)	58
Gráfico 4 - Relación de temperatura y biomasa (en Medio NA+skim milk 10%)	59
Gráfico 5 - Relación de temperatura en el Índice Enzimático (Amilasa)	60
Gráfico 6 - Relación de temperatura y biomasa (en medio 'NA+almidón 1%')	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 - Relación de pH y actividad enzimática para BAD6	61
Tabla 2. Control del pH y %decoloración para cada tratamiento en el ensayo de 4 días a 28°C	77

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 - Aplicaciones biotecnológicas.....	28
Cuadro 2 - Resultado de actividad enzimática	57
Cuadro 3 - Caracterización macro y microscópica de las bacterias (BAD)	62
Cuadro 4 - Caracterización de las colonias aisladas.....	66

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1 - Consorcio para el efluente de suero de las Industrias Queseras	46
Fotografía 2 - Consorcio para el efluente de la Industria SOORO	47
Fotografía 3 - Consorcio para el efluente del Segundo hervor de la cerveza Pilsen, 277 Craft Beer	47
Fotografía 4 - Activación inicial de aislados	50
Fotografía 5 - Inóculos que presentan más de una especie bacteriana por código.....	50
Fotografía 6 - Activación de las colonias registradas bajo el código 'BAD38'. Obteniendo las variantes 'BAD38a' y 'BAD38b'	51
Fotografía 7 - Resultado positivo para actividad enzimática de proteasa BAD41.....	52
Fotografía 8 - Resultados de la actividad enzimática para proteasa	53
Fotografía 9 - Actividad enzimática de amilasa. A la izquierda de la placa, resultado positivo. En la parte derecha de la placa, el resultado es negativo	54
Fotografía 10 - BAD's inoculadas a 15°C en Medio NA con adición de 10% de efluente de suero de leche de las industrias Queseras	55
Fotografía 11 - Actividad enzimática de amilasa. A la izquierda de la placa, resultado positivo. En la parte derecha de la placa, el resultado es negativo	56
Fotografía 12 - Lámina con la prueba catalasa positiva; observar la formación de	

efervescencia del inóculo microbiano emulsionado con Peróxido de Hidrógeno 3% 10vol.....	69
Fotografía 13 - Prueba Lugol en efluente cervecero filtrado y esterilizado.....	71
Fotografía 14 - Ensayo con Suero de leche proveniente de la Industria Quesera al tercer día.....	73
Fotografía 15 - Ensayo con Suero de leche proveniente de la Industria Quesera al quinto día	73
Fotografía 16 - Ensayo con Suero de leche proveniente de la Industria Quesera al séptimo día	73
Fotografía 17 - Ensayo con Suero de leche proveniente de la Industria Quesera pasados quince días	74
Fotografía 18 - Ensayo con Efluente de la Industria Sooro, tercer día. Control del Efluente (Izquierda) VS degradación por consorcio (derecha)	74
Fotografía 19 - Ensayo con Efluente de la Industria Sooro, quinto día	74
Fotografía 20 - Ensayo con Efluente de la Industria Sooro, séptimo día	75
Fotografía 21 - Ensayo con Efluente de la Industria Sooro, decimoquinto día	75
Fotografía 22 - Muestras filtradas del efluente '277 Craft Beer' después del ensayo de 4 días. Siguiendo el orden de izquierda a derecha, están: control; BCB (nativos); BCB.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ANT	Consorcio de microorganismos Antárticos
BAD	Bacteria Antártica aislada de la isla Deception
BCB	Bacteria del 277 Craft Beer
BES	Bacteria del Efluente SOORO
BOD	Demanda bioquímica de oxígeno
BSQ	Bacteria del Suero de Queserías
COD	Demanda de oxígeno químico
DC	Diámetro de la colonia
DH	Diámetro del Halo
FAR	Fungo Antártico Rei George
IE	Índice de enzimático
ILACVN	Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza
LabBioAmb	Laboratorio de Estudio e Investigación en Biotecnología Ambiental
NA	Agar nutritivo
NAT	Microorganismos nativos de las muestras de efluentes
OPERANTAR	Operação Antártica
PDA	Papa-dextrosa-agar
PROANTAR	Programa Antártico Brasileño
UNILA	Universidad Federal de Integración Latinoamericana

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	21
2.1 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DEL LACTOSUERO Y EL EFLUENTE CERVECERO.....	21
2.1.2 LA ANTÁRTICA Y LA ISLA DECEPTION.....	22
2.1.3 MICROBIOLOGÍA ANTÁRTICA Y SUS APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.....	25
2.1.4 POTENCIAL BIORREMIADOR DE MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS.....	30
2.1.5 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MICROBIANA.....	32
2.1.6 BIORREMIACIÓN DE EFLUENTES INDUSTRIALES.....	34
2.2 JUSTIFICACIÓN.....	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo general.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	37
4. METODOLOGÍA.....	38
4.1 Activación de microorganismos antárticos.....	38
4.2 Evaluación de la actividad enzimática de proteasa y amilasa para la selección de microorganismos constituyentes de un consorcio	39
4.3 Caracterización microbiológica de aislados con actividad enzimática	42
4.4 Efecto de la temperatura y pH en la producción enzimática.....	45
4.5 Elección y colecta de efluentes industriales.....	45
4.5.1 Suero de leche proveniente de la Industria Quesera y efluente de la industria Sooro Renner.....	45
4.5.2 Efluente de la industria cervecera ‘277 Craft Beer’.....	45
4.5.3 Colecta.....	45

4.6 Probar el potencial de consorcios elegidos para tolerar y degradar materia orgánica presente en efluentes industriales cerveceros y de suero de leche.....	46
4.7 Conservación de microorganismos aislados.....	48
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	49
5.1 Reactivación y cultivo de los microorganismos.....	49
5.2 Actividad enzimática de proteasa y amilasa para la selección de microorganismos constituyentes de un consorcio	51
5.3 Relación de temperatura y pH en la producción enzimática y biomasa	57
5.3.1 Relación de temperatura en la producción enzimática proteolítica.....	57
5.3.2 Relación de temperatura en la producción enzimática amilolítica.....	57
5.3.3 Relación del pH en la producción enzimática amilolítica.....	57
5.4 Caracterización microbiológica de aislados con actividad enzimática.....	54
5.5 Elección y colecta de efluentes industriales.....	60
5.5.1 Suero de leche proveniente de la Industria Quesera.....	61
5.6 Potencial de consorcios elegidos para tolerar y degradar materia orgánica presente en efluentes industriales cerveceros y de suero de leche	63
5.6.1 Consorcio para el Suero de leche proveniente de la Industria Quesera	
5.6.2 Consorcio para el efluente de la industria Sooro Renner.	
5.6.3 Consorcio del efluente de la industria cervecera ‘277 Craft Beer’.	
6. CONSIDERACIONES FINALES	64
7. REFERENCIAS.....	66
APÉNDICES.....	75
APÉNDICE A– PRUEBA CATALASA.....	75

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por efluentes industriales genera un problema global importante que requiere atención inmediata ya que compromete el bienestar de los ecosistemas y la salud humana. El impacto de estos contaminantes se siente en todas partes, incluso en los rincones más aislados de la Tierra y sus efectos se sienten tanto en las formas de vida acuáticas como terrestres. Todavía tenemos mucho por descubrir y poco tiempo para encontrar las respuestas. Este estudio puede ser parte de esa carrera contra el tiempo.

La limitada información sobre la biorremediación de efluentes industriales por microorganismos de ambientes extremos hace que esta investigación sea más intrigante y desafiante. Existen varias interrogantes alrededor de la Antártica, los microorganismos que allí viven, las duras condiciones climáticas a las que están adaptados y todos los demás factores que hacen de este lugar un entorno único y poco explorado.

La Antártica es un continente impresionante, donde la vida consigue adaptarse a condiciones extremas; un lugar que estimula la evolución de múltiples microorganismos con cualidades biotecnológicas excepcionales. Podar y Reysenbach (2006), también explican que los extremófilos (amantes del frío) son organismos que pueden sobrevivir en ambientes extremos y han atraído la atención de la comunidad científica debido a sus biomoléculas únicas, como enzimas, proteínas anticongelantes crioprotectoras, lípidos y diversas moléculas pequeñas. El grupo de pesquisa del Laboratorio de Estudio e Investigación en Biotecnología Ambiental (LabBio Amb) de la UNILA también desarrolló varios trabajos sobre estos aislados y sus biomoléculas, las cuales tienen aplicaciones en una gran variedad de campos, incluida la biorremediación. Con base en este enfoque, el propósito principal del presente estudio es evaluar la capacidad de los microorganismos aislados de sedimentos marinos en la Isla Deception para tolerar y/o degradar material orgánico de efluentes industriales.

Este estudio se originó a partir del interés personal sobre el medio ambiente, y a través de lo vivenciado durante la carrera de biotecnología. Dentro de

los temas de interés surgió la necesidad de investigar específicamente el comportamiento de estos microorganismos cuando son expuestos a diversos estímulos y condiciones de temperatura, pH, sustrato y compuestos orgánicos. El presente trabajo pretende contribuir con el avance de otras investigaciones como las realizadas por el Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), la cual, tiene como propósito la realización de la investigación científica de la región antártica a nivel científico, logístico y ambiental.

Como objetivo general de esta investigación, se propuso evaluar el potencial biotecnológico de aislados de muestras de sedimentos marinos, recolectados en la Isla Deception en la Antártica, para tolerar y/o degradar material orgánico de efluentes industriales de cerveza y lactosuero. Cabe resaltar que dichos efluentes corresponden y fueron colectados en industrias brasileñas para su posterior análisis y procesamiento en laboratorio, con el propósito de evaluar la degradación de proteínas y almidón en las muestras colectadas, con el uso de microorganismos antárticos (bacterias y un hongo filamentoso).

Así mismo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Reactivación y cultivo de microorganismos antárticos
- Evaluar la actividad enzimática de los microorganismos referentes a las enzimas proteasa y amilasa
- Determinar la influencia de la temperatura y el pH en la producción enzimática
- Caracterizar los microorganismos seleccionados mediante técnicas microbiológicas
- Probar el potencial de consorcios elegidos para tolerar y degradar materia orgánica presente en efluentes industriales cerveceros y de suero de leche.

Fue interés de este estudio responder a la pregunta: *‘Cuál es el potencial biotecnológico de los microorganismos recolectados en la Isla Deception de la Antártica para biorremediar efluentes industriales’* ya que, en concordancia con Lima *et al.*, (2020), en cualquier programa de biorremediación es crucial incluir el

aislamiento y selección de microorganismos, permitiendo estudios más completos sobre enzimas, rutas metabólicas y otros elementos que participan en un proceso de biodegradación. En las últimas décadas, los extremos en los que prospera la vida han seguido desafiando nuestra comprensión de la bioquímica, la biología y la evolución. A medida que se introducen más extremófilos nuevos en el cultivo de laboratorio, se van proporcionando una multitud de aplicaciones potenciales para la biotecnología (Podar y Reysenbach, 2006).

La investigación comienza con los referentes teóricos que fundamentaron la investigación. Entre los conceptos clave para alcanzar los objetivos se tomó como referencia el concepto de *Antártica*, apoyado en SIMÕES *et al.* (2011) debido a la descripción realizada por este autor sobre la misma; *Biorremediación*, Ocampo-Hernández (2021) porque permite entender el proceso biotecnológico con relación a la disminución de contaminantes en un ambiente y por contribuir a la comprensión del objetivo de esta investigación: probar el potencial de consorcios elegidos para tolerar y degradar materia orgánica presente en efluentes industriales cerveceros y de suero de leche; *Efluentes Industriales*, Cammarota (2011) al contemplar la variabilidad de acuerdo a sus características, y por último, los *Microorganismos antárticos*, Podar y Reysenbach (2006) por describir a los microorganismos extremófilos y su potencial biotecnológico.

Luego, en la metodología, y para alcanzar los objetivos propuestos, se llevó a cabo la evaluación de la degradación almidón y proteínas, para lo cual se realizaron las siguientes etapas: 1) *Activación de los microorganismos antárticos*; 2) *Evaluación de la actividad enzimática de proteasa y amilasa para la selección de microorganismos constituyentes de un consorcio*; 3) *Caracterización microbiológica de aislados con actividad enzimática*; 4) *Elección y Colecta de efluentes industriales* y 5) *Poner a prueba el consorcio para la degradación de carga orgánica en los efluentes*.

La evaluación tuvo una duración de 3 meses, en la cual se usó como instrumentos de investigación un *diario de acompañamiento* para el registro de todos los experimentos realizados con sus correspondientes resultados, resultante de una elaboración propia alineados con los objetivos.

Por último, en cuanto a los resultados y análisis de los resultados, se

tuvo como principal referente la teoría y procedimientos experimentales de Rojas (2011), junto con su obra *Conceptos y Práctica de Microbiología General*. Así, se considera importante la creación de más estudios relacionados con esta línea de investigación que contribuyan para mayor conservación de estos ambientes y su biodiversidad.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Problemática ambiental del lactosuero y el efluente cervecero

La industria alimenticia es considerada una de las más contaminantes a nivel mundial, esto debido a que produce residuales con altas cargas orgánicas, las cuales son de difícil degradación en el medio ambiente (RODRÍGUEZ *et al.*, 2009).

Según el Departamento de Investigación y Proyectos del gobierno ecuatoriano en su Informe de posición estratégica (2019), de cada 100 litros de leche usados en la producción de queso, 90 litros se convierten en suero, el cual retiene el 55% de los nutrientes de la leche. Desafortunadamente, una gran parte de este producto no se vende y, en cambio, se desecha como alimento para cerdos o se descarta en cuerpos de agua y sistemas de alcantarillado públicos. Este suero no utilizado crea un problema ambiental importante que está en conflicto con los esfuerzos mundiales para lograr objetivos como el Desarrollo Sostenible y la Economía Circular.

El lacto suero, un subproducto que se obtiene durante el proceso de fabricación del queso, es desechado y es la sustancia más contaminante que se ha reportado debido a sus altos valores de DBO. Las proteínas, grasa, lactosa y minerales contaminan las aguas e incrementan significativamente su demanda biológica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO) y provocan impermeabilización en los suelos (CERVANTES *et al.*, 2018).

Por otra parte, la industria cervecera también genera diversos residuos, dentro de los cuales se resalta una fracción restante de la fase de cocción del mosto. Salas *et al.* (2022) menciona que al terminar de cocinar el mosto, los restos de malta, lúpulo y proteínas, también llamado trub, son eliminados por técnicas de centrifugación, filtraje

o decantación.

Según el equipo de noticias de Fluence (2020), la carga orgánica de los efluentes de la industria alimentaria puede ser hasta 10 veces mayor que la de los efluentes municipales. Las medidas comunes de la carga orgánica son la demanda bioquímica de oxígeno (BOD) y la demanda de oxígeno químico (COD), siendo los efluentes de la industria alimentaria típicamente altos en ambos. Si los efluentes se descargan sin tratar, afectarían la fauna acuática y la salud pública. Para evitar esto, los productores de alimentos pueden tratar sus efluentes *in situ* y de esa forma tampoco sobrecargarían las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales.

2.1.1 La Antártica y la Isla Deception

La región Antártica cubre aproximadamente 45.6 millones de kilómetros cuadrados (o casi 9% de la superficie terrestre), y está constituida por el Océano Austral, que es formado por la conjunción de las masas de agua de las tres grandes bacías oceánicas y el continente propiamente dicho (SIMÕES *et al.*, 2011, p 15). Los científicos creen que en esta porción de tierras y mares, aún poco desvendada, están las respuestas para futuros dilemas de la humanidad. Según Vieira (2018), 70% del agua dulce del planeta está en la Antártica en forma de hielo, resultando en una gigante masa de glaciares que influye en el clima a escala global. En este contexto la Antártica está localizada en el hemisferio sur y completamente circundante por el Océano Austral, entre el Pacífico y el Atlántico. Es considerado el lugar más frío, más ventoso y más seco del planeta.

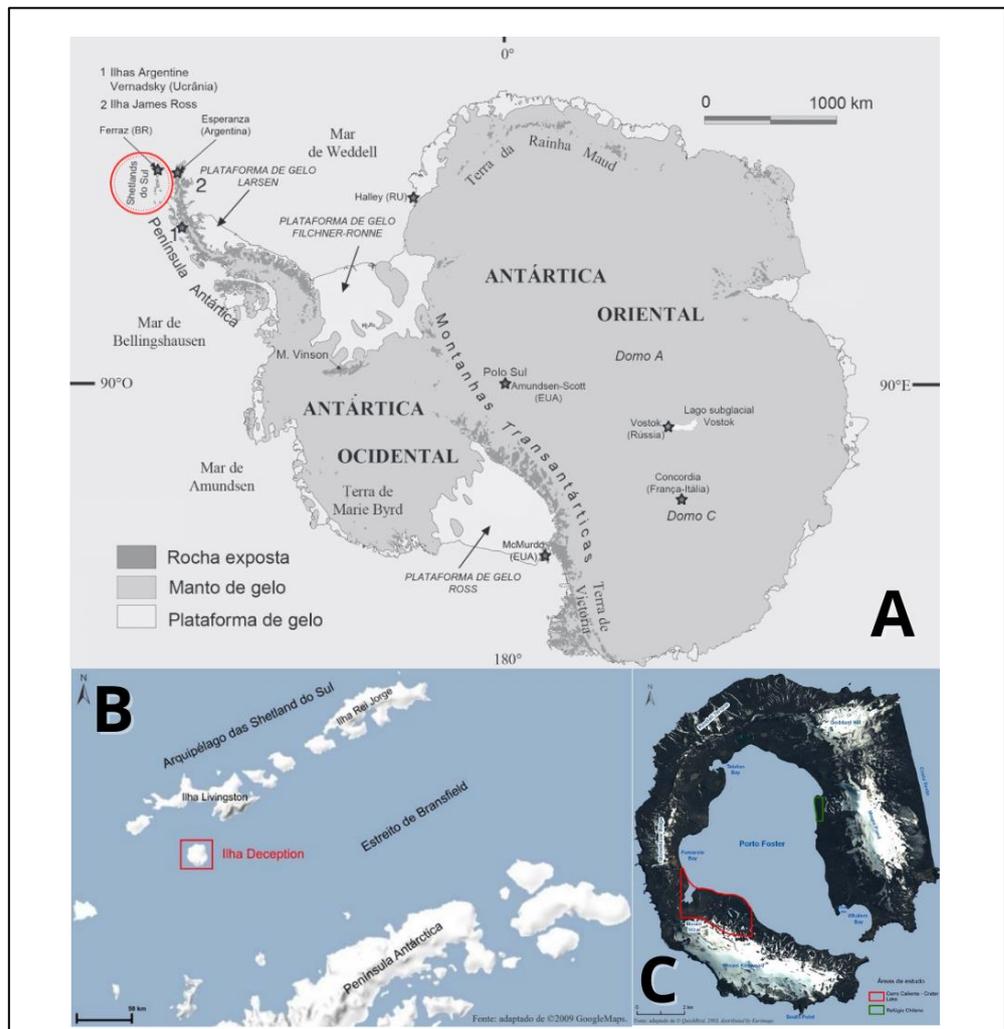
Aunque en la Antártica (o Antártida) predominen las gigantescas plataformas de hielo, el aire seco y las temperaturas más bajas jamás registradas, es difícil imaginar que alguna forma de vida sobreviva en estas condiciones, pero existen diversidad de microorganismos como los psicrófilos (o criófilos) que prosperan incluso durante los inviernos antárticos. Según estudios de Muñoz *et al.* (2017):

Las proteínas anticongelantes son el secreto de su supervivencia. Sintetizadas por bacterias, estas proteínas que se unen al hielo hacen que el hielo crezca entre las proteínas anticongelantes, lo que empuja el punto de congelación y evita que el hielo forme grandes cristales que pueden ser dañinos para las

células. (Muñoz et al., 2017, p. 15).

Uno de los lugares que ha permitido a los científicos participar en el estudio de la Antártica es la Isla Deception. Esta, es considerada una de las islas más increíbles del planeta, es un volcán activo en las islas Shetland del Sur, frente a la Península Antártica y su forma es similar a una herradura con una amplia caldera inundada (Puerto Foster), cuya pared presenta una apertura de 500 m de ancho (Fuelles de Neptuno). De acuerdo con Gómez (2015), se trata de un extraordinario paisaje, constituido por áridas laderas volcánicas, playas con fumarolas y glaciares cubiertos por cenizas.

Figura 1 - Mapa de la Antártica y ubicación del archipiélago Shetlands del Sur; B - Ubicación de la isla Deception en la región de la Península Antártica; C - Isla Deception.



FUENTE: Elaboración propia, adaptado de Melo (2009) y Simões (2011).

Uno de los aspectos que motivó el estudio de este lugar fue el contacto frío-calor, pues, a pesar del frío intenso, característico de la zona antártica, allí se puede observar el humo de las laderas de las colinas volcánicas de la isla, debido a la alta temperatura que hay a poca profundidad y lo cual, ha permitido que se genere un gran interés por el estudio de los microorganismos que se sitúan en la zona de contacto, los poliextremófilos. Se conocen microorganismos que crecen en los hielos de la Antártica a 20 grados bajo cero, y también otros microorganismos que soportan el agua en ebullición y que crecen a temperaturas superiores a los 115 grados centígrados (GÓMEZ, 2015, p. 5).

Sobre esa relación de frío-calor, para Torres y Avendaño (2019), la adaptación al frío es combinada con otras adaptaciones como altas concentraciones de sales presión osmótica e hidrostática regulada, disponibilidad de nutrientes, resistencia a la radiación ultravioleta, entre otras y a pesar de ello, la vida se desarrolla en estos entornos con una gran biodiversidad microbiana, principalmente de bacterias y hongos.

Con respecto al crecimiento de estos microorganismos, según las investigadoras, estos no se pueden estudiar de manera individual debido a su tamaño, siendo necesario recurrir a medios nutritivos artificiales en donde sí se puedan desarrollar rápidamente y formar grandes poblaciones para su fácil manipulación. En un ambiente natural no es frecuente encontrar un solo tipo de microorganismos, lo que existen son comunidades bacterianas. La separación de cada una de las variedades existentes en una comunidad es lo que se conoce como aislamiento de microorganismos (TORRES Y AVENDAÑO, 2019, p. 11).

De acuerdo con la Reunión Consultiva del Tratado Antártico - RCTA (2023), la Isla Deception ha sido descrita como la caldera por colapso, debido a que su parte central está ocupada por la caldera volcánica, la cual se formó a raíz de fracturas anulares originadas tras una o más erupciones. Esta caldera ha recibido el nombre de Puerto Foster y presenta actividad geotermal en distintos puntos, con temperaturas en sus aguas más profundas en torno a los 2–3 °C, principalmente, en los sectores del norte y del centro.

Actualmente, se están realizando varios estudios de biología marina, relacionados fundamentalmente con los registros actuales, la Zona no corresponde a

una localidad tipo o hábitat conocido de ninguna especie. De acuerdo con la RCTA (2023), pese a que la Isla Deception es una zona que ha sido intensamente muestreada en el océano austral, todavía se están registrando nuevas especies, con énfasis en la caracterización actualmente incompleta del inventario de su biodiversidad.

Para Torres y Avendaño (2019), en el caso de muestras aisladas de ecosistemas glaciares de la Antártica, se sabe que microorganismos como los psicrófilos mueren rápidamente si se exponen a temperatura ambiente normal, por esta razón, el estudio en laboratorio requiere un gran cuidado para estar seguros de que no se calienten durante el muestreo, el transporte, el aislamiento y otras manipulaciones.

2.1.3 Microbiología antártica y sus aplicaciones biotecnológicas

Dado a las condiciones extremas de la Antártica, se ha posibilitado el estudio de las comunidades microbianas por parte de los investigadores en el campo de la microbiología. Los microorganismos presentan rápida respuesta a las alteraciones ambientales y esto ha contribuido a la observación y evaluación de las variaciones y ciclos de congelamiento y derretimiento de las masas de agua en el Océano Austral (CRUZ-LEYVA, *et al.*, 2015, p. 104)

Retomando los estudios de Torres y Avendaño (2019), las investigadoras manifiestan que la adaptación a esas variaciones y específicamente a bajas temperaturas, combinada con otras adaptaciones se convierte en un reto, pero a su vez, crea las posibilidades para promover el desarrollo de la vida en diferentes entornos y con una gran biodiversidad microbiana, principalmente de bacterias y hongos. Otra característica que ha posibilitado el estudio de la Antártica, presentada por Domínguez (2008), radica en que los estudios en el campo de la microbiología han centrado especial atención en la biodiversidad bacteriana, tema de primordial importancia en esta investigación, lo cual, también ha llevado a los científicos a centrarse en la descripción de nuevas especies y mantener el interés por la producción de compuestos con aplicaciones biotecnológicas.

Según Garzón, *et al.*, 2017, la biotecnología se conceptúa como un

conjunto de tecnologías con potencial para contribuir al desarrollo sostenible, en el ámbito de la solución de problemas de contaminación. Para el mismo autor, la biotecnología está presente en la producción y elaboración de alimentos; la agricultura y la silvicultura, el sector de la salud, la producción de materiales y productos químicos y la protección del ambiente.

La biorremediación, de acuerdo con Garzón, *et al.*, (2017), también conocida como la biotecnología ambiental, permite la reducción o remoción de los residuos potencialmente peligrosos presentes en el ambiente, con utilización para la limpieza de terrenos o aguas contaminadas, dado que su ámbito de aplicabilidad es muy amplio, pudiendo considerarse como objeto de remediación en cada uno de los estados de la materia, es decir, sólido (suelos o sedimentos). Así, la biotecnología se refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (BISANG *et al.*, 2009, p. 94).

En similitud, la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) (2005), define la biotecnología como la aplicación de principios de la ciencia y la ingeniería para tratamientos de materiales orgánicos e inorgánicos por sistemas biológicos para producir bienes y servicios". La biotecnología es un área multidisciplinaria, que emplea la biología, química y procesos, con gran uso en agricultura, farmacia, ciencia de los alimentos, ciencias forestales y medicina. También, para Zlata (2013), la biotecnología engloba un conjunto de actividades que el hombre ha venido desarrollando desde hace miles de años, como la producción de alimentos fermentados (pan, yogurt, vinos, cerveza, etc.). En tanto, se considera biotecnología moderna a aquella que, contemplando la definición anterior, hace uso de la información genética, incorporando técnicas de ADN recombinante.

Con relación al estudio de los microorganismos, algunos organismos resultan idóneos para explorar su potencial en la biotecnología, especialmente aquellos que habitan ambientes extremos como los microorganismos *extremófilos*. El estudio de estos organismos para la humanidad, objetiva el entendimiento de la gran variedad de condiciones sobre las cuales la vida puede evolucionar y sobrevivir en diferentes condiciones ambientales, como las condiciones extremas, significando la posibilidad de desarrollo de la vida en este tipo de ambientes y la capacidad de

habitabilidad.

Existe una amplia presencia de estos microorganismos, por ejemplo, aquellos extremófilos que pertenecen al *dominio Bacteria*, como puede ser: *Psychromonas ingrahamii*. Sin embargo, la gran mayoría son microorganismos procariotas, bacterias y arqueas, como es de esperar al ser los grupos más abundantes (KRASIMIROVA, 2020, p. 5).

En el caso de los extremófilos y sus categorías, estos microorganismos son capaces de tolerar y resistir a condiciones extremas como las siguientes, descritas por Krasimirova (2020), así:

- pH: Acidófilos (crecimiento óptimo a pH <3-4) Ej: *Leptospirillum ferriphilum*; Alcalófilos (crecimiento óptimo a pH >10) Ej: *Natronomonas pharaonis*.
- Concentración NaCl: Halófilos (Requiere por lo menos 1 M de sal para su crecimiento) Ej: *Haloferax mediterranei*
- Radiación ionizante: microorganismos radioresistentes Ej: *Deinococcus radiodurans*
- Altas presiones: Piezófilos (crecimiento óptimo a >40 MPa) Ej: *Marinitoga piezophila*
- Metales pesados: los metalotolerantes toleran grandes concentraciones de metales pesados. Ej: *Ferroplasma* y *Cupriavidus metallidurans*
- Falta de humedad: xerófilos capaces de crecer con una actividad del agua mínima y resistentes a grandes niveles de desecación. Ej: *Streptomyces atacamensis*
- Temperatura: Psicrófilos (<10 °C, más 20°C) Ej: *Pseudomonas antarctica*; Termófilos (60-85°C) Ej: *Thermus thermophilus*; Hipertermófilos (>80°C) Ej: *Thermotoga maritime*.

Los extremófilos, de acuerdo con Krasimirova (2020), tienen numerosas aplicaciones biotecnológicas de acuerdo con determinadas enzimas (extremozimas), las cuales, producen biocatalizadores únicos que pueden funcionar bajo condiciones que ningún mesófilico podría soportar y que resultan útiles para algunos procesos industriales. Uno de los medios actuales que permiten descubrir y

desarrollar extremozimas es por medio de la bioprospección de los ambientes extremos y/o el uso de la ingeniería genética.

Entre las extremozimas, pueden ser encontradas, por ejemplo, en cuanto al tipo: *los acidófilos*; con extremozimas como la *amilasa* con aplicación industrial relacionada con la producción del almidón o con su procesamiento para la hidrólisis del almidón en azúcares simples. Algunas de sus características radica en que la amilasa es un grupo de enzimas cuya función catalítica es hidrolizar (descomponer) el almidón para dar diversos productos, incluidas dextrinas y polímeros progresivamente más pequeños compuestos de unidades de glucosa (OGBONNA, C. *et al.*, 2014, p. 88).

Dentro del mismo tipo también pueden ser encontradas las extremozimas como las *proteasas* con aplicación tecnológica en la alimentación animal para mejorar la digestibilidad, pero que a su vez, presentan una actividad óptima a temperaturas cercanas a los 60°C, siendo ineficientes al ser aplicadas a temperatura ambiental. Debido a este problema, se ha planteado reemplazar estas enzimas, por otras que actúen eficientemente a temperaturas menores y en este punto, surge la microbiología antártica, como nueva fuente de proteasas con propiedades únicas. Estas enzimas, llamadas también “enzimas psicrófilas”, o “psicrozimas”, presentan una temperatura óptima de catálisis que puede oscilar entre 20°C y 45°C, una constante catalítica, *k_{cat}*, de dos a ocho veces superior que las enzimas comunes, así también como una mayor termosensibilidad (Peralta, 2015).

De acuerdo con Krasimirova (2020), los extremófilos a partir de sus extremozimas presentan algunas aplicaciones biotecnológicas como:

Cuadro 1 - Aplicaciones biotecnológicas

Industria farmacéutica, cosmética y textil		
Psicrófilo descubierto na antártica	<i>Pseudomonas mandelii</i>	produce alginato, compuesto con múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, textil
	<i>Halomonas maura</i>	degrada compuestos aromáticos, produce exoenzimas y exopolisacáridos, y lleva a cabo la desnitrificación
Industria alimentaria		

	<i>Pseudomonas Syringae, Erwinia sp. y Xanthomonas sp.</i>	se reducen consecuentemente los tiempos de congelación y el tamaño de los cristales. De esta forma, mejora la calidad de la comida sólida congelada.
Radioprotección		
	<i>D. radiodurans, Rubrobacter sp y el alga verde Dunaliella bardawil</i>	Los Extremófilos y sus nichos son los mejores modelos para obtener moléculas de interés humano para la radioprotección.
Ócio		
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Snomax Technologies cultiva <i>Pseudomonas syringae</i> , es una de las aplicaciones más importantes en la industria, en el uso de la liofilizadas para la producción de nieve artificial.

Fuente – Elaboración propia a partir de Krasimirova (2020).

Como se ha visto en las aplicaciones biotecnológicas, el desarrollo de la tecnología juega un papel fundamental con relación a las investigaciones realizadas en ambientes extremos y Brasil tiene un papel de destaque en ese sentido, pues es uno de sus objetivos es, justamente, desarrollar tecnologías, visando la minimización del impacto de la presencia humana en el ambiente antártico así como las condiciones de habitabilidad y seguridad para los usuarios de las instalaciones permanentes temporarias brasileñas en la Antártica. Eso, a través del Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) creado en los años 80 y con la adhesión del Tratado da Antártica, en 1975.

El estudio de esos microorganismos por investigadores brasileños ha tenido una destacada contribución, por ejemplo, el grupo de estudio de diversidad y bioprospección de hongos de la Antártica (MycoAntar), creado en 2014 por el profesor Luiz H. Rosa del Departamento de Microbiología de la Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). En palabras del profesor Luiz H. Rosa (2021):

Estudiamos los hongos de vários ecosistemas y hábitats de la Antártica. Durante nuestras actividades construimos lo que probablemente, representa la mayor colección del mundo de culturas de hongos vivos de la Antártica, los cuales están depositados en la Colección de Microorganismos y Células en nuestro Centro de Colecciones Taxonómicas de la UFMG. Ellos vienen siendo estudiados en cuanto a su taxonomía, ecología, genómica y biotecnología (TRILLES y ROSA, 2021, p. 6).

En el año 2019, publicaron el libro *Fungi in Antarctica: diversity,*

ecology and biotechnological applications, se trata del primer libro en el mundo dedicado a la micología antártica y son varios los investigadores, incluyendo profesores y estudiantes envueltos en estudios interdisciplinarios en esa investigación pertenecientes a universidades y centros de investigaciones brasileños como: Universidade Estadual de Campinas (Unicamp); Universidade Federal do Tocantins (UFT), Instituto René Rachou (Fiocruz Minas), Universidade de Brasília (UNB), Universidade Federal Fluminense (UFF), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR) y desde luego, la UNILA - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, de la cual hace parte el presente estudio.

Sobre el estudio de bacterias en bajas temperaturas y su relación con la biorremediación, Lopes (2020) menciona que algunas especies de bacterias han sido encontradas en una grande variedad de organismos y caracterizadas como productoras de AFP, las cuales incluyen estudios como el de Mills (1999) al estudiar la *Marinomonas protea*, aislada de lagos congelados da Antártica.

2.1.4 Potencial biorremediador de los microorganismos psicrófilos

Desde el punto de vista de la academia y en el concepto de Ocampo-Hernández (2021), la biorremediación es una alternativa natural y conveniente para mitigar las concentraciones de contaminantes antropogénicos esparcidos de manera accidental (o intencional) en el medio ambiente. Esta es una actividad importante, la cual cuenta con la participación de los microorganismos capaces de degradar y/o adecuarse a contaminantes introducidos.

Para Brutti *et al.* (2018), existen diferentes métodos de biorremediación, ya sean sofisticados o sencillos, los cuales pueden realizarse bajo condiciones *in situ* o *ex situ*. Se espera que en años venideros esta área se desarrolle y se le otorgue mayor importancia, ya que es una opción viable y en muchos casos económica.

Así mismo, para Watanabe (2001), la biorremediación es una

tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (su capacidad de biodegradación) para limpiar terrenos o aguas contaminadas.

Estos microorganismos utilizan su potencial enzimático para mineralizar los compuestos contaminantes o degradarlos hasta productos intermedios, en un ambiente aerobio o anaerobio. Según la Academia Americana de Microbiología (1992), define la biorremediación como la utilización de organismos vivos para reducir o eliminar riesgos medioambientales resultantes de la acumulación de compuestos químicos tóxicos y otros residuos peligrosos.

Algunas tecnologías de biorremediación son: la *bioestimulación*, *bioaumentación* y *fitorremediación*. Estas, aparte de representar un bajo costo económico e impacto ambiental, posibilitan la eliminación de contaminantes en diferentes entornos como en aguas subterráneas, residuales, suelo y lodos de petróleo. En el caso de la depuración de aguas residuales. Los investigadores, Barrera y Zafra (2018), explican que, en la *bioestimulación*, tecnología más usual, se incorporan nutrientes al sistema para acelerar la biodegradación; en la *bioaumentación* se añaden microorganismos especializados al sistema de tratamiento para incrementar su eficiencia.

Para la recuperación de ambientes contaminados con compuestos orgánicos de origen antropogénico mediante el desarrollo de procesos de biorremediación (la cual hace uso de las capacidades metabólicas de ciertos microorganismos) es actualmente foco de muchas investigaciones. En muchas regiones de clima frío la utilización de organismos mesófilos no es adecuada para la realización de un proceso eficiente. En estos casos, los microorganismos psicrófilos son los únicos capacitados para llevar a cabo una biorremediación exitosa. El aislamiento y utilización de bacterias capaces de asimilar compuestos orgánicos contaminantes como fuente de carbono y energía (hidrocarburos alifáticos y aromáticos, PCBs, fenoles, etc.) es un activo campo dentro de la microbiología y la biotecnología ambiental en donde se aprovechan las adaptaciones de los organismos psicrófilos y sicrotolerantes (CORMACK *et al.*, 2014, p.7).

Bacterias gram negativas de los géneros Moraxella, Moritella, Palaromonas, Polaribacter, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Psychrobacter, Psychroflexus y Vibrio y algunas gram positivas pertenecientes a los géneros

Arthrobacter, Bacillus, Micrococcus y Planococcus constituyen, entre otros, algunos géneros que presentan bacterias psicrófilas (Willey et al. 2008). Polaromonas vacuolata es un ejemplo de bacteria gram negativa psicrófila extrema. Esta habita en las gélidas aguas de la Antártida, soportando temperaturas inferiores a los 0°C, con óptimos de crecimiento a 4°C (Irgens et al. 1996). Las enzimas de esta bacteria han sido muy estudiadas con el fin de comprender las reacciones de descomposición de alimentos en los refrigeradores y han sido ampliamente utilizadas en fragancias para evitar su rápida volatilización (BELMAR y ALONSO, 2018, p. 1-7).

2.1.5 Actividad enzimática microbiana en ambiente frío

El éxito de un organismo o un grupo de organismos en un ecosistema dado, depende, en tanto que sus necesidades nutritivas como de tolerancia ambiental sean satisfechas por su entorno (Odum 1971). Según la ley de tolerancia de Shelford, existen límites en los valores de los factores ambientales por encima o por debajo de los cuales no es posible que los organismos sobrevivan (Atlas & Bartha 2002). Uno de los parámetros ambientales de mayor relevancia en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos es la temperatura.

Cada microorganismo muestra curvas de crecimiento características en función de la temperatura, donde pueden ser delimitadas tres temperaturas cardinales. Una temperatura óptima de crecimiento, donde sus tasas de crecimiento y reproducción son más altas, así como una temperatura mínima y máxima por debajo o por encima de la cual son metabólicamente inactivos respectivamente (Atlas & Bartha 2002). Dependiendo de la especie o cepa microbiana, las temperaturas cardinales serán diferentes. Es relevante conocer los valores óptimos así como los límites de temperatura que un microorganismo es capaz de tolerar, ya que estos determinan su supervivencia y ponen de manifiesto la función concreta que desempeñan en un ecosistema dado (BELMAR y ALONSO, 2018, p. 1-7).

Según Gurung *et al.* (2013), el profesor Wilhelm Friedrich Kuhne, de la universidad de Heidelberg en 1987, fue la primera persona que utilizó el término enzima, que proviene del griego y significa “en levadura”. Las enzimas cumplen un

papel esencial como moléculas biológicas, responsables de todas las interconversiones químicas necesarias para sustentar la vida. Debido a las diversas actividades basadas en su naturaleza de reacción, se clasifican según su reacción catalizada enzimática. La amilasa es una enzima que cataliza la descomposición del almidón en azúcares y las que son obtenidas de microorganismos tienen un amplio espectro de usos industriales, por su mayor estabilidad en comparación a las amilasas vegetales y animales.

Las enzimas psicrófilas desempeñan un papel vital en las industrias de producción a gran escala por sus cualidades ecológicas, económicas y eficientes. El alcance de las aplicaciones biotecnológicas de nuevas extremozimas de psicrófilos se está ampliando con el tiempo. Esto se debe a su capacidad para catalizar reacciones a bajas temperaturas cercanas al punto de congelación del agua y actuar como herramientas de ahorro de energía (Hamid, 2022).

El trabajo de Silva *et al.* (2020), explica cómo las enzimas psicrófilas muestran su mayor nivel de actividad en ambientes fríos y son aproximadamente diez veces más activas que las enzimas producidas por microorganismos mesófilos. Este atributo único permite que el microorganismo se adapte a las bajas temperaturas y ofrezca ventajas biotecnológicas. Primero, el alto nivel de actividad enzimática permite reacciones completas con una menor concentración de enzimas psicrófilas, lo que reduce el costo de los experimentos al minimizar la necesidad de enzimas costosas. En segundo lugar, su termosensibilidad hace que se inactiven fácilmente a altas temperaturas y temperaturas aptas para mesófilos, facilitando procesos controlados que requieren una desactivación enzimática.

Esto se debe a su capacidad de adaptarse a bajas temperaturas y a una estructura molecular más flexible. Estas enzimas adaptadas al frío tienen un alto nivel de actividad específica a bajas temperaturas, lo que es una adaptación clave para compensar el crecimiento exponencial. Tronelli *et al.* (2007), afirma que en comparación con las enzimas mesófilas, las enzimas psicrófilas tienen mayor eficiencia catalítica en el rango de temperatura de 0 a 20 °C, pero generalmente tienen menor termoestabilidad.

Para la hidrólisis enzimática, la unión sustrato-enzima es esencial, su naturaleza y mecanismo de acción irá a variar de un tipo de enzima para otra. En el caso de proteasas, Benítez *et al.* (2008), explica como la hidrólisis proteolítica no ocurre en una sola reacción, sino en un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que aumenta la complejidad de este tipo de procesos. Los mismos autores también hacen una distinción entre la acción de endoproteasas e exoproteasas, siendo que las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos en el interior de la cadena de la proteína, por el contrario, las exoproteasas eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos.

Como comentado en el estudio de Paredes *et al.* (2017), las proteasas microbianas representan el grupo más importante de enzimas comerciales, pues poseen gran variedad de aplicaciones en diversos sectores industriales: alimentos, farmacéutico, cosméticos, médico, peletero, textil, entre otros. Inclusive, algunas de estas enzimas se utilizan en la formulación de detergentes, manejo de residuos y procesos de biorremediación. En términos de producción enzimática de proteasas, las bacterias tienen innumerables ventajas debido a su rápido crecimiento en espacios limitados y fácil manipulación genética.

Las α -amilasas son enzimas muy importantes por sus diferentes aplicaciones en la industria, tal como panadería, textiles, reducción de algodón entre otros. Así mismo, todos los reportes muestran la importancia y especificidad de las condiciones de pH y temperatura para una actividad máxima de estas enzimas (VEDIA *et al.*, 2019).

Los extremófilos y los extremozimas ocupan un lugar importante en la industria multimillonaria de la biotecnología ambiental, con aplicaciones que abarcan los sectores agrícola, biomédico e industrial. Debido a la naturaleza altamente competitiva de la investigación y el desarrollo industrial, en la mayoría de los casos el camino de un extremófilo a una aplicación comercial exitosa no está documentado en publicaciones científicas revisadas por pares y puede seguirse parcialmente a través de patentes, reuniones de biotecnología y sitios web de empresas (PODAR Y REYSENBACH, 2006).

2.1.6 Biorremediación microbiana de efluentes industriales

Durante la segunda mitad del siglo XIX se ha evidenciado el avance del desarrollo sostenible y con ello la preocupación por la protección ambiental y el uso racional de los recursos naturales. Las actividades económicas desarrolladas por la humanidad han ocasionado daños irreversibles a nivel mundial debido a la industrialización y urbanización, por lo que es necesario pensar en alternativas de tecnologías de aplicación sostenibles como la biorremediación, que es la aplicación de microorganismos, hongos, plantas o enzimas para la restauración del medio ambiente. La biorremediación basada en la capacidad de los organismos vivos, busca degradar en forma natural ciertos compuestos contaminantes, lo que permite la remoción de residuos potencialmente peligrosos y que están presente en el ambiente, (GARZÓN , 2017).

Los efluentes industriales, domésticos y también el uso de fertilizantes en ríos propician el fenómeno de eutroficación, que se caracteriza por un crecimiento descontrolado de organismos autotróficos y después de este crecimiento se da la descomposición de la biomasa, que es el deterioro de todo el ecosistema acuático. En el ámbito industrial existen algunos métodos que son los tradicionalmente utilizados para la descontaminación de los afluentes, como la precipitación química y filtración, la oxidación y reducción biológica, el tratamiento electroquímico, absorción y evaporación, (DIAS *et al.* 2019).

2.2 Justificación

Una de las principales justificaciones de esta investigación radica en la importancia de encontrar soluciones naturales y sostenibles para la remediación de ambientes contaminados, principalmente efluentes con alta concentración de proteínas y almidón. El proceso de biodegradación realizado por microorganismos genera numerosos beneficios respecto a los métodos tradicionales, como la reducción de costos y de los efectos negativos sobre el medio ambiente. Además, las investigaciones actuales pueden ayudar en el avance de tecnologías biotecnológicas, el uso de microorganismos y/o sus derivados con gran potencial de uso en diversos sectores. Un ejemplo de esto, es el uso de enzimas, las cuales se pueden implementar en la biorremediación de ambientes contaminados, en la generación de

biocombustibles y otros bioproductos.

La pregunta que guía este estudio es: ‘¿Cuál es el potencial biotecnológico de los microorganismos recolectados en la Isla Deception de la Antártica para biorremediar efluentes industriales?’. Para responder a esta pregunta, se tomarán una serie de pasos, que incluyen recolectar muestras de sedimentos marinos en la Antártica y de efluentes industriales; aislar bacterias de estas muestras, realizar pruebas enzimáticas y seleccionar bacterias e inclusive un hongo para evaluar su capacidad para degradar materia orgánica, además de los análisis complementarios necesarios. Así, esta investigación aportará conocimiento científico sobre la diversidad de microorganismos en la Antártica.

Considerando las limitaciones de los métodos de remediación convencionales y la importancia de preservar la biodiversidad y los servicios ecosistémicos, el uso de microorganismos antárticos ofrece una alternativa prometedora. La biodiversidad de los microorganismos antárticos, su adaptabilidad a condiciones extremas y potencial de aplicación, también han despertado el interés de la comunidad científica. Inspirados por los misterios que oculta este lugar y su gran potencial, el grupo de investigación del Laboratorio de Estudio e Investigación en Biotecnología Ambiental (LabBioAmb) de la UNILA ha desarrollado diversos estudios en esta área, dentro de los que también se encuentra esta investigación.

En esencia, la investigación está diseñada para enriquecer el conocimiento científico existente sobre la biodegradación de materia orgánica presente en efluentes industriales y al mismo tiempo brindar apoyo para futuros procedimientos de biorremediación y comprender los límites de la vida en condiciones extremas. En última instancia, el éxito de esta investigación requerirá la colaboración de múltiples disciplinas, incluidas la microbiología, la química y la biotecnología ambiental; la convergencia de estos diversos campos permitirá un enfoque integral y multidisciplinario para poner a prueba conocimientos teóricos y prácticos adquiridos hasta la fecha.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar el potencial biotecnológico de aislados de muestras recolectadas de sedimentos marinos en la Isla Deception en la Antártica para tolerar y/o degradar material orgánico de efluentes industriales.

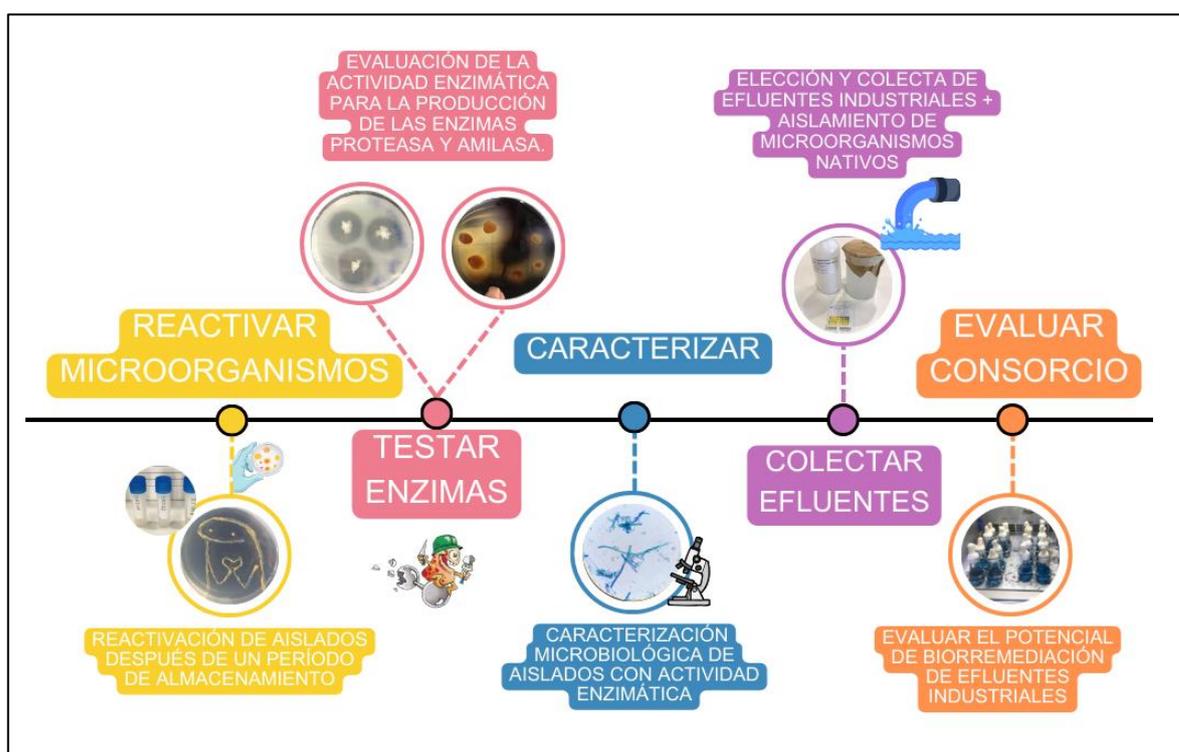
3.2 Objetivos específicos

- Reactivación y cultivo de microorganismos antárticos;
- Evaluar la actividad enzimática de los microorganismos referentes a las enzimas proteasa y amilasa;
- Determinar la influencia de temperatura y pH en la producción enzimática
- Caracterizar los microorganismos seleccionados mediante técnicas microbiológicas;
- Probar el potencial de consorcios elegidos para tolerar y degradar materia orgánica presente en efluentes industriales cerveceros y de suero de leche.

4. METODOLOGÍA

La siguiente figura tiene la intención de dar al lector una panorámica general de la metodología de este proyecto. Contiene las etapas implementadas, desde la reactivación de los microorganismos antárticos hasta la evaluación de consorcios en efluentes industriales cerveceros y de suero de leche, implementando diversos experimentos y técnicas para estudiar extremófilos.

Figura 2 - Principales etapas metodológicas del proyecto.



FUENTE: AUTORA, 2023.

4.1 Reactivación y cultivo de los microorganismos.

Las muestras de sedimento marino antártico fueron obtenidas durante la OPERANTAR (Operação Antártica) en el verano 2018/2019, a una profundidad de 95,4 metros en la Isla Deception, Antártica. Dicha colecta se dió gracias al equipamiento BOX CORER o sacatestigos, una caja de muestreo de acero inoxidable que es sumergida en el agua y sirve como extractor de sedimentos bajo el piso marino, se caracteriza por ser uno de los métodos más simples y más utilizados para ese fin.

Una vez que la BOX CORER está llena de sedimentos se recupera a bordo del navío y el contenido se lleva a laboratorios asociados para el submuestreo y análisis.

Parte de esas muestras de sedimentos marinos fueron encaminadas para el Laboratorio Ambiental de la UNILA y durante el año 2021, las alumnas Layssa Melo y Karine Camacho estuvieron encargadas de aislar y conservar los microorganismos presentes como descrito en su trabajo aún no publicado. En el año 2022, se llevó a cabo un proyecto de investigación del LabBioAmb en el que se reactivaron al menos 41 cepas bacterianas con el fin de identificar su actividad enzimática. Algunos de microorganismos testados demostraron tener actividad de las enzimas proteasa y amilasa.

En julio de 2023, la autora dió inicio al presente proyecto con la reactivación de aquellos microorganismos que se mostraron positivos para la actividad de proteasa y amilasa. Para ello, fue necesario sembrar las colonias de interés en medio Nutrient Agar (NA) y posteriormente fueron incubadas a 12-15°C durante 4 días. El hongo filamentoso 'FAR 18' fue cultivado en medio sólido y líquido, PDA (Potato Dextrose Agar). y Extracto de Malta 2%, respectivamente.

Los organismos aislados también fueron incubados a temperaturas más altas, principalmente 28°C por el mismo periodo de tiempo para demostrar si estos organismos son 'Psicrófilos facultativos'. Es decir, un organismo que crece mejor a temperaturas inferiores a 20°C, pero que también puede crecer a temperaturas superiores a 20°C (GOOCH, 2011).

4.2 Evaluación de la actividad enzimática de proteasa y amilasa para la selección de los microorganismos constituyentes del consorcio

La actividad enzimática de proteasa y amilasa fue observada mediante halos de hidrólisis alrededor de las colonias sembradas en placas con agar nutritivo adicionado con skim milk y almidón, respectivamente.

- Proteasa

Inicialmente, los aislados fueron cultivados en medio NA suplementado con 10% de leche desnatada como fuente de carbono y nitrógeno para

la producción de proteasas extracelulares. El ensayo fue realizado en triplicado por cada placa e incubadas a 15°C y 28°C. Pasados al menos 4 días, se visualizó y midió la formación de halos translúcidos alrededor de las colonias, lo que se considera como resultado positivo para la actividad enzimática, caso no haya presencia de esas zonas más claras, el ensayo es considerado negativo.

- Amilasa

Para la medición de la producción de amilasa se adaptó la metodología realizada por Anduaem (2014). Se realizó un repique de las colonias bacterianas, pasando del medio NA al ANA (Amido Nutriente Agar) el cual contiene 1% de almidón, dicho repique también ayudaría a obtener colonias puras. El ensayo fue realizado en triplicado por cada placa de Petri e incubadas a 15°C. Transcurridos 4 días, se adiciona a la superficie del medio de cultura una solución de 1% de yodo en 2% de yodeto de potasio. Esta solución de yodo facilita la visualización de la formación de un halo de decoloración alrededor de las colonias, lo que se considera como resultado positivo para la actividad de amilasa.

- Cálculo del Índice Enzimático (IE)

Rita, Gomes y Marriel (2019), explican el índice enzimático (IE) como la relación entre el diámetro de la colonia (DC) y el diámetro del halo de hidrólisis (DH) medidos en mm. Los índices enzimáticos que sean superiores a dos (>2) corresponden a los microorganismos con mayor actividad enzimática extracelular. Así, la ecuación usada es:

Figura 3 - Medición y ecuación para el cálculo del Índice Enzimático.



FUENTE: AUTORA, 2023.

Las dos cepas bacterianas que demuestren mayor índice enzimático,

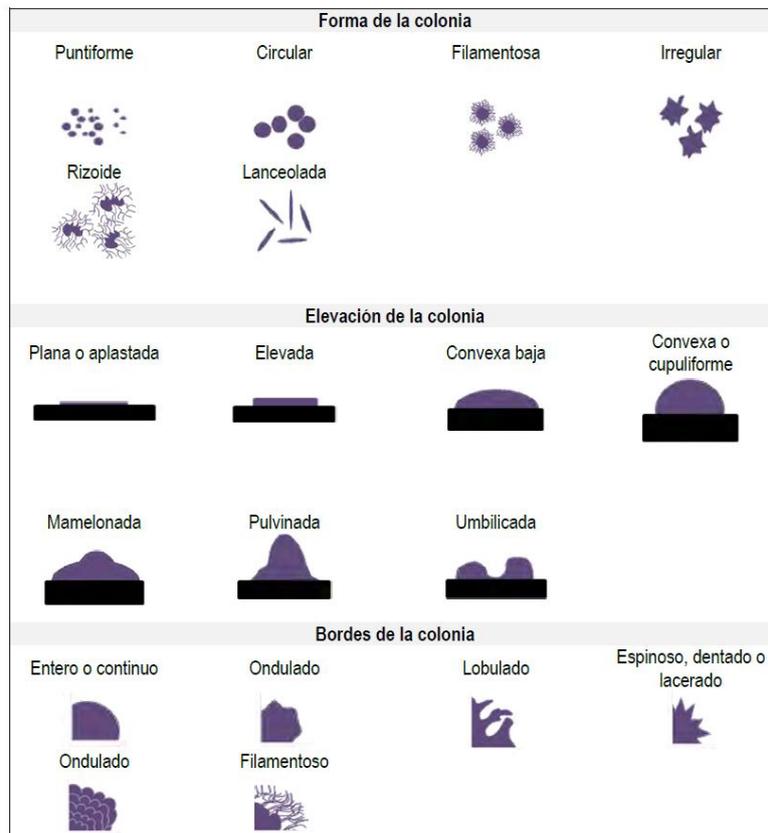
serán escogidas para ser parte de un consorcio junto con el FAR18, un hongo filamentoso que demostró gran potencial biotecnológico en estudios anteriores del laboratorio. De esta forma, se obtendría una terna para componer el consorcio sometido a diversos ensayos para testar su capacidad de sobrevivencia e inclusive su capacidad de degradar materia orgánica en efluentes industriales.

4.3 Caracterización microbiológica de aislados con actividad enzimática.

- Caracterización macroscópica

El autor ROJAS (2011), indica cómo caracterizar y evaluar el crecimiento microbiano de colonias ya formadas, es decir de agrupamientos bacterianos aislados y observables macroscópicamente. Para ello, considera la siguiente figura:

Figura 4 - Descripción macroscópica según forma, elevación y bordes de las colonias.



FUENTE: Rojas, 2011.

Además de las características 'forma, borde y elevación', el mismo autor

menciona otros aspectos que pueden ser considerados en la descripción macroscópica, tales como tamaño, superficie, consistencia, aspecto, pigmento y hemólisis.

- Caracterización microscópica

Antes de la visualización de la lámina en el microscopio, se realizaron tinciones con los colorantes disponibles en el laboratorio, para el hongo FAR 18 fue usado azul de metileno e inclusive fucsina; también se hizo tinción de GRAM a para las colonias bacterianas por composición y morfología, es decir, no sólo para distinguir GRAM positivas de GRAM negativas, sino para facilitar la visualización de cada una de las morfologías, tales como cocos, diplococos encapsulados, sarcinas, sacacorchos, bacilos, espirilos, etc.

- Prueba catalasa:

Para la ejecución de esta prueba fueron seguidas las instrucciones de Rojas (2011), que testa a microorganismos con un día de incubación y peróxido de hidrógeno al 3%. Una pequeña muestra del microorganismo es transferida al centro de la lámina que contiene una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y se emulsiona. La aparición rápida y sostenida de efervescencia (o burbujas de gas) indica una prueba positiva. Sin embargo, es importante tener en cuenta que algunas bacterias pueden poseer enzimas distintas de la catalasa, capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno; por lo tanto, unas pocas burbujas diminutas que se forman a los 20 a 30 segundos no se consideran una prueba positiva. Se deben tener otras precauciones: el medio inoculado no debe ser selectivo y tampoco puede contener sangre; las asas utilizadas para la transferencia no han de contener hierro, ya que esto puede producir falsos positivos.

4.4 Efecto de pH y temperatura en la producción enzimática

Para este ensayo fueron elegidos sólo algunos de los microorganismos con alta actividad enzimática.

- Efecto de la temperatura en la producción de proteasas y amilasas:

Se evaluó el efecto de la temperatura, para lo cual se realizaron incubaciones a 15°C y 28°C con el microorganismo de mayor actividad enzimática y se determinó actividad proteolítica y amilolítica midiendo en Índice enzimático.

- Efecto del pH en la producción de amilasas:

Fueron preparadas varias placas de medio NA con adición de almidón variando el pH utilizando NaOH y HCl. Posteriormente, se realizaron inoculaciones a diferentes valores de pHs (de 3 a 10) y en la temperatura de 15°C con el microorganismo de mayor actividad enzimática. Finalmente, se midió y calculó la actividad amilolítica en esas nuevas condiciones.

4.5 Elección y colecta de efluentes industriales.

En las pruebas de 'hidrólisis de almidón' y 'caseína' se determinó la actividad de amilasas y proteasas, respectivamente. Lo cual sugiere el potencial de algunos de esos individuos para producir exoenzimas capaces de degradar proteínas y almidón presentes en efluentes industriales. El paso a seguir sería la selección de industrias cuyas actividades económicas generan efluentes que tuvieran una alta concentración de proteínas y almidón. Tras la conversación y debido consentimiento de estas industrias, serían recibidos y/o colectados los efluentes.

4.5.1 Suero de leche proveniente de la Industria Quesera y efluente de la industria Sooro Renner.

Para el caso de las proteasas, su producción enzimática indica su utilización en la degradación de compuestos típicamente proteicos, como sangre y leche; por ello fue seleccionada la industria SOORO RENNER, ubicada en Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. Dicha industria forneció dos tipos de efluente para este estudio:

- Primero, 3 litros de suero de leche refrigerados, correspondiente a los efluentes

de la industria quesera o para lo que sería para la empresa Sooro, su materia prima. Pues dicha empresa procesa y comercializa el suero de leche de las industrias queseras locales para la fabricación de otros productos como quesos procesados, bebidas, sopas, salsas, helados y comestibles helados, además de poder ser utilizados en la nutrición deportiva y animal.

- Segundo, parte de ese suero es reutilizado por la propia empresa para extraer sus compuestos nutricionales y crear otros productos como el Whey Protein concentrado, con 34%, 60% y 80% de proteínas. Así, durante el funcionamiento de estas actividades, es generado otro tipo de efluente con carga proteica menor. De este último efluente, también fueron recibidos en el Laboratorio de la UNILA 3 litros refrigerados que serían usados en este estudio.

4.5.2 Efluente de la industria cervecera '277 Craft Beer'.

Por otra parte, las amilasas descomponen (hidrolizan) el almidón contenido en diversas muestras, como en las colectadas de la empresa '277 Craft Beer' ubicada en Foz de Iguazú, Paraná, Brasil; pues la malta usada en la producción de cerveza puede contener en torno de 60% de almidón. Fueron colectados, por lo menos 4 litros de efluente en diversos puntos del proceso de fabricación de cerveza Pilsen.

4.5.3 Colecta

Para la colecta se tuvieron consideraron varios aspectos como: Identificación y muestreo de los puntos de descarga de los efluentes industriales para obtener una representación más adecuada del agua residual; colecta de muestras utilizando recipientes de vidrio o plástico, previamente lavados, enjuagados con agua desionizada, autoclavados, sellados y con posterior marcación; registro de la información relevante sobre el local, como la ubicación geográfica, procesos, condiciones de la medición, etc.; medición de parámetros como el pH y la temperatura (*in situ* cuando sea posible); después de la colecta, se mantuvieron las muestras refrigeradas durante el transporte y el almacenamiento; en el laboratorio de realizaron análisis microbiológicos para aislar de microorganismos nativos propios del proceso o que estaban presentes en el momento de la colecta.

- Colecta del efluente cervecero

Como mencionado, la colecta se realizó en un día de producción de cerveza Pilsen, obteniéndose muestras representativas de los dos hervores que acontecen durante la etapa de separación y lavado. Es en dicha etapa que se pretende separar el líquido (mosto) del sólido (afrecho). El mosto filtrado se almacena, mientras que la torta de afrecho acumulada en el fondo de los tanques se lava con agua caliente para disolver los azúcares contenidos en esta mezcla sólida. Gran parte del líquido de lavado se recoge y procesa en otro reactor. El afrecho agotado es desechado por la industria, mientras que el mosto es enfriado. Se realizó una lectura previa *in situ* de temperatura y pH con las cintas medidoras. Una vez en el laboratorio, se verificaron con más exactitud los valores de pH usando el pHmetro, además de aislar los microorganismos nativos.

4.6 Probar el potencial de consorcios elegidos para tolerar y degradar materia orgánica presente en efluentes industriales cerveceros y de suero de leche

- **Parámetros para la elección de los consorcios**

Para la constitución del consorcio y futuros ensayos se tuvo como criterios de inclusión aquellas bacterias con IE superior de 2 y como criterios de exclusión bacterias seleccionadas en estudios anteriores, con IE inferior de dos y que no fueran colonias puras.

Se estableció que cada consorcio antártico (ANT) estaría compuesto por tres microorganismos, siendo dos de tipo bacteriano (BAD) y el tercero sería el hongo filamentoso *Cladosporium* sp. (FAR 18), el cual mostró potencial biotecnológico.

Aunque originalmente se diseñó el consorcio compuesto por BAD 12, BAD 40 y FAR 18, por estudios anteriores con efluentes de la industria textil y lixiviados sanitarios, existían indicios de que las colonias preservadas no estarían puras. Por lo que esta investigación comenzó desde cero en la reactivación de todos los criotubos,

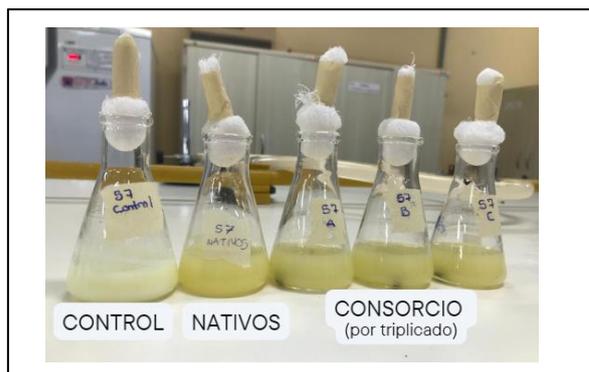
para establecer si existe contaminación y en cuales aislados. Posteriormente, se realizarían otras pruebas y ensayos enzimáticos para la constitución de otros consorcios que ayudasen en la degradación de material orgánicos presente en los otros tres tipos de efluente (Suero de leche de industrias queseras paranaenses, efluente de la industria SOORO y efluente de la industria cervecera '277 Craft Beer').

- **Ensayos para la degradación de proteína en los efluentes de las Industrias Queseras y efluente residual de Sooro Renner.**

Para cada tipo de efluente se hizo un ensayo, cada uno con un total de 20 erlenmeyers. De ellos, 5 serán destinados para lectura de resultados al tercer, quinto, séptimo y al quinceavo día. Temperaturas: 15°C y 28°C; 150 rpm; 50 ml de efluente por erlenmeyer. Para cada día se distribuyeron los erlenmeyers de la siguiente forma:

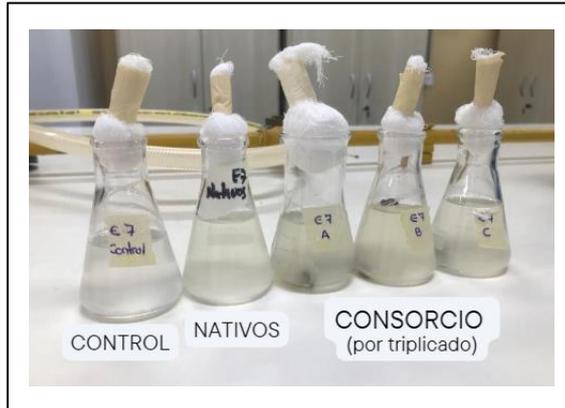
1. Control (esterilizado y sin inóculo)
2. Nativos (microbiota del efluente - NAT)
3. Consorcio **A**: BAD6, BAD 41 y FAR18
4. Consorcio **B**: BAD6, BAD 41 y FAR18
5. Consorcio **C**: BAD6, BAD 41 y FAR18

Fotografía 1 - Consorcio para el efluente de suero de las Industrias Queseras.



FUENTE: AUTORA, 2023.

Fotografía 2 - Consorcio para el efluente de la Industria SOORO.



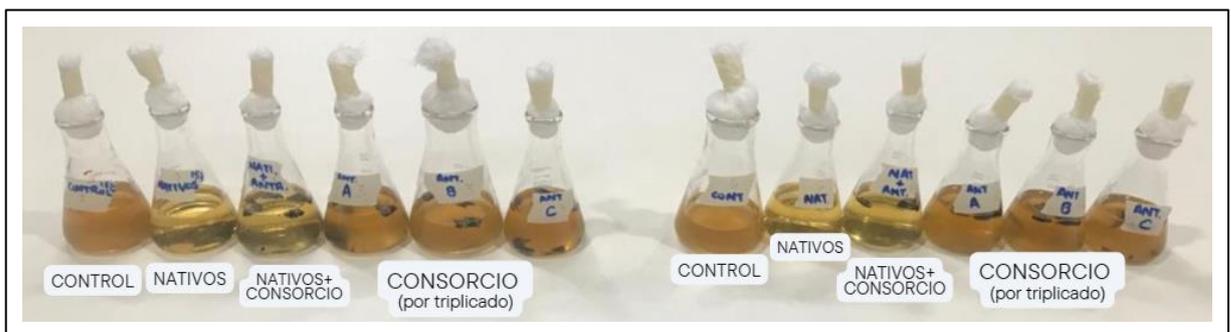
FUENTE: AUTORA, 2023.

- **Ensayo para la degradación de almidón en el efluente de la Industria cervecera '277 Craft Beer'**

Este ensayo tiene un total de 12 erlenmeyers por cada ensayo de temperatura. De ellos, 6 serán destinados para lectura de resultados al tercer día y al sexto día. Temperaturas: 15°C y 28°C; 140 rpm; 70 ml de efluente por erlenmeyer. Las condiciones de este ensayo fueron adaptadas conforme a la disponibilidad de equipos. Los 6 erlenmeyers fueron distribuidos así:

1. Control (esterilizado y sin inóculo)
2. Nativos (microbiota del efluente)
3. Nativos + consorcio
4. Consorcio **A**: BAD6, BAD 37 y FAR 18
5. Consorcio **B**: BAD6, BAD 37 y FAR 18
6. Consorcio **C**: BAD6, BAD 37 y FAR 18

Fotografía 3 - Consorcio del efluente del Segundo hervor de la cerveza Pilsen, 277 Craft Beer.



FUENTE: AUTORA, 2023.

- Sobre el inóculo

Para los ensayos de degradación, primeramente se realizó la padronización de concentración de las colonias bacterianas que conforman el consorcio, cultivadas en medio de cultivo NB (Nutrient Broth) a 15°C. Para el pre-inóculo, las colonias son pasadas de medio NA a medio NB por un periodo de 16h a 18h o hasta alcanzar una D.O. (Densidad Óptica) de 0,5 a 0,8. La densidad óptica fue medida mediante espectrofotometría a tres longitudes de onda, 600 nm, 580 nm y 540 nm, esto con el fin de determinar la mejor longitud que permita observar el crecimiento bacteriano.

Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas en el medio NB, siendo estas 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Con el tiempo y número de repeticiones del experimento se percibía que la dilución 10^{-1} era la más indicada para la inoculación en los diversos efluentes. La relación de volumen inóculo bacteriano-efluente, se mantuvo en 500 μ l a 1 ml de inóculo por cada 50 ml de efluente. La cantidad de FAR18 establecida para o inóculo es de 3 discos de micelio (0,5 cm de diámetro) por cada 50 ml de efluente.

Los ensayos con efluentes proteicos estaban constituidos por un blanco, un control y los consorcios escogidos (por triplicata). Para el ensayo con efluente cervecero se incluyó la variación 'nativos+antárticos' (NAT+ANT) para estudiar los efectos de esa fusión, simulando un posible escenario real. Después de la inoculación, se llevaron los ensayos a incubación en shakers a rotación y temperatura constantes, pasados algunos días, serían evaluados por espectrofotometría. Para la lectura, cada muestra fue filtrada al vacío con filtro de 0.22 μ m y se realizó la medida de absorbancia del sobrenadante por medio del espectrofotómetro. También fue medida la biomasa, pesando el filtro de 0,22 μ m antes y después de la filtración, luego llevándolo a una estufa a 50 grados por 24 h. Para el cálculo de la posible disminución o no del material orgánico, los valores obtenidos fueron reemplazados en la siguiente ecuación:

$$\text{Decoloración (\%)} = \left(\frac{A_{\lambda, \text{inicial}} - A_{\lambda, \text{final}}}{A_{\lambda, \text{inicial}}} \right) * 100$$

donde,

$A_{\lambda, \text{inicial}}$ = Absorbancia inicial

$A_{\lambda, \text{final}}$ = Absorbancia final.

4.7 Conservación de microorganismos aislados

Con la técnicas microbiológicas (incluyendo siembra por agotamiento) se están obteniendo colonias puras, las cuales son conservadas por triplicado en criotubos en glicerol al 20%, también preparado por la autora. La temperatura de almacenamiento es de -24°C y futuramente de -70°C a -80°C. La conservación está acompañada de registro fotográfico y caracterización de las cepas.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Reactivación y cultivo de los microorganismos.

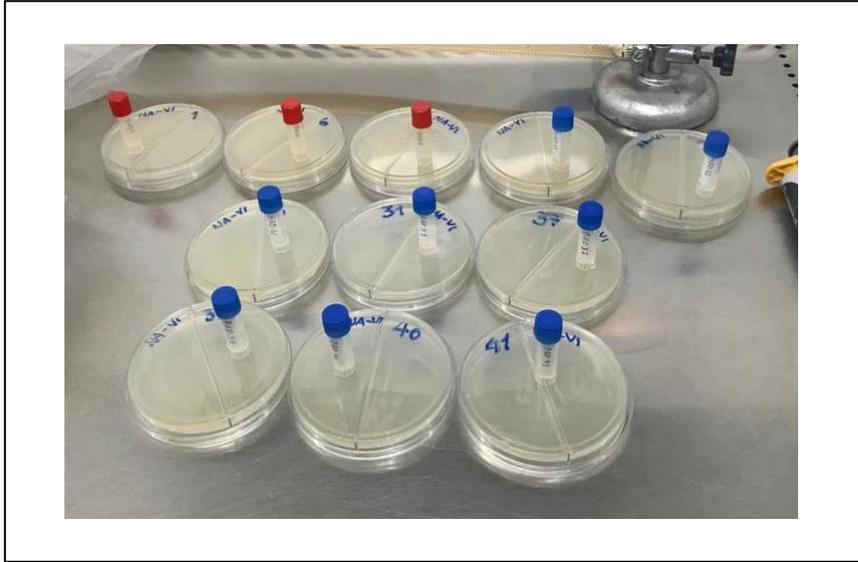
Como mencionado anteriormente, los microorganismos antárticos (BADs y FAR18) ya habían sido aislados y conservados en estudios anteriores. Así que este estudio partió del descongelamiento y siembra en medios de cultivo de los microorganismos con actividad enzimática positiva para amilasa y proteasa.

Fue reactivado el FAR18 e inicialmente 15 BADs: 1, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 16, 31, 33, 35, 37, 38, 40, 41.

Podar y Reysenbach (2006) relatan que las comunidades microbianas son muy complejas y están compuestas por cientos de especies. Desafortunadamente, pocas de estas especies se han cultivado con éxito y para ellos, si incluso eso fuera factible, estudiar cada especie individualmente no sería práctico dada su gran cantidad. No obstante, en los últimos 20 años se han empleado una variedad de métodos y esfuerzos para estudiarlos, teniendo en mente tanto la curiosidad científica como las posibles aplicaciones prácticas.

Durante la investigación surgieron algunos imprevistos, y con ellos, algunas hipótesis alrededor del aislamiento: quizá algunos de los criotubos no contenían cepas puras o estarían repetidas. Por ello, se reactivaron en simultáneo los dos criotubos conservados para cada código.

Fotografía 4 - Activación inicial de aislados.



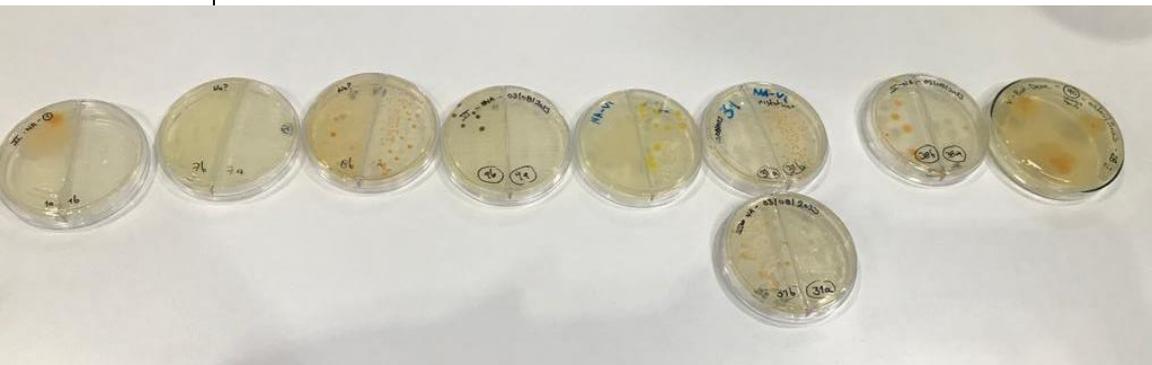
FUENTE: AUTORA, 2023.

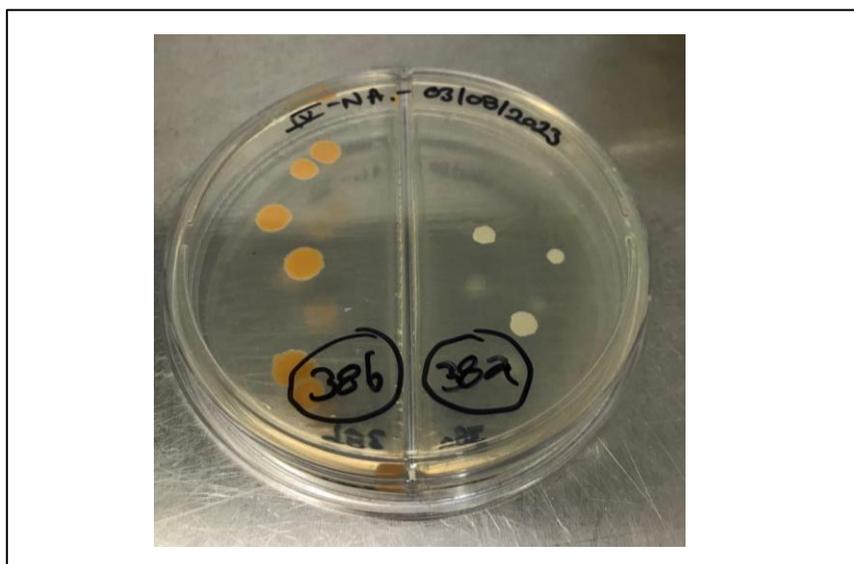
En ese proceso se detectó, en primer lugar, la presencia de más de una cepa en algunos de los criotubos, y en segundo lugar, colonias diferentes registradas bajo el mismo código (siendo el caso de las BAD: 1, 7, 8, 9, 12, 31, 38, 40). Por este último motivo, en el trabajo se pueden encontrar variaciones de los códigos originales, por ejemplo: BAD11 blanca y BAD11 naranja.

Fotografía 5 - Inóculos que presentan más de una especie bacteriana por código.

FUENTE: AUTORA, 2023.

Fotografía 6 - Activación de las colonias registradas bajo el código 'BAD38'.
Obteniendo las variantes 'BAD38a' y 'BAD38b'.





FUENTE: AUTORA, 2023.

El crecimiento de FAR18 en medio Malte fue bastante diferenciado, aumentó rápidamente su biomasa comparado con el medio PDA, lo cual facilitó mucho la reproducción y conservación de ese microorganismo, pues su reactivación y propagación fue dispendiosa en un inicio. FAR, demostró capacidad de desarrollarse en temperaturas de 15°C y 28°C, al igual que otras BADs.

El aislamiento en laboratorio generalmente se hace sólo teniendo en cuenta características macroscópicas, por lo que se recomienda hacer dicho procedimiento acompañado de observación microscópica y otro tipo de pruebas. Escobar (2016), destaca que como el criterio para seleccionar colonias son sus características macroscópicas, pueden generar aislamientos repetidos entre individuos o incluso entre diluciones.

Se incluyen esas observaciones, pues algunos de los resultados de los ensayos realizados pudieron verse afectados por esas causas. Hay varios factores sobre la reactivación que pudieran ser considerados. En la etapa de reactivación se aprendieron muchos aspectos en cuanto a las técnicas de siembra, aislamiento, conservación del material, cantidad de reserva de microorganismos e implementación de técnicas o informaciones complementarias para facilitar el desarrollo del estudio.

5.2 Actividad enzimática de proteasa y amilasa para la selección de microorganismos constituyentes de un consorcio.

Para este trabajo fueron evaluadas principalmente las enzimas proteasas y amilasas. Así, la actividad proteolítica fue evaluada por la prueba 'Caseína' en Agar nutritivo adicionado con Skim Milk y la actividad amilolítica por medio de la prueba de 'Hidrólisis de almidón'.

- **Proteasa:**

Los microorganismos proteolíticos del estudio realizaron la hidrólisis de las proteínas de los medios suplementados utilizados, fue evidente la digestión de proteínas por la reducción del color blanco (típico de la leche) a halos/zonas transparentes durante el tiempo de crecimiento.

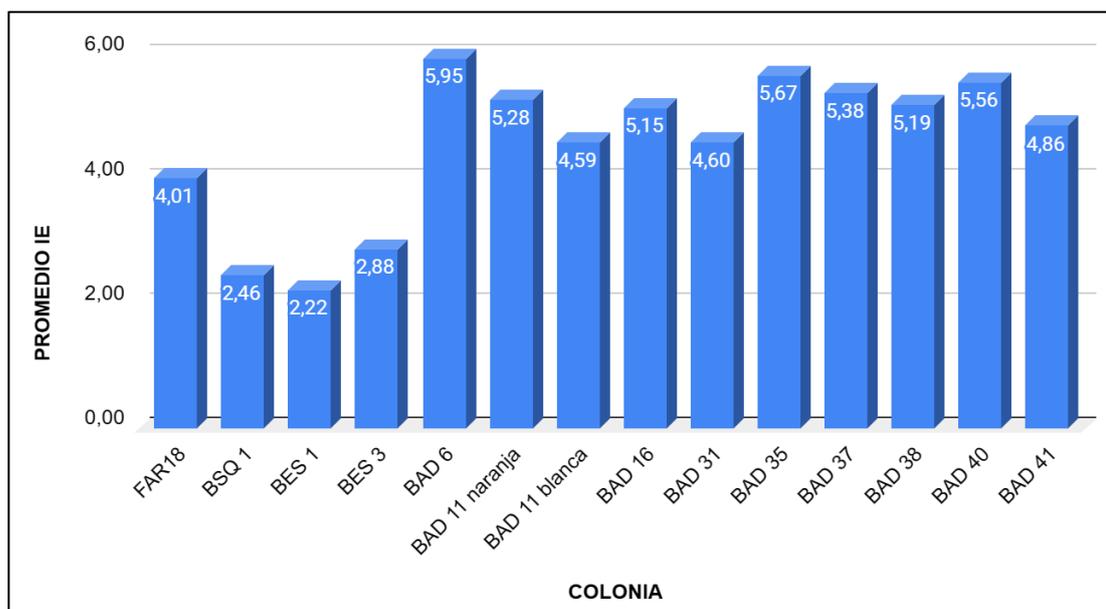
Fotografía 7 - Resultado positivo para actividad enzimática de proteasa.



FUENTE: AUTORA, 2023.

Después de cuatro días de incubación, fue medido el índice enzimático (IE), teniendo en cuenta la ecuación de la figura 3, la cual expresa la relación entre el diámetro de la colonia (DC) y el diámetro del halo de hidrólisis (DH) medidos en mm. A continuación se muestran los aislados cuyos índices enzimáticos fueron superiores de dos (>2):

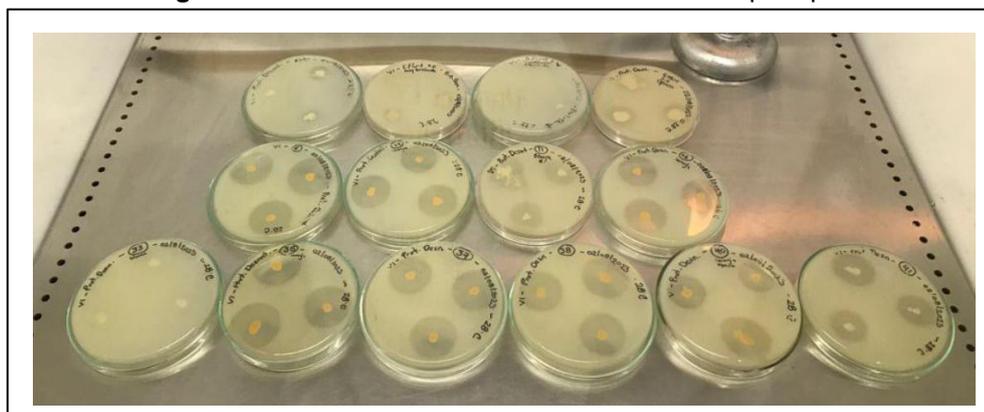
Gráfico 1 - Promedio de Índice Enzimático para Proteasa (Primera medición)



Fuente – Autora, (2023).

Con esa primera medición de la actividad enzimática se determinó que BAD6 posee el mayor índice enzimático para proteasa. Lo que lo convierte en el primer candidato para los ensayos con los efluentes de las industrias queseras y el efluente de la Sooro. Existen más candidatos que le siguen a BAD6 (IE = 5.94) en cuando mejor IE, sin embargo, se escogió la BAD41 (IE = 4.85) por su diferencial morfológico de las otras colonias (principalmente su color blanco), pues fueron necesarias otras pruebas para confirmar y/o descartar contaminación cruzada y repetición de colonias entre los códigos. Siendo las BAD's '6, 11 naranja, 16, 31, 35, 37, 38 y 40' similares en su morfología macroscópica y actividad enzimática, como se muestra a continuación:

Fotografía 8 - Resultados de la actividad enzimática para proteasa.



FUENTE: Autora, 2023.

El medio NA enriquecido para la medición de actividad enzimática se convirtió en una herramienta fundamental y valiosa para este estudio, desde su versión original hasta las variaciones hechas en esta investigación, en cuanto pH y composición. Estas variaciones en el medio de cultivo permitieron evaluar la actividad enzimática y los efectos de los diferentes componentes en la degradación de los sustratos, así como en el trabajo de López Almeida y Soria Noroña (2018), donde se llevaron a cabo pruebas enzimáticas lipolíticas y proteolíticas de degradación en medios con PCA (Agar de Papa y Carne) combinado con diferentes sustancias: leche descremada, mantequilla y aceite de oliva.

Pensando en los ensayos con proteasa, donde se adiciona leche desnatada, surgió la idea de usar otras fuentes de proteína, como los propios efluentes de suero y de la industria Sooro. Para comprobar esto, se hicieron medios NA con 10% de efluente, posteriormente fueron inoculados y luego de 4 días se midió el IE.

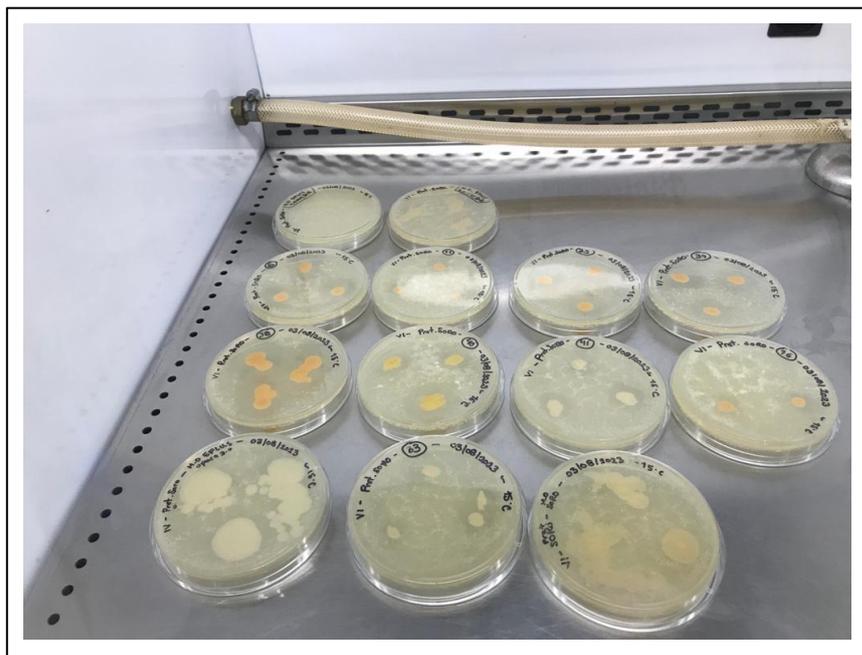
Fotografía 9 - BAD's 37 y 40 inoculadas a 15°C en Medio NA con adición de 10% de efluente de suero de leche de las industrias Queseras.



FUENTE: Autora, 2023.

En el caso de NA con suero de leche, pudieron observarse y medirse halos de actividad enzimática, como observado en la fotografía anterior. Lo contrario sucedió con las placas con medio NA y 10% de efluente de la industria SOORO, pues el contraste del medio con los halos no estaba tan diferenciado, por lo que se aplicaron diversas técnicas que permitieran una mejor visualización de los halos.

Fotografía 10 - BAD's inoculadas a 15°C en Medio NA con adición de 10% de efluente de suero de leche de las industrias Queseras.



FUENTE: Autora, 2023.

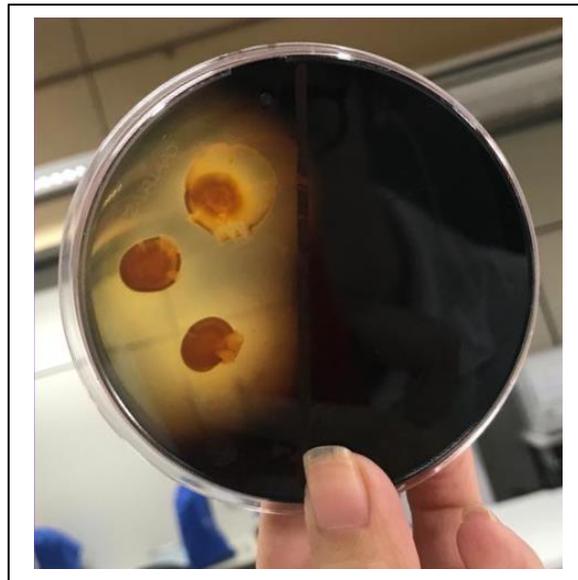
Se observó que en el medio enriquecido con efluente de suero de leche, los microorganismos nativos de los efluentes de las industrias queseras y de la SOORO crecieron exponencialmente en mayor medida que las bacterias antárticas. En particular, la BAD38 se identificó como la BAD con mayor biomasa, a diferencia de su crecimiento en medio NA con leche desnatada. Dichos resultados sugieren que el efluente de suero de leche puede ser una fuente valiosa de nutrientes para el crecimiento microbiano y cuando adicionado a medio NA permite el acompañamiento de la actividad proteolítica en medio sólido, lo que resulta en una técnica fácil y económica; así, parece prometedor el uso de los propios efluentes como aditivos en ese tipo de ensayos, lo que ayudaría a la planeación del diseño experimental y a prever con mayor especificidad los resultados para cada tipo de muestra problema.

Este experimento aún necesita ser perfeccionado considerando aspectos como saber la concentración real de efluente que se está agregando, esterilización de los efluentes sin alterar su composición, estandarización e interpretación de resultados (los cuales pueden variar según las condiciones y otros componentes de la muestra).

- **Amilasa:**

Se realizó la selección de aislados productores de amilasa en base a la presencia de halo de decoloración que fue fácilmente observada después de adiciones la solución de yodo sobre la superficie de la placa. Esa solución de yodo se combina con el almidón presente en la placa para formar un complejo azul-negro. Si una colonia produce amilasa, hidroliza el almidón presente en la placa, lo que resulta en una zona/halo translúcido alrededor de la colonia. La zona clara (casi transparente) se debe a la falta de almidón, que se ha hidrolizado por la amilasa producida por la colonia.

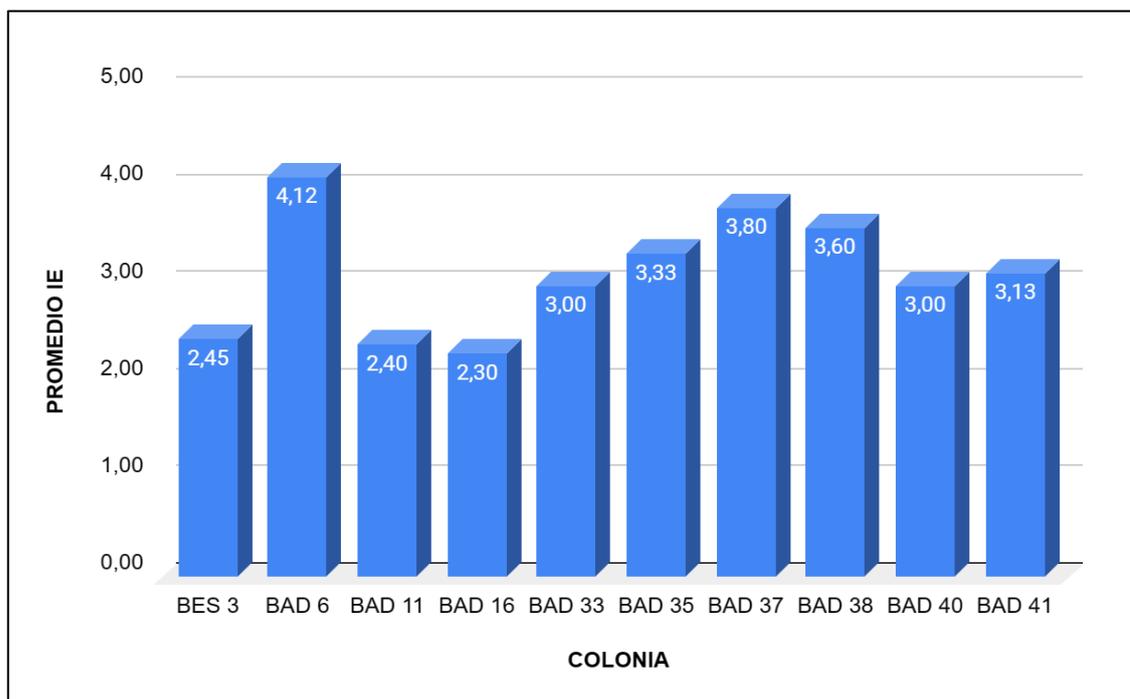
Fotografía 11 - Actividad enzimática de amilasa. A la izquierda de la placa, resultado positivo. En la parte derecha de la placa, el resultado es negativo.



FUENTE: AUTORA, 2023.

En este primer ensayo enzimático de amilasa, también se determinó que BAD6 (IE=4.12) posee el mayor índice enzimático. Lo que lo convierte en el primer candidato para los ensayos con los efluentes de la industria cervecera. El segundo mejor IE, corresponde a la BAD37 (IE=3,80). Así, las BADs 6 y 37, junto con el hongo FAR18 constituyen el consorcio para tratamiento de efluente cervecero.

Gráfico 2 - Promedio de Índice Enzimático para Amilasa (Primera medición)



Fuente – Autora (2023).

Cuadro 2 - Resultado de actividad enzimática

BAD	1	6	7	8	9	11	12	16	31	33	35	37	38	40	41
Amilasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Proteasa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Fuente: Autora, (2023)

5.3 Relación de temperatura y pH en la producción enzimática y biomasa

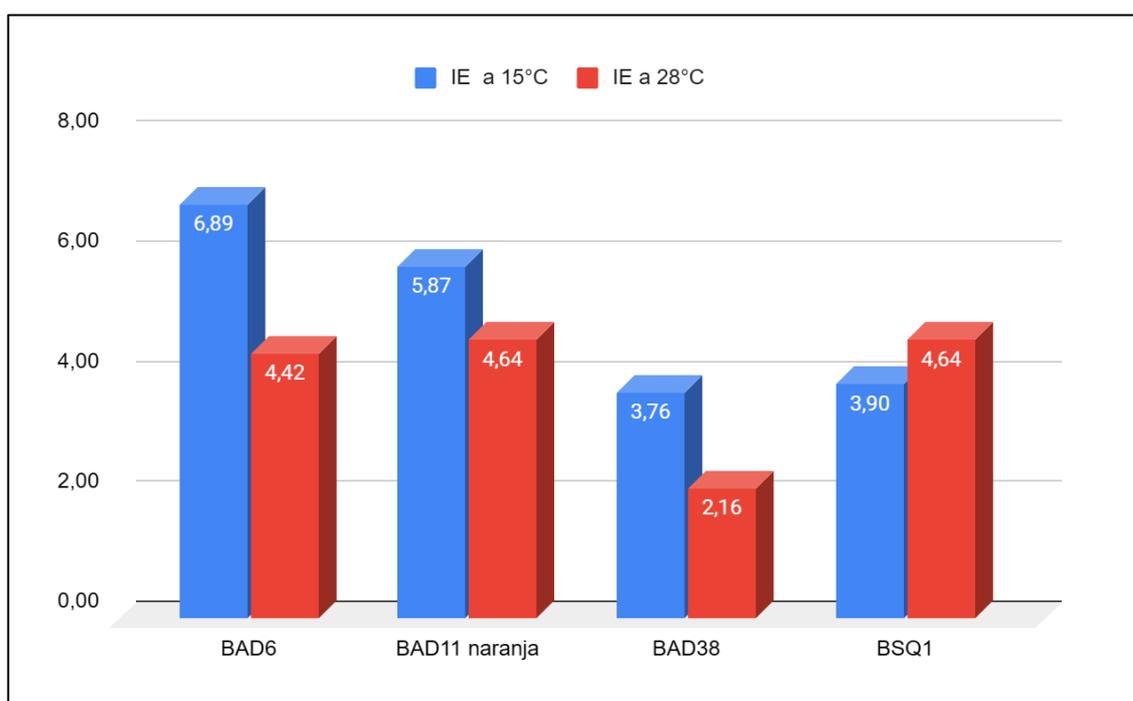
Los autores, Podar y Reysenbach (2006), explican que aquellas enzimas que tienen una actividad óptima en temperaturas y pH extremos son ampliamente empleadas en detergentes domésticos y múltiples industrias, ya sea de alimentos, textil, de pulpa y papel, procesamiento de cuero y por supuesto, química. Sin embargo, las enzimas deben cumplir numerosos requisitos relacionados con características como la actividad y la estabilidad, la especificidad del sustrato y la

enantioselectividad. Esos requisitos pueden variar de una aplicación para otra, por ello, este trabajo profundiza en la evaluación de las enzimas proteasa y amilasa en el potencial de degradar materia orgánica presente en efluentes industriales cerveceros y de suero de leche, además de realizar algunas pruebas preliminares variando los factores de pH y temperatura observando la variabilidad de la actividad enzimática.

5.3.1 Relación de temperatura en la producción enzimática proteolítica.

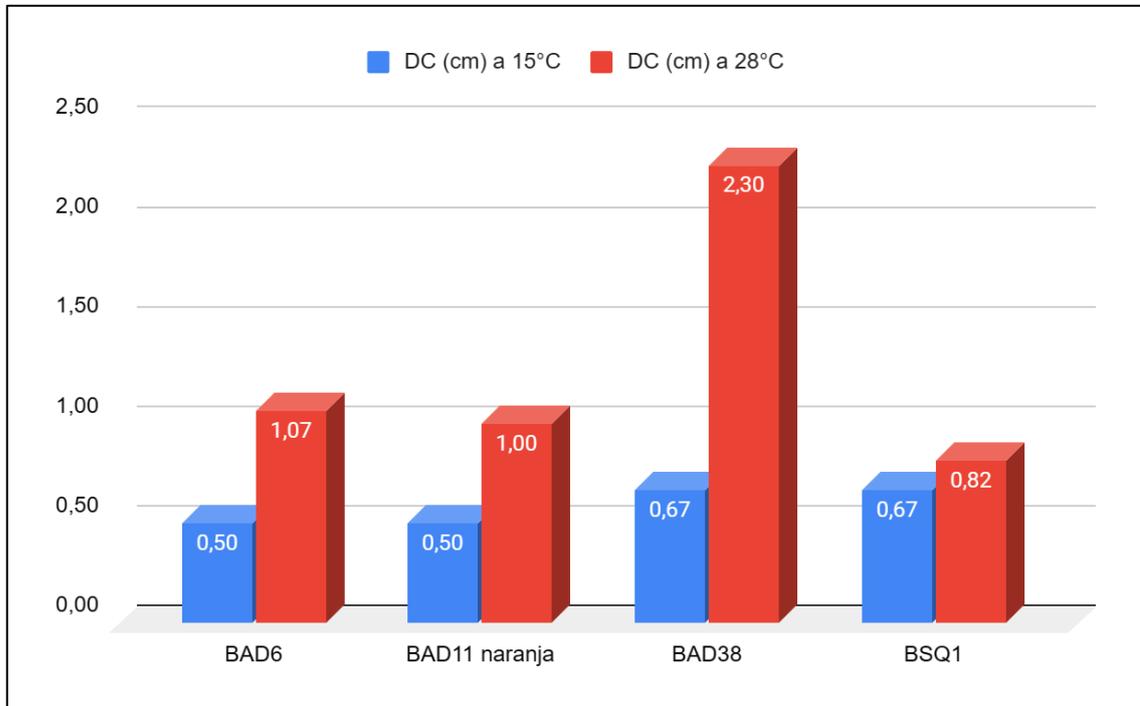
Las bacterias fueron sembradas en medio NA con skim milk 10% e incubadas en una BOD a 15°C y un shaker con un rango de temperatura entre 28°C y 33,3°C. Al cabo de 4 días fueron calculados los IE's y se determinó que las bacterias antárticas poseen mayor actividad enzimática a 15°C y mayor producción de biomasa a ≈28°C, en este caso se considera como biomasa el tamaño o DC (Diámetro de la Colonia) medido en centímetros. Con este ensayo se constató que las cepas antárticas pueden ser categorizadas como 'Psicrófilas facultativas o Psicrotolerantes'. Las colonias BSQ1 (Bacteria 1 del Suero de Queserías) son mesófilas, mostrando mayor actividad enzimática y producción de biomasa a ≈28°C.

Gráfico 3 - Relación de temperatura en el Índice Enzimático (Proteasa)



Fuente – Autora (2023).

Gráfico 4 - Relación de temperatura y biomasa (en Medio NA+skim milk 10%)



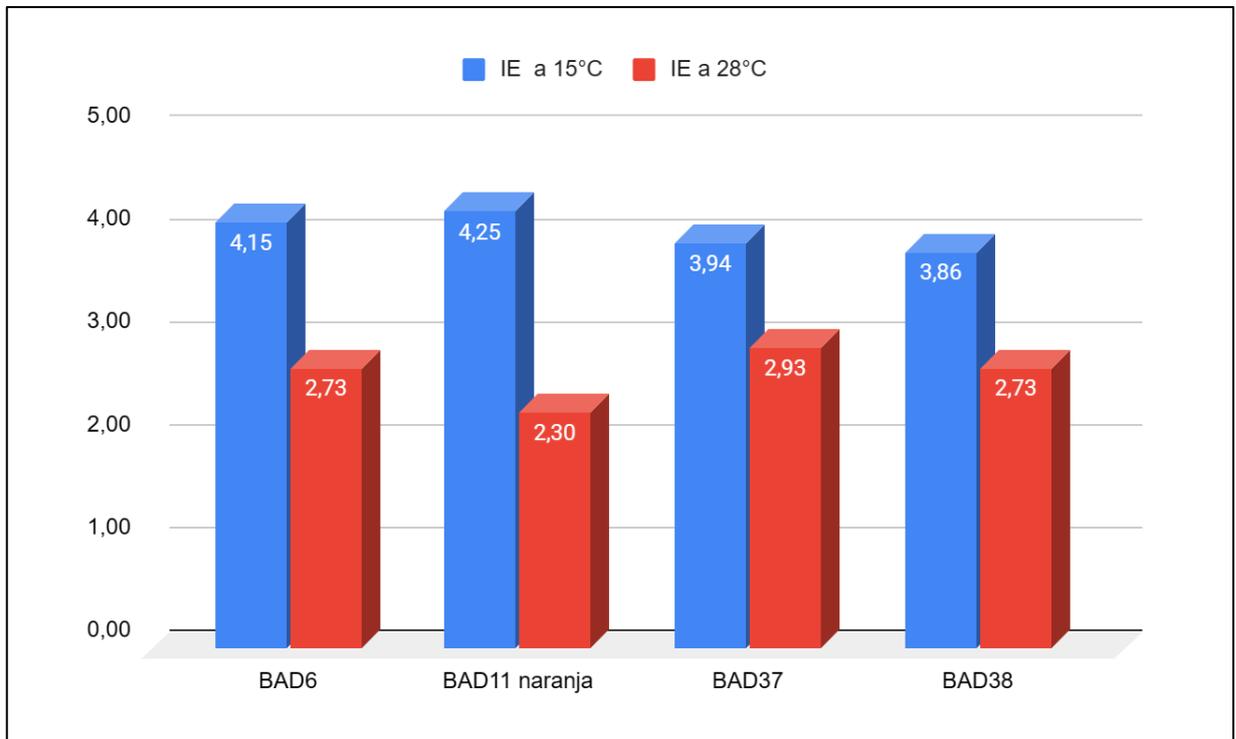
Fuente – Autora (2023).

5.3.2 Relación de temperatura en la producción enzimática amilolítica.

Las bacterias fueron sembradas en medio NA con adición de almidón al 1% e incubadas en una BOD a 15°C y un shaker con un rango de temperatura entre 28°C y 33,3°C. Al cabo de 4 días fueron calculados los IE's y en este caso, también se determinó que las bacterias antárticas poseen mayor actividad enzimática a 15°C y mayor producción de biomasa a ≈28°C, considerándose biomasa como el tamaño o DC (Diámetro de la Colonia) medido en centímetros.

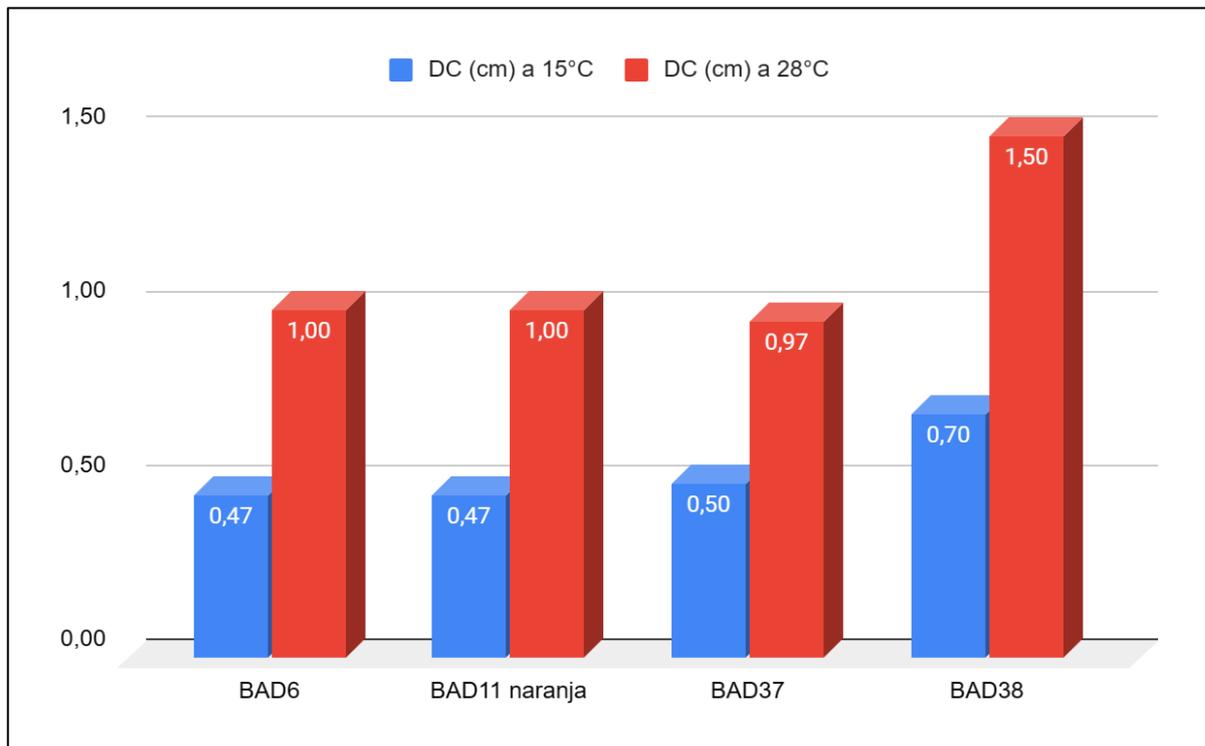
Con este ensayo nuevamente se certificó que las cepas antárticas (BAD) pueden ser categorizadas como 'Psicrófilas facultativas o Psicrotolerantes'.

Gráfico 5 - Relación de temperatura en el Índice Enzimático (Amilasa)



Fuente – Autora (2023).

Gráfico 6 - Relación de temperatura y biomasa (en medio 'NA+almidón 1%')



Fuente – Autora (2023).

5.3.3 Relación del pH en la producción enzimática amilolítica.

Tradicionalmente, la actividad enzimática era medida en un medio de NA con almidón al 1% en un pH neutro $\approx 6,9$ (pH óptimo para producción de amilasa). Sin embargo, dicho pH puede no ser el óptimo y aplicable para todos los organismos y/o generación de las enzimas. Un ejemplo de esto es el ensayo de respuesta a diversos pH realizado con BAD6.

Cuando se somete a BAD6 a pH's ácidos, limita su crecimiento y actividad enzimática. Es en los pH 8, 9 y 10 donde se observó mayor actividad amilolítica, siendo en pH 10 el máximo IE registrado de 4,75 y mayor diámetro de la colonia en pH 9 con 0,7 cm (pH óptimo para producción de biomasa). Con base en esto, se determinó que el aislado BAD6 es un microorganismo alcalófilo o basófilo, que produce más amilasa en medios alcalinos, lo que sin duda, es un hallazgo interesante y genera expectativa sobre los ensayos de este tipo que pueden hacerse con todas las BAD's y lo que aún falta por conocer.

Tabla 1 - Relación de enzimática para

pH y actividad BAD6

BAD 6 a 15°C		
pH	IE	MÉDIA DEL IE
8	3,80	3,80
	3,67	
	4,00	
9	3,86	3,76
	3,71	
	3,71	
10	4,75	4,75
	5,00	
	4,50	

Fuente: Autora,

(2023)

En los cuadernos de cátedra de las autoras Labandera y Malarczuk (2019), es

mencionado el rol importante de las enzimas durante las reacciones químicas en los organismos vivos, presentando grupos químicos ionizables en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Estos grupos, como los carboxilos (COOH), amino (NH₂), tiol (SH) e imidazol, pueden adquirir carga eléctrica positiva, negativa o neutra según el pH del entorno. La conformación proteica, íntimamente ligada a la actividad catalítica, está influenciada por estas cargas eléctricas. Así, existe un pH óptimo en el cual la enzima adopta su estructura más adecuada para catalizar reacciones. Pequeñas desviaciones alrededor de este pH óptimo pueden tener efectos drásticos en la actividad enzimática.

5.4 Caracterización microbiológica de aislados con actividad enzimática.

- Caracterización macro y microscópica de las bacterias procedentes de la Isla Deception, Antártica.

Esa descripción es preliminar, correspondiente los primeros inóculos después de la reactivación y visualización en lámina superior a 2 semanas, pues fue en ese tiempo que empezaban a detectarse macroscópicamente la presencia de más de un tipo de colonia bacteriana por placa, dado tiempo de aumentar la densidad poblacional y así facilitar la lectura en lámina.

Cuadro 3. Caracterización macro y microscópica de las bacterias (BAD)

BAD	CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA	CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA
1	Color: naranja con brillo Forma: Irregular Elevación: plana o aplastada Borde: Lobulado	cocos/ diplococos gram +
6	Color: naranja con mucho brillo Forma: Circular Elevación: Elevada Borde: Predominantemente entero o continuo, algunas zonas con leves ondulaciones	Predominancia de cocos gram + Aparición esporádica de Bacilos Gram+
7a	Color: crema	Predominancia de cocos/diplococos

	Forma: Irregular Elevación: Plana o aplastada Borde: Lobulado	Gram+ Aparición esporádica de Bacilos y Estreptobacilos Gram+
8a	Color: Naranja en el centro con degrade a amarillo hacia afuera Forma: circular Elevación: plana o aplastada Borde: entero o continuo	Cocos/Diplococos Gram+
9a	Color: Crema brillante y más claro en la periferia Forma: irregular Elevación: umbilicada Borde: Ondulado	Predominancia de Cocos Gram +, seguido de diplococos Gram + Aparición esporádica de Estreptococo Gram+
11 blanco	Color: Marrón en el centro y blanco o crema en la periferia Forma: Irregular Elevación: plana o aplastada Borde: lobulado	Predominancia de Filamentos e Estreptococo gram +
11 naranja	Color: Naranja con degradado a blanco hacia los bordes y brillo moderado Forma: Circular Elevación: Plana o aplastada, pero con una diminuta prominencia en el centro Borde: Ondulado	Predominancia de diplococos gram + Aparición muy esporádica de Filamentos y sacacorchos Gram+
12.1	Color: Amarilla opaca Forma: Circular Elevación: Mamelonada Borde: Ondulado	Sarcina/tetrade gram -
12.2	Color: Blanca brillante Forma: Puntiforme Elevación: Elevada Borde: Ondulado	cocos/ diplococos gram+
12.3	Color: Blanca Forma: Puntiforme Elevación: Elevada Borde: Continuo	Predominancia de cocos gram + <diplococos gram+ Aparición esporádica de Estreptococo

		Gram+
16	Color: Naranja con degradado a blanco hacia los bordes y brillo moderado Forma: Circular Elevación: Plana o aplastada, pero con una diminuta prominencia en el centro Borde: Ondulado	Predominancia de diplococos gram + Aparición muy esporádica de Filamentos Gram+ Visualización de un streptobacilo
31.1	Color: crema Forma: circular Elevación: plana o aplastada Borde: Entero o continuo	Predominancia de diplococos gram + (podrían ser diplococos encapsulados) Aparición muy esporádica de Filamentos Gram+ Visualización de un streptobacilo
31.2	Color: naranja con mucho brillo Forma: Circular Elevación: Elevada Borde: Entero o continuo	
33	Color: Blanca crema brillante Forma: Circular Elevación: Plana Borde: Ondulado	Difícil lectura de lámina por el tamaño del microorganismo, aparentemente hay cocos Aparición de Filamentos Gram+
35	Color: Naranja con degradado a blanco hacia los bordes y brillo moderado Forma: Circular Elevación: Plana o aplastada, pero con una diminuta prominencia en el centro Borde: Ondulado	Predominancia de diplococos gram + Aparición esporádica de Filamentos Gram+
37	Color: Naranja con degradado a blanco hacia los bordes y brillo moderado Forma: Circular Elevación: Plana o aplastada, pero con una diminuta prominencia en el centro Borde: Ondulado	Predominancia de diplococos gram + Aparición esporádica de Filamentos Gram+

38	Color: Naranja con poquísimo degradado a blanco hacia los bordes y brillo moderado Forma: Circular y rizoide Elevación: Plana o aplastada, pero con una diminuta prominencia en el centro Borde: Ondulado	Predominancia de diplococos /<cocos gram + Aparición esporádica de Filamentos Gram+
40.1	Color: Amarillo pastel claro Forma: circular (con ondulación) Elevación: plana o aplastada Borde: ondulado	Predominancia de cocos/<diplococos gram + Aparición esporádica de Filamentos Gram+
40.2	Color: Naranja con poquísimo degradado a blanco hacia los bordes y brillo moderado a intenso Forma: Circular (con ondulación) Elevación: Plana o aplastada Borde: Ondulado	Predominancia de diplococos gram + Aparición esporádica de Filamentos Gram+
40.3	Color: Amarillo translucido con degradado a crema Forma: Circular (con ondulación) Elevación: Plana o aplastada Borde: Ondulado	Predominancia de cocos gram + Aparición de Filamentos Gram+
41	Color: Centro café con degrade a beige, opaco Forma: Circular Elevación: Plana Borde: Ondulado	Predominancia de diplobacilos gram + Aparición de esporádica de otras estructuras como cocos Gram+

Fuente: Autora, (2023)

En esta etapa se observó no sólo la variabilidad entre colonias, sino también sus cambios en el tiempo. Rojas (2011), también advierte que la morfología de las colonias puede cambiar a lo largo del tiempo, dependiendo de la composición del cultivo, factores como humedad o desecación, etc.

Se puede resaltar la gran diversidad de morfologías visualizadas en las muestras estudiadas, esto es sólo la punta del iceberg de lo que podría encontrarse en la zona de colecta y por ende en el continente antártico. Podría inferirse que hay

un enorme potencial biotecnológico aguardando por ser descubierto y sobre todo, conservado.

Hasta hace poco, los sedimentos de las profundidades marinas se consideraban desprovistos de vida, pero se ha hecho evidente que en realidad contienen una población microbiana significativa y desconocida, que ha sido difícil de estudiar debido a los desafíos del muestreo y cultivo. Los psicrófilos, por ejemplo, son microorganismos capaces de vivir en condiciones de baja temperatura, como suelos helados y aguas residuales, llamando la atención por sus características inusuales. Entre sus capacidades destaca la posibilidad de biorremediación en suelos fríos y aguas contaminadas, tal y como afirma el estudio de Kumar *et al.*, (2019).

Sorprende el hecho de saber que en nuestro planeta existen organismos tan diminutos con grandes habilidades para sobrevivir en ambientes inhóspitos gracias a su genoma (Arce *et al.*, 2017). Además, sus biomoléculas, principalmente proteínas y enzimas que exhiben una alta actividad catalítica y distintas propiedades termolábiles, son útiles en diversos campos, como la biología molecular, la investigación médica, las tecnologías industriales para la nutrición humana o animal, los detergentes y los cosméticos (Kumar *et al.*, 2019).

Cuadro 4. Caracterización de las colonias aisladas.

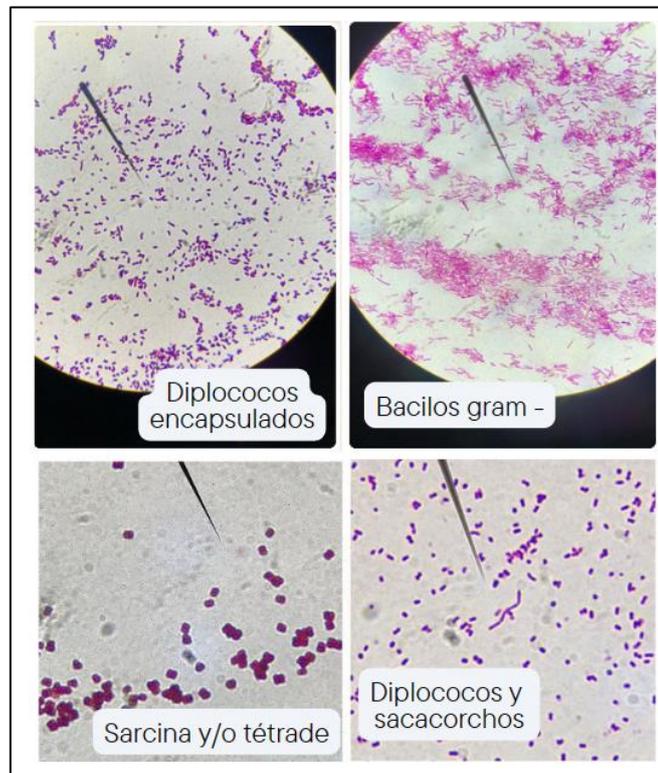
COLONIA	CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA	CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA
BES 1	Color: Beige brillante Forma: Circular Elevación: Plana Borde: Continuo	cocobacilos gram+
BES 2	Color: Amarillo con degrade hacia blanco Forma: Circular Elevación: Plana Borde: Ondulado	Bacilos Gram - Eventualmente visualización de otro tipo de estructuras sin clasificación.
BES 3 (15 °C)	Color: Blanco opaco rodeado de otras dos capas más transparentes en el mismo formato Forma: Circular	Cocos, bacilos, diplobacilos gram + cocos gram -

	Elevación: Plana Borde: Ondulado	Barra alargada diplobacilos, bacilos gram+
BES 3 (28 °C)	Color: Beige opaco Forma: Filamentosa Elevación: Plana Borde: Lobulado	cocos gram + , quizá algunos gram -
BSQ	Color: Amarillo claro con Degradado a Blanco Forma: Filamentosa Elevación: Plana Borde: Lobulado	Bacilos, diplococos, filamentos gram + Estreptobacilos Estructuras minúsculas que aparentemente son diplococos gram -

Fuente: Autora, 2023.

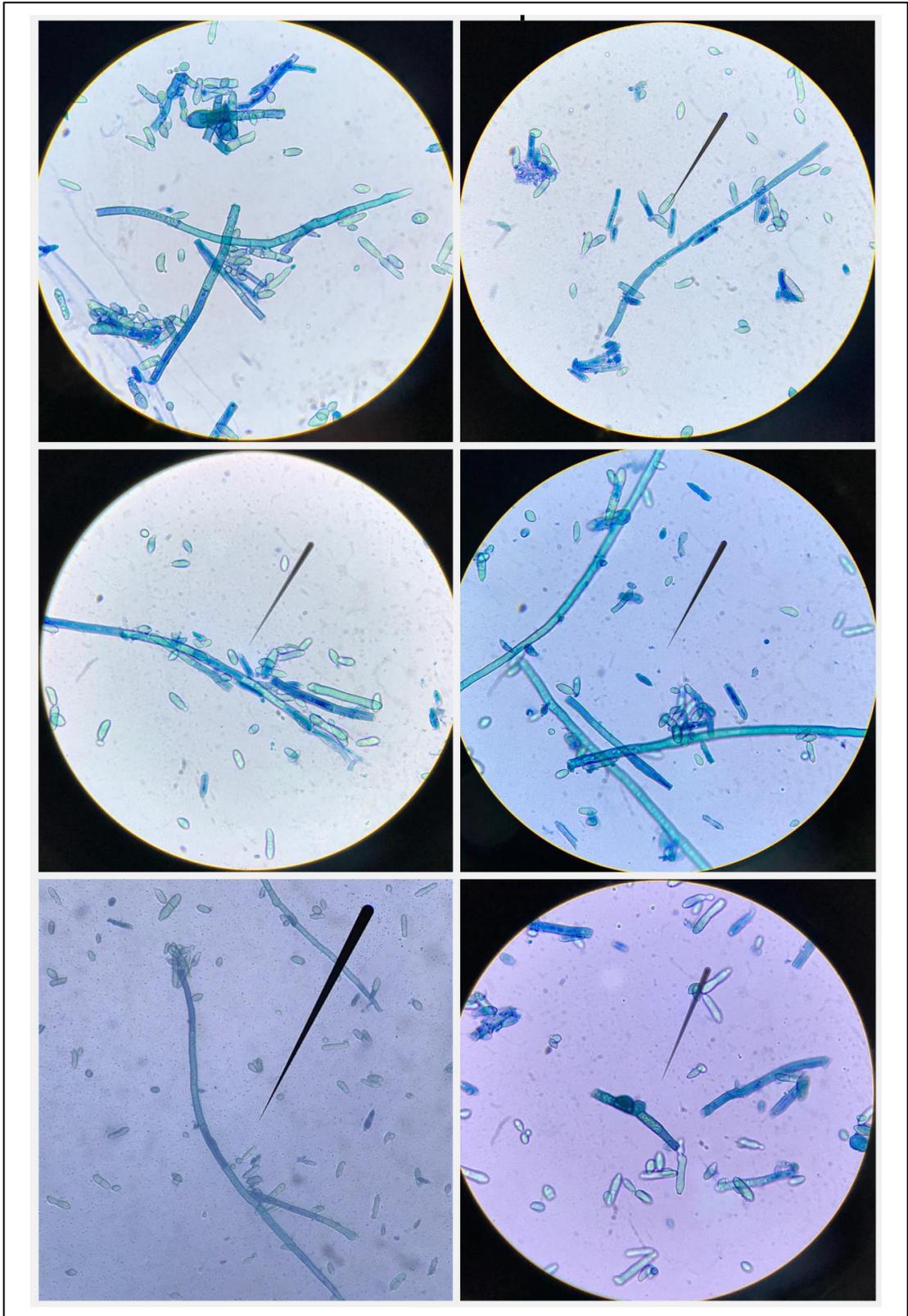
A continuación, pueden observarse algunas de las morfologías observadas en el objetivo 100x durante la caracterización:

Figura 5 - Algunas de las morfologías microscópicas encontradas.



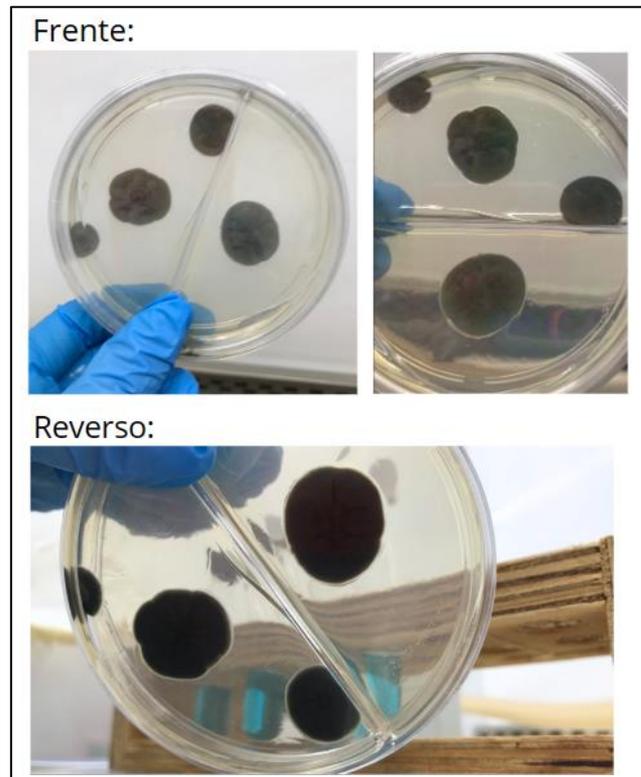
FUENTE: AUTORA, 2023.

Figura 6 - Morfología microscópica de FAR18.



FUENTE: AUTORA, 2023.

Figura 7 - Morfología macroscópica de FAR18.

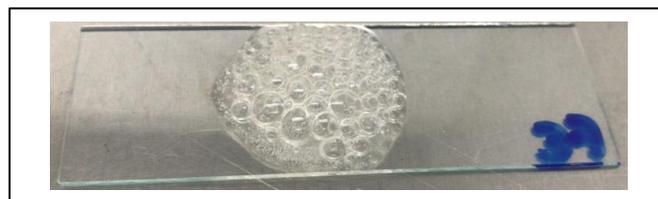


FUENTE: AUTORA, 2023.

- Prueba Catalasa

Teniendo en cuenta la metodología de Rojas (2011), pudo ser determinada la presencia de catalasa (CAT) mediante la técnica del peróxido de hidrógeno 10 vol. En el apéndice A, se muestra la evaluación cualitativa de la CAT, siendo '+' para describir poca actividad, '++' para actividad moderada y '+++' para alta actividad.

Fotografía 12 - Lámina con la prueba catalasa positiva; observar la formación de efervescencia del inóculo microbiano emulsionado con Peróxido de Hidrógeno 3% 10 vol.



FUENTE: AUTORA, 2023.

5.5 Elección y colecta de efluentes industriales.

Teniendo en cuenta los ensayos anteriores y principalmente la actividad exoenzimática en las pruebas de 'caseína' en skim milk e 'hidrólisis de almidón', fueron seleccionados y recolectados efluentes de tres tipos de industrias alimentarias.

5.5.1 Suero de leche proveniente de la Industria Quesera y efluente de la industria Sooro Renner.

Para el caso de las proteasas, su producción enzimática indica su utilización en la degradación de compuestos típicamente proteicos, como sangre y leche; por ello fueron evaluados consorcios en efluentes provenientes de la industria quesera y del aprovechamiento del suero de leche, ambos suministrados por la empresa 'Sooro Renner'.

5.5.2 Efluente de la industria cervecera '277 Craft Beer'.

Por otra parte, las amilasas descomponen (hidrolizan) el almidón contenido en diversas muestras, como en las colectadas de la empresa '277 Craft Beer', pues la malta usada en la producción de cerveza puede contener en torno de 60% de almidón.

Se aplicó la prueba del yodo al mosto para comprobar si hubo sacarificación del almidón durante el proceso de maceración, es decir, si el almidón se desdobló en azúcares simples (SÁNCHEZ *et al.*, 2019). En la siguiente fotografía, pueden observarse tres tubos de ensayos conteniendo efluente cervecero filtrado al vacío y esterilizado, observarse de izquierda para derecha, en el primer tubo se encuentra la muestra sin adición de lugol, en el segundo tubo se encuentra la muestra del primer hervor con adición de lugol y en el tercer tubo se encuentra muestra de efluente cervecero después del segundo hervor y con adición de lugol con una coloración de violeta intenso.

Fotografía 13 - Prueba Lugol en efluente cervecero filtrado y esterilizado.



FUENTE: AUTORA, 2023.

Parámetros fisicoquímicos como concentración, pH y temperatura, son factores importantes que influyen en la eficiencia de las α -amilasas en sus diversas aplicaciones. El estudio de Vedia *et al.* (2019), muestra cómo estos parámetros están relacionados entre sí. Además, ha demostrado que el pH es el parámetro más importante para lograr la eficiencia máxima de la enzima. Por ello, se llevó un control del pH de las diversas muestras problema utilizadas.

Tabla 2. Control del pH de las muestras

Muestra	pH inicial
Suero de las industrias Queseras	5.5
Efluente da SOORO RENNER	4.5
Segundo hervor de la cerveza Pilsen '277 Craft Beer'	5.3

Fuente: Autora, 2023.

También se realizó un aislamiento y caracterización microbiológica de todas las muestras colectadas, pues eso ayudaría a predecir en parte, si la aplicación del consorcio escogido tendría buenos resultados interaccionando con la microbiota propia de los efluentes.

5.6 Potencial de consorcios elegidos para tolerar y degradar materia orgánica presente en efluentes industriales cerveceros y de suero de leche.

Diversos estudios demuestran que los microorganismos autóctonos degradan con mayor facilidad los contaminantes locales, que los provenientes de otras regiones (TORRES *et al.* 2016). Así, uno de los mayores cuestionamientos en lo que concierne a este trabajo, es cuál tratamiento sería el más adecuado para tratar los efluentes. ¿Serán los microorganismos antárticos los mejores degradadores por sus características y cualidades únicas?, ¿los organismos nativos podrían estar más adaptados a las condiciones del efluente? o inclusive, ¿la interacción entre los nativos y los antárticos podría generar mejores resultados?

5.6.1 Consorcio para el Suero de leche proveniente de la Industria Quesera

Se llevó a cabo en el ensayo con efluente de suero de leche para la temperatura de 28°C y 15°C. La lectura por espectrofotometría fue realizada al tercer, quinto, séptimo y al quinceavo día, sin embargo se recomienda encontrar otros protocolos para mejor análisis. A partir del tercer día se observó mayor decoloración cualitativa por parte de los microorganismos NATIVOS 'BSQ', acentuándose aún más pasados quince días. Con respecto a los microorganismos antárticos, la BAD41 proliferó más que BAD6, formando una biopelícula en la superficie del efluente, FAR18 parece haber sido inhibida en su crecimiento.

La degradación de este tipo de efluente fue observada en un espectro de diversos comprimentos de onda. Siendo uno de ellos 310nm, donde la absorbancia del control era de 1,76UA y la degradación por el consorcio A generó 1,20UA. Consiguiendo un porcentaje de decoloración del **31,82%** para el día tercer día a 15°C. Los microorganismos nativos obtuvieron una absorbancia de 1,08UA generando la decoloración del **38,64%**. Valores similares fueron observados para longitudes cercanas como 300nm y 320nm.

Fotografía 14 - Ensayo con Suero de leche proveniente de la Industria Quesera al tercer día.



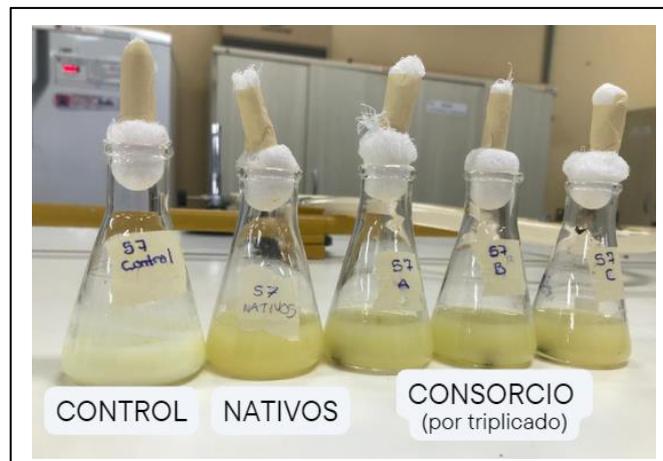
FUENTE: AUTORA, 2023.

Fotografía 15 - Ensayo con Suero de leche proveniente de la Industria Quesera al quinto día.



FUENTE: AUTORA, 2023.

Fotografía 16 - Ensayo con Suero de leche proveniente de la Industria Quesera al séptimo día.



FUENTE: AUTORA, 2023.

Fotografía 17 - Ensayo con Suero de leche proveniente de la Industria Quesera pasados quince días.

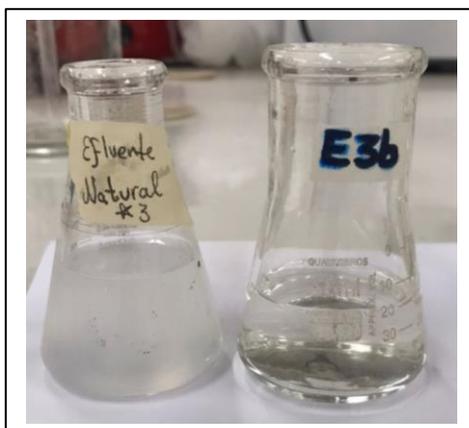


FUENTE: AUTORA, 2023.

5.6.2 Consorcio para el efluente de la industria Sooro Renner.

Se llevó a cabo en el ensayo con efluente de la SOORO RENNER en la temperatura de 28°C. La lectura por espectrofotometría fue realizada al tercer, quinto, séptimo y al quinceavo. En el tercer y quinto día se observó mayor decoloración por parte del consorcio con los microorganismos ANTÁRTICOS: BAD6, BAD41, FAR18. En este caso, fue el hongo *Cladosporium* sp. quien aumentó sustancialmente su biomasa en el transcurso del experimento.

Fotografía 18 - Ensayo con Efluente de la Industria Sooro, tercer día. Control del Efluente (Izquierda) VS degradación por consorcio (derecha).



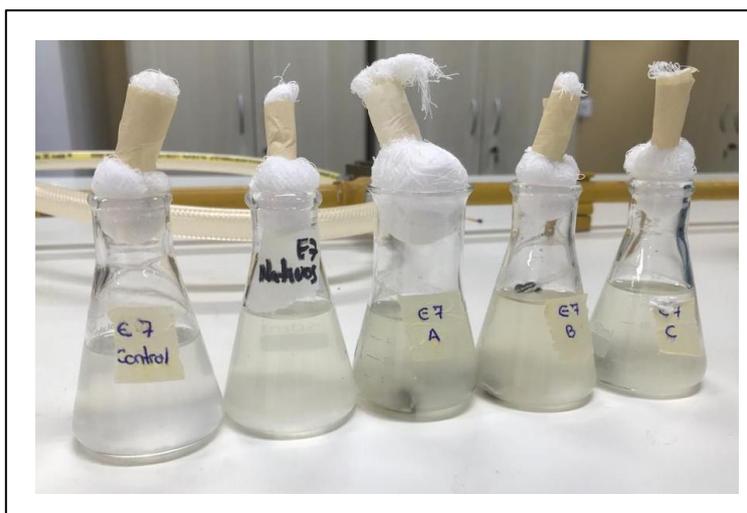
FUENTE: AUTORA, 2023.

Fotografía 19 - Ensayo con Efluente de la Industria Sooro, quinto día.



FUENTE: AUTORA, 2023.

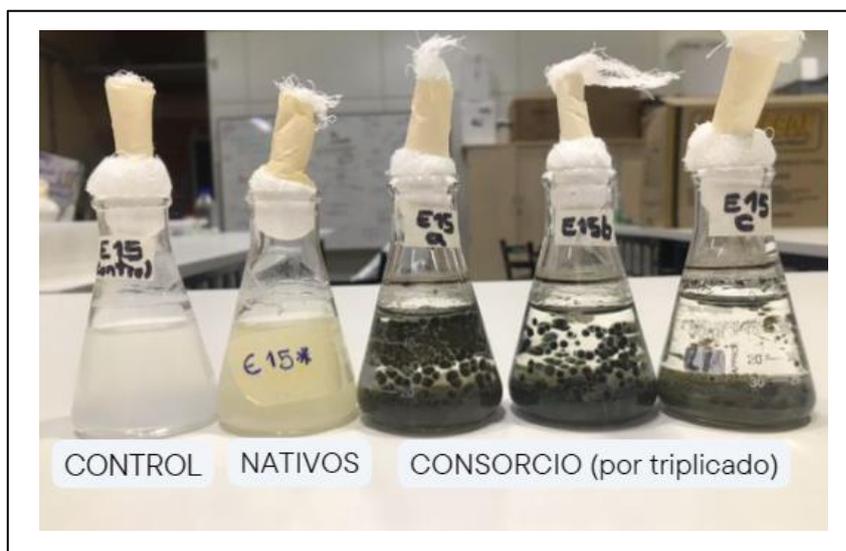
Fotografía 20 - Ensayo con Efluente de la Industria Sooro, séptimo día.



FUENTE: AUTORA, 2023.

La degradación de este tipo de efluente fue observada en un espectro de diversos comprimentos de onda. Siendo uno de ellos 287nm, donde la absorbancia del control era de 2,57UA y la degradación por el consorcio generó 0,52UA. Consiguiendo un porcentaje de decoloración del **79,77%** para el día 15.

Fotografía 21 - Ensayo con Efluente de la Industria Sooro, decimoquinto día.



FUENTE: AUTORA, 2023.

5.6.3 Consorcio del efluente de la industria cervecera '277 Craft Beer'.

Considerando la prueba de lugol en los efluentes cerveceros y las características de la muestra, se decidió hacer un ensayo de degradación con las muestras correspondientes al efluente de la segunda fervura, sobre las temperaturas de 15°C y 28°C, 140 rpm, con toma de resultados al cuarto y séptimo día conforme disponibilidad de espacios e instrumentos.

Fotografía 22 - Muestras filtradas del efluente '277 Craft Beer' después del ensayo de 4 días. Siguiendo el orden de izquierda a derecha, están: control; BCB (nativos); BCB



FUENTE: AUTORA, 2023.

La degradación de este tipo de efluente fue observada en un espectro de diversos comprimentos de onda. Siendo uno de ellos 310nm, donde la absorbancia del control era de 2,04UA y la degradación generada en los diversos tratamientos se muestra a seguir.

Tabla 2. Control del pH y %decoloración para cada tratamiento en el ensayo de 4 días a 28°C

Tratamiento	Decoloración (%)	pH
Nativos	97,55	5,49
Nativo + Ant	99,51	4,93
Ant A	99,51	4,66
Ant B	99,02	4,8
Ant C	92,65	5,01/5,30

Fuente: Autora, 2023.

6. CONSIDERACIONES FINALES

Luego de completar la investigación sobre el análisis de microorganismos antárticos y su aplicación para la biodegradación de materia orgánica y la producción de amilasas y proteasa, podemos resaltar que se logró el objetivo de evaluar el potencial de microorganismos seleccionados para tolerar y/o degradar proteínas y almidón encontrados en muestras colectadas.

Se consiguió reactivar con éxito la mayoría de los microorganismos conservados, implementando diversas técnicas de microbiología y se identificaron acciones o estrategias para la optimización de dicha etapa.

Con los ensayos de actividad enzimática se identificó al aislado BAD6 como el organismo con mayor índice Enzimático (IE) en la producción de proteasas y amilasas, cuya aplicación puede extenderse más allá del área ambiental.

En los ensayos de temperatura, con incubación a 28°C o inclusive 33.3°C (máxima oscilación observada) se constató la presencia de cepas antárticas categorizadas como 'Psicrófilas facultativas o Psicrotolerantes'. Sin embargo, cabe resaltar que dichas temperaturas favorecen el crecimiento celular y su aplicación puede pensarse en términos de producción de biomasa. Luego, con temperaturas de 14-15°C el crecimiento celular fue limitado, pero la actividad enzimática fue favorecida, registrando los mejores valores.

Con base en los ensayos de pH, se determinó que el aislado BAD6 es un microorganismo 'alcalófilo o basófilo', produciendo más amilasa en medios alcalinos, registrando su mayor IE en el pH de 10; podría darse continuidad al ensayo testando pH's aún más alcalinos.

Los resultados obtenidos indicaron que el consorcio '277 Craft Beer' mostró eficiencia en la degradación de la carga orgánica de almidón y otros compuestos presentes en el efluente cervecero, lo que sugiere una capacidad prometedora para contribuir a la biorremediación de áreas contaminadas por este tipo de efluente.

Esta investigación demuestra el valor de preservar los ecosistemas

antárticos, indicando el potencial de los microorganismos locales para degradar proteínas y almidón presentes en efluentes industriales y restaurar áreas contaminadas.

La degradación de dichos componentes implica interacciones complejas entre los microorganismos, el medio ambiente circundante y las propias sustancias problema. Lograr una comprensión integral de estos procesos requiere una investigación meticulosa. Al hacerlo, se revelan algunos factores como cantidad de inóculo, pH y temperatura que impulsan la biodegradación.

Durante la observación en el microscopio, pudo evidenciarse la presencia de varios tipos bacterianos, provenientes de un sólo criotubo, donde se esperaba la presencia de una sólo especie de microorganismo. Con lo anterior, fueron determinados algunos puntos importantes y necesarios a ser considerados durante este tipo de estudios y fundamentalmente en la etapa de aislamiento de microorganismos. Por ello, se sugiere la implementación de algunas estrategias: control y visualización regular de las colonias en el microscopio; realizar repiques adicionales; usar técnicas de siembra adecuadas, sea por profundidad o en superficie; uso de medios de cultivos selectivos que contienen ingredientes que favorecen o desalientan el crecimiento de microorganismos específicos; ajustar el pH del medio de cultivo; realizar pruebas adicionales de tipo bioquímico, serológico y molecular; realizar un registro fotográfico y descriptivo de los aislados para la propia investigación y proyectos posteriores a ese, e informaciones complementares; entre otros.

Aunque hubo obstáculos que superar, los resultados de esta investigación sirven como una base para futuros estudios. En conclusión, este estudio en particular hace una contribución a la ampliación del conocimiento científico sobre la diversidad microbiana de la Antártica y su capacidad para descomponer moléculas. Esto hace que sea crucial continuar explorando esta área para mejorar el desarrollo de métodos de biorremediación más efectivos que ayudarían a promover la preservación de nuestro planeta.

7. REFERÊNCIAS

ACADEMIA AMERICANA DE MICROBIOLOGIA. Fundamentos Científicos da Biorremediação: Situação Atual e Necessidades Futuras, 1992. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK561280/> DOI: 10.1128/AAMCol.10Apr.1992

ANDUALEM, B. Isolation and screening of amylase producing thermophilic spore forming Bacilli from starch rich soil and characterization of their amylase activities using submerged fermentation. *International Food Research Journal*, v. 21, n. 2, p. 831–837, 2014. DOI: <http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20%2802%29%202014/61%20IFRJ%2021%20%2802%29%202014%20Berhanu%20563.pdf54>

ARCE, Z.; ARIAS, A.; MERA, A. Organismos extremófilos en el ojo de la ciencia. *Revista Medica Herediana*, v. 28, n. 1, p. 70, 17 abr. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.20453/rmh.v28i1.3079>

ARISTÓTELES. *La Política*. 1. ed. Buenos Aires: Centro Editor de Cultura, 2005. p. 240

BARRERA, O. y ZAFRA, C. Factores clave en procesos de biorremediación para la depuración de aguas residuales: Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 2018. DOI: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/1037/1699>

BISANG, R; CAMPI, M y CESA, B. Biotecnología desarrollo. CEPAL – Colección Documentos de proyectos. DOI: https://www.cepal.org/sites/default/files/publication/files/3650/S2009064_es.pdf

BRUTTI, L.; BELTRÁN, M. y GARCÍA DE SALOME, I. Biorremediación de los Recursos Naturales. - 1a ed. - Buenos Aires : Ediciones INTA, 2018. DOI: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/136577/CONICET_Digital_Nro.c4e36602-748c-4289-8aef-494933f882f8_E.pdf?sequence=8&isAllowed=y

CAMMAROTA, M. Notas de Aula: Tratamiento de efluentes líquidos, UFRJ, 2011. DOI: <http://www.eq.ufrj.br/docentes/magalicammarota/2013/eqb485.pdf>

Cervantes, L. & Tello, M. & Moreno, Ángel. La reutilización del lacto suero: Una forma de disminuir los impactos ambientales y obtener energía alternativa. 2018. Disponible em: https://www.researchgate.net/publication/332554062_La_reutilizacion_del_lacto_suero_Una_forma_de_disminuir_los_impactos_ambientales_y_obtener_energia_alternativa#fullTextFileContent

CORMACK *et al.* Buscando bacterias sicrofilas en la Antártida. Vol. 17 Nº 99, 2017. DOI: https://www.researchgate.net/profile/Walter-Mac-Cormack/publication/260790459_Buscando_bacterias_sicrofilas_en_la_Antartida/links/0f3175323bd955b859000000/Buscando-bacterias-sicrofilas-en-la-Antartida.pdf

CRUZ-LEYVA, María Concepción de la et al. Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios* [online]. 2015, vol.2, n.4 [citado 2023-11-04], pp.99-115. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282015000100008&lng=es&nrm=iso. ISSN 2007-901X.

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y PROYECTOS. PROHIBICIÓN AL SUERO DE LECHE: DESPERDICIO, INFORMALIDAD Y DAÑO AMBIENTAL. Disponible em: <https://www.lacamara.org/website/wp-content/uploads/2017/03/IPE-321-Comercio-de-Suero-de-leche.pdf>.

FLUENCE. Cómo Lidar con los Efluentes Desafiantes de la Industria Alimentaria. Disponible em: <https://www.fluencecorp.com/es/efluentes-industria-alimentos/>.

GARZÓN, JM; RODRÍGUEZ, JP y HERNÁNDEZ C. Revisión del aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Rev Univ. Salud.* 2017;19(2):309-318. DOI: <http://dx.doi.org/10.22267/rus.171902.93>

GÓMEZ, Felipe. Ambientes extremos: una ruta por los lugares extremos del planeta. Zoé, la aventura de la vida. *Revista de Astrobiología*, n.3, p. 4-8. 2015. DOI: <https://cab.inta-csic.es/wp-content/uploads/2020/09/20151201144335.pdf>

GOOCH, J. W. *Encyclopedic Dictionary of Polymers*. [s.l: s.n.]. p. 892–892. 2011. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6247-8_13734

GURUNG, N. et al. *A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in industries, Medicine, and Beyond*. Volume 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/329121>.

Hamid, Burhan, et al. “Cold-Active Enzymes and Their Potential Industrial Applications—a Review.” *Molecules*, vol. 27, no. 18, 10 Sept. 2022, p. 5885, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9501442/, <https://doi.org/10.3390/molecules27185885>. Accessed 21 Mar. 2023.

KRASIMIROVA, L. Los microorganismos extremófilos y sus aplicaciones biotecnológicas. Salamanca. 2020. DOI: https://digital.csic.es/bitstream/10261/230752/1/DIRECCION_DE_TRABAJOS825422.pdf

KUMAR, R.; KUMAR, P.; GIRI, A. Regional impact of psychrophilic bacteria on bioremediation. *Smart Bioremediation Technologies*, p. 119–135, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818307-6.00007-X>

LABANDERA, N. R.; MALARCZUK, E. C. GUÍA DE TRABAJO PRÁCTICO Enzimología clínica. Principio del análisis en enzimas Colección: Cuadernos de Cátedra. Disponible em: https://editorial.unam.edu.ar/images/documentos_digitales/e34_Enzimologa_clnica.pdf.

LIMA, S. D. *et al.* Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 80, n. 2, p. 354–361, jun. 2020. Disponible em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.208611>.

MELO, R. A. DE. Dinâmica geomorfológica actual na ilha de Deception (Antártica Marítima): análise espacial do sector Cerro Caliente-Crater Lake. Disponible em: <http://hdl.handle.net/10451/356>

MUÑOZ, P; MÁRQUEZ, S. y GONZÁLEZ, FD et al.. “Structure and Application of Antifreeze Proteins from Antarctic Bacteria.” *Microbial Cell Factories*, vol. 16, no. 1, 7 Aug. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0737-2>.

OCAMPO, H. El potencial de la biorremediación. *Publicación semestral, Herreriana*, Vol. 2, No. 2, p. 30-33, 2021. DOI: <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/herreriana/article/view/6285/7776>

OECD, A. *Framework for Biotechnology Statistics*, París, 2005. DOI: <https://www.oecd.org/sti/inno/34935605.pdf>

OGBONNA, C. N. *et al.* Isolation and screening of amylase producing fungi obtained from garri processing site. *International Journal of Biotechnology and Food Science*. v.2, n.5, p. 88-93, 2014. DOI: <http://sciencewebpublishing.net/ijbfs/archive/2014/June/pdf/Ogbonna%20et%20al.pdf>

ORELLANA, P. et al. Identificación de bacterias antárticas con actividad antimicrobiana aisladas de la rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv. *Anales del Instituto de la Patagonia*, 22 jul. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.22352/aip202250002>

PAREDES, L. A.; FLORES FERNÁNDEZ, C. N.; ZAVALETA, A. I. Optimización del medio para la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas* sp. M211 en fermentación sumergida. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, v. 83, n. 4, p. 449–462, 1 out. 2017. Disponible em: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2017000400010

PERALTA FIGUEROA, Christian Manuel Alejandro, et al. Estudios funcionales de proteasas secretadas por bacterias antárticas. 2015. DOI: <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/6416>

PILLING, Sergio. Astrobiología: Extremófilos (tipos, propiedades, zona de habitabilidad extrema). DOI: https://www1.univap.br/spilling/AB/Aula_16%20Extremofilos.pdf.

PODAR, M.; REYSENBACH, A.-L. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 17, n. 3, p. 250–255, jun. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.05.002>

RCTA - Reunión Consultiva del Tratado Antártico (45a : 2023: Informe Final de la Cuadragésima Quinta Reunión Consultiva del Tratado Antártico. Helsinki, Finlandia, 29 de mayo al 8 de junio de 2023. Buenos Aires: Secretaría del Tratado Antártico, p. 1-19. 2023. DOI: file:///C:/Users/User/Downloads/att745_s.pdf

RITA, M.; GOMES, F.; MARRIEL, I. Bioprospeção de actinobactérias produtoras de enzimas de interesse da biotecnologia agroindustrial. 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212306/1/Bioprospeccao-actinobacterias.pdf>.

RODRÍGUEZ, G. et al. LACTOSUERO Y SU PROBLEMÁTICA EN EL MEDIO AMBIENTE XI CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Lunes 31 de Agosto y el Martes 1o de Septiembre Monterrey, Nuevo León. COMITÉ ORGANIZADOR: LACTOSUERO Y SU PROBLEMÁTICA EN EL MEDIO AMBIENTE. [s.l.: s.n.]. Disponível em: https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_MicroAlim/Javier_Castro/10.pdf.

ROJAS TRIVIÑO, A. CONCEPTOS Y PRÁCTICA DE MICROBIOLOGÍA GENERAL. Universidad Nacional De Colombia. 2011. Disponível em: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/8391/albertorojastrivino.2011.pdf?sequence=1>.

SALAS, A. et al. Sostenibilidad en la industria cervecera: una revisión crítica de los residuos generados y su gestión. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. v. 21, p. 1–13, 2022. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/372848724_Sostenibilidad_en_la_industria_cervecera_una_revison_critica_de_los_residuos_generados_y_su_gestion/citations

SÁNCHEZ, A. et al. Estudio preliminar del proceso de producción de cerveza a partir de sorgo rojo CIAP R-132 a escala de laboratorio. *Investigación y Ciencia*, v. 27, n. 77, p. 27–37, 2019. Disponível em: <https://www.redalyc.org/journal/674/67459697004/html/>

SIMÕES, Jefferson, et al. Antártica E as Mudanças Globais: Um Desafio Para a Humanidade. Google Books, Editora Blucher, 7 Oct. 2011. Disponível em: books.google.es/books?hl=es&lr=&id=seuyDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA15&dq=Sim%C3%B5es.

TORRES, D. T. - *et al.* Participación de consorcios microbianos en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. 2016. Disponível em: <http://reibci.org/publicados/2015/mayo/1000101.pdf>

TORRES, Sara and AVENDAÑO, Yuly. Evaluación de La Diversidad Bacteriana Procedente de Agua Marina Antártica Utilizando Microbiología Convencional. 2019. DOI: <repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/3534/EVALUACION%20DE%20LA%20>

DIVERSIDAD%20BACTERIANA%20PROCEDENTE%20DE%20AGUA%20MARINA%20ANTARTICA
%20UTILIZANDO%20MICROBIOLOG.pdf?sequence=2&isAllowed=y

TRILLES e ROSA. H. in BARRETO R. Robert Weingart Barreto. Presidente da Sociedade Brasileira de Micologia (Gestão 2019-2022). Bol. Micob., Rio de Janeiro, RJ, v.1, n.2 p.1-19, out./dez. 2021.

VIEIRA, Vanessa. Por que o Brasil investe no fim do mundo? DARCY, Revista de jornalismo científico e cultural da Universidade de Brasília, n.19, p.11-19, junho a agosto, 2018. DOI: <https://revistadarcy.unb.br/images/PDF/darcy19.pdf>

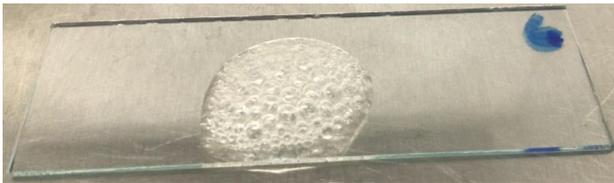
WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation, Current Opinion in Biotechnology, Vol. 12, Issue 3, p. 237-241, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00205-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00205-6).

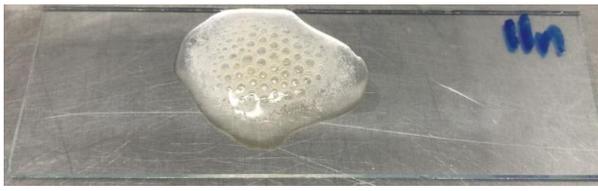
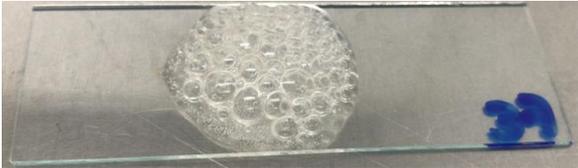
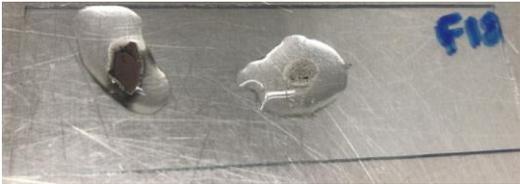
ZLATA, Drnas de Clément. Cuaderno de Derecho Ambiental: Biotecnología. Número V. Córdoba, 2013. DOI: <https://www.acaderc.org.ar/wpcontent/blogs.dir/55/files/sites/55/2019/11/cuadernoambiente05.pdf>

APÉNDICES

APÉNDICE A – PRUEBA CATALASA

Teniendo en cuenta la metodología de Rojas (2011), pudo ser determinada la presencia de catalasa (CAT) mediante la técnica del peróxido de hidrógeno 10 vol. La siguiente tabla, muestra la evaluación cualitativa de la CAT, siendo ‘+’ para describir poca actividad, ‘++’ para actividad moderada y ‘+++’ para alta actividad.

Microorganismo	Observación en lámina de la reacción $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Evaluación cualitativa de la CAT
BAD1a		++
BAD6		+++
BAD7		++
BAD8		+++
BAD9		+
BAD11b		+

BAD11n		++
BAD37		+++
BAD38		++
BAD40.1		+
BAD41		++
FAR18		+
BSQ1		++
<p>Simbología para la evaluación cualitativa de la CAT: '+' para describir poca actividad, '++' para actividad moderada y '+++ para alta actividad.</p>		