

**UNIVERSIDAD SAN SEBASTIÁN  
FACULTAD DE INGENIERIA Y TECNOLOGÍA  
SEDE CONCEPCIÓN**

**Desarrollo de un consorcio de bacterias ácido lácticas para  
remoción de hierro total en aguas naturales para potabilización.**

Tesis para optar al Grado de Magíster en Innovación en Biociencias y  
Bioingeniería

Profesor Guía: Mg. Luis Vergara González.  
Estudiante: Cristián Marcel Balboa Luna.

Cristián Marcel Balboa Luna,  
Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta tesis en cualquier forma,  
medio o procedimiento sin permiso por escrito del autor.

Concepción, Chile

2021

## HOJA DE CALIFICACIÓN

En \_\_\_\_\_, el \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante \_\_\_\_\_ del programa Magíster en Innovación en Biociencias y Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería y Tecnología ha aprobado la tesis para optar al Grado académico de \_\_\_\_\_ con nota de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Profesor Evaluador

\_\_\_\_\_

Profesor Evaluador

\_\_\_\_\_

Profesor Evaluador



## **DEDICATORIA**

*A MIS PADRES EUFEMIA LUNA POBLETE Y SERGIO BALBOA ZAVALA,  
QUIENES FUERON Y SON LA BASE PRIMORDIAL DE MI VIDA.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi profesor guía, Mg., Luis Vergara Gonzalez, por el apoyo incondicional durante el desarrollo de este proyecto, por el tiempo de dedicación, por su confianza hacia mí, lo que en su conjunto lograron el resultado final que es esta tesis.

También agradecer a todos mis seres queridos que directa o indirectamente me apoyaron en este período, el cual tuvo momentos adversos y difíciles, pero se logró salir adelante.

## Resumen

La demanda por fuentes de agua ha experimentado un incremento durante el último siglo debido a actividades industriales y crecimiento poblacional, esto ha generado un mayor vertimiento de aguas residuales y residuos líquidos industriales, que ha provocado el aumento en la prevalencia de cuerpos acuáticos contaminados afectando su calidad para explotación. En este contexto, el desafío que enfrentan las industrias sanitarias es producir agua tratada con alta calidad, pero con un proceso de potabilización de bajo costo, favoreciendo los métodos de tratamiento que utilicen el reciclaje de agua. Otro problema que afecta a las industrias sanitarias es la necesidad de incrementar la prospección de nuevas fuentes de abastecimiento de agua para potabilización, debido a que los cuerpos freáticos en explotación enfrentan cambios en su composición fisicoquímica por la contaminación, lo que incide en los procesos de producción y tratamiento de agua. Lo anterior, está promoviendo la búsqueda de nuevos cuerpos acuáticos con mejor calidad lo que implica mayores costos.

A nivel nacional, para el 2019, la capacidad máxima de producción de agua potable fue de 101.827 litros por segundo, abarcando un universo de más de cinco millones de clientes residenciales (viviendas) en 399 localidades (servicios de agua potable). El total de producción de agua potable del 2019 con respecto al 2018 aumento en un 2,93%, explicado fundamentalmente por el incremento de las fuentes subterráneas y por el aumento de clientes. En este sentido, la importancia de la recuperación de cuerpos freáticos contaminados es de vital relevancia y para esto, la utilización de la biorremediación, aparece como una solución biodegradable y de bajo costo que contribuye al mejoramiento del agua para potabilización.

En términos biológicos, en los sistemas acuáticos superficiales como esteros, ríos y/o vertientes, es posible encontrar poblaciones de bacterias ácido lácticas (BAL) que juegan un rol de protección del ambiente dulceacuícola. Este grupo de bacterias tiene la capacidad de remover contaminantes desde medios acuosos de manera significativa disminuyendo su concentración, contribuyendo a la obtención de un agua de mejor calidad luego del tratamiento convencional para potabilización.

En este trabajo se proyectó un bionegocio utilizando la biotecnología, cuyo objetivo es la recuperación de fuentes de agua contaminadas que se utilizan para producción de agua potable.

Dado lo anterior, se ecodiseñó un producto biotecnológico, es decir, se diseñó un producto el cual posee el menor impacto hacia el medio ambiente desde su producción hasta su eliminación, con una alta calidad, en base a un consorcio de BAL, con propiedades probióticas, aisladas desde cuerpos acuáticos superficiales como vertientes y esteros de Chile central, que contribuyan a cumplir requisitos de mejoras operacionales en una planta potabilizadora, ya que su aplicación en fuentes de agua abandonadas permitirá su reactivación y uso.

Este bionegocio mostró una alta proyección ya que abarca temas del agua, y en particular la recuperación de fuentes de abastecimiento, por lo que primeramente está dirigido a sanitarias a nivel regional y luego nacional.

Palabras claves: contaminación, agua potable, bacterias ácido lácticas, biorremediación, biodegradable.

## **Abstract**

The demand for water sources has experienced an increase during the last century due to industrial activities and population growth, this has generated a greater discharge of sewage and industrial liquid waste, which has caused an increase in the prevalence of contaminated aquatic bodies affecting their quality for exploitation. In this context, the challenge facing the sanitation industries is to produce high quality treated water, but with a low-cost purification process, favoring treatment methods that use water recycling. Another problem that affects the sanitation industries is the need to increase the prospecting of new sources of water supply for drinking water, due to the fact that the phreatic bodies in operation face changes in their physicochemical composition due to contamination, which affects the processes of water production and treatment. The foregoing is promoting the search for new water bodies with better quality, which implies higher costs.

At the national level, for 2019, the maximum drinking water production capacity was 101,827 liters per second, covering a universe of more than five million residential customers (homes) in 399 localities (drinking water services). The total production of drinking water in 2019 compared to 2018 increased by 2.93%, mainly explained by the increase in underground sources and by the increase in customers. In this sense, the importance of the recovery of contaminated groundwater bodies is of vital importance and for this, the use of bioremediation appears as a biodegradable and low-cost solution that contributes to the improvement of water for purification.

In biological terms, in surface aquatic systems such as estuaries, rivers and / or springs, it is possible to find populations of lactic acid bacteria (LAB) that play a role in protecting the freshwater environment. This group of bacteria has the ability to remove contaminants from aqueous media in a significant way, reducing their concentration, contributing to obtaining a better quality water after conventional treatment for purification.

In this work, a bio-business was projected using biotechnology, whose objective is the recovery of contaminated water sources that are used for the production of drinking water.

Given the above, a biotechnological product was eco-designed, that is, a product was designed which has the least impact on the environment from its production to its disposal, with high quality, based on a BAL consortium, with probiotic properties, isolated from surface water bodies such as springs and estuaries in central Chile, which contribute to meeting the requirements of operational improvements in a water treatment plant, since its application in abandoned water sources will allow its reactivation and use. This bio-business showed a high projection since it covers water issues, and in particular the recovery of supply sources, which is why it is primarily aimed at water utilities at the regional level and then at the national level.

Keywords: contamination, drinking water, lactic acid bacteria, bioremediation, biodegradable.

## Contenido

DEDICATORIA .....	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS.....	II
Resumen .....	III
Abstract .....	IV
Capítulo 1: Introducción .....	1
1.1 Producción de agua potable y tratamiento de agua residual. ....	3
1.2 Biorremediación. ....	9
1.3 Fuentes de captación. ....	11
1.4 Ecosistemas acuáticos. ....	12
1.5 Microorganismos en ecosistemas de cuerpos acuáticos naturales. ....	12
1.6 Bacterias ácido lácticas (BAL). ....	14
1.7 BAL de vida libre. ....	16
1.8 Características probióticas de las BAL. ....	17
1.9 Remediación por BAL en medios acuosos. ....	19
Capítulo 2: Hipótesis y objetivos .....	27
2.1 Hipótesis científica. ....	27
2.2 Hipótesis de bionegocio. ....	27
2.3 Objetivos. ....	27
Capítulo 3: Metodología.....	28
3.1 Proceso creativo.....	28
3.1.1 Fase 1: Empatizar. ....	28
3.1.2 Fase 2: Definir. ....	29
3.1.3 Fase 3: Idear. ....	29
3.1.4 Fase 4: Prototipar. ....	30
3.2 Modelo de negocios.....	31
3.2.1 Selección de clientes .....	32
3.2.2 Problema .....	32
3.2.3 Propuesta única de valor. ....	32
3.2.4 Solución.....	33
3.2.5 Canales. ....	33
3.2.6 Flujo de ingresos. ....	33
3.2.7 Estructura de costos. ....	33
3.2.8 Métricas claves.....	34

3.2.9	Ventajas especiales.....	35
3.3	Estrategia de negocio.....	35
3.3.1	Centro de investigación. ....	36
3.3.2	Vigilancia tecnológica. ....	36
3.3.4	Valorización. ....	36
3.3.5	Comercialización. ....	36
3.3.6	Mercado.....	37
3.4	Estrategia de posicionamiento por beneficios.....	37
3.5	Transferencia tecnológica. ....	39
3.6	Análisis económico.....	41
Capítulo 4:	Resultados.....	43
4.1	Descripción del producto/proceso. ....	43
4.2	Publicación formato “Review”. ....	45
4.3	Identificación de competidores. ....	45
4.5	Descripción de las etapas .....	49
4.5.1	Etapa negociación y comercialización.....	50
4.5.2	Etapa Redefinición.....	50
4.5.3	Etapa de ingeniería del producto. ....	50
4.5.3	Etapa de verificación.....	50
4.5.4	Etapa de desarrollo.....	51
4.5.5	Etapa de aprovisionamiento.....	51
4.5.6	Etapa de finalización.....	51
4.5.7	Identificación del segmento.....	51
4.6	Identificación de dos o más empresas asociadas.....	53
4.7	Descripción de la estrategia de masificación. ....	55
4.8	Viabilidad económica. ....	56
4.8.1	Inversión inicial. ....	56
4.8.2	Ingresos.....	57
4.8.3	Flujo de caja .....	58
Capítulo 5:	Conclusiones.....	61
Capítulo 6:	Referencias. ....	63

## Índice de figuras y tablas.

<b>Figura 1:</b> Diagrama general de los tratamientos de agua.....	6
<b>Figura 2:</b> Metodología para proceso creativo <i>Design Thinking</i> .....	28
<b>Figura 3:</b> Esquema de estrategia de negocio de Naturewaters Probiotics.....	36
<b>Figura 4:</b> Esquema de integración tecnológica de Naturewaters Probiotics. ....	38
<b>Figura 5:</b> Esquema de campañas publicitarias de “Naturewaters Probiotics”, las que serán parte fundamental de la integración tecnológica del producto. ....	38
<b>Figura 6:</b> A, Imagen publicitaria. B, Logotipo de Naturewaters Probiotics. ....	44
<b>Figura 7:</b> Modelo representativo de la transferencia tecnológica.....	56
<b>Tabla 1:</b> Tecnologías domésticas para el tratamiento del agua y la remoción de contaminantes.....	3
<b>Tabla 2:</b> Mejoramiento ambiental en Latinoamérica mediante la biorremediación. ....	10
<b>Tabla 3:</b> Bacterias ácido lácticas utilizadas para la remoción de metales pesados en soluciones acuosas. ....	20
<b>Tabla 4:</b> Modelo de negocios Canvas .....	31
<b>Tabla 5:</b> Estructura de costos Naturewaters Probiotics. ....	33
<b>Tabla 6:</b> Patentes relacionadas con el mejoramiento de medios acuosos. ....	39
<b>Tabla 7:</b> Inversión de bienes de capital físico. ....	57
<b>Tabla 8:</b> Ingresos esperados del bionegocio en un plazo de 5 años.....	57
<b>Tabla 9:</b> Flujo de caja con variación del precio de producto de 5% anual incremento de ventas en un 35% anual.....	58
<b>Tabla 10:</b> Flujo de caja sin variación del precio de producto, incremento de ventas en un 10% anual .....	59



## Capítulo 1: Introducción

La demanda por fuentes de agua para potabilización ha experimentado un incremento durante el último siglo debido a actividades industriales y crecimiento poblacional, esto ha generado un mayor vertimiento de aguas residuales y residuos líquidos industriales, dando como resultado la contaminación de los cuerpos acuáticos, esto ha originado a las industrias sanitarias el desafío de producir y disponer agua con alta calidad, pero a bajo costo, privilegiando aquellos métodos de potabilización del agua que opten por tecnologías limpias y biodegradables (Farhaoui y Derraz, 2016). Estas fuentes naturales de captación de agua también se encuentran expuestas a contaminantes minerales cuyo origen se debe principalmente al rápido desarrollo de la industrialización, eventos y flujos geológicos que durante estas últimas décadas se han ido acumulando en el ambiente, principalmente en zonas donde no se presenciaban contaminantes de este tipo, y que en el caso de captaciones superficiales, se ven influenciadas por el sistema pluvial, y dependen mayoritariamente de tributarios que transportan metales por erosión geológica (Copaja et al. 2016). Como factor adicional a la contaminación, podemos comentar que los recursos acuáticos están siendo afectados por la escaridad, lo que está generando conflictos económicos y políticos relacionados con la utilización del agua. Actualmente en Chile, entre las regiones III y IV, existe una alta escaridad (<500 m<sup>3</sup>/persona/año), mientras que desde las V a XII región hay disponibilidad de agua para la población, lo anterior lo podemos relacionar con los cambios en la pluviosidad en estas zonas geográficas (>10000 m<sup>3</sup>/persona/año) (Plappally y Lienhard, 2012).

Los sistemas de tratamiento de agua en ocasiones no desarrollan una sostenibilidad ambiental que se mantenga en el tiempo (Saratale et al. 2011), ya

que utilizan infraestructura con técnicas que no logran una óptima remoción de contaminantes. El objetivo de contar con sistemas de tratamiento de aguas es obtener agua depurada y potable, es decir; un agua limpia, sin contaminantes, que es el resultado de una convergencia entre la gestión de los procesos operacionales y administrativos para el tratamiento de las aguas residuales que incide directamente en la calidad del efluente vertido en los cursos receptores, los cuales son ocupados como fuentes de agua para potabilización (Bitton, 2014). Como se ha mencionado, la presencia y acumulación de contaminantes se debe al vertimiento de residuos por actividades domésticas, actividades mineras, desechos municipales, métodos aplicados en la agricultura, vertidos marinos, desechos radioactivos, derrames de aceites, fugas de almacenamiento industrial subterráneo, entre otros (Patel y Chandel, 2015; Gupta y Diwan, 2017). Algunos países en vías de desarrollo de Latinoamérica y Asia cuentan con tecnologías de potabilización de agua cuyo foco principal es inactivar y remover agentes patógenos del agua, tales como algunos grupos de bacterias, virus o protozoos, sin embargo, se excluyen parámetros fisicoquímicos y organolépticos (**Tabla 1**) (Rosa et al. 2010; Stauber et al. 2012; Ren y Smith, 2013; Fontán-Sainz et al. 2012; Clasen y Edmondson, 2006; Nitzsche et al. 2015; Chawla et al. 2017). De estas tecnologías la más utilizada es la desinfección del agua por cloración mediante la dosificación de hipoclorito de sodio (Bitton, 2014).

En Chile, la cobertura urbana de agua potable en los territorios concesionados se mantiene por sobre el 99,9%. A nivel país, el total de captaciones explotadas son de 1709. Para zonas rurales se encuentran los sistemas de agua potable rural (APR), actualmente existen cerca de 1.897 sistemas de APR, emplazados a lo largo de todo el país, los cuales abastecen a más del 99% de la población de zonas rurales concentradas, alcanzando a 1.740.639 habitantes. Por ejemplo, sólo en la región del Bío Bío hay 103.840 beneficiarios.



**Tabla 1:** Tecnologías domésticas para el tratamiento del agua y la remoción de contaminantes.

Tecnologías	País/Región geográfica	Remoción/ Inactivación Microbiológica	Remoción Físicoquímica	Referencia
Aplicación de Temperatura	Guatemala, Camboya, China	Bacteriana y parasitológica	-	Rosa et al. 2010
Biofiltros de arena	Canadá, Republica dominicana, Kenia y Camboya	<i>Escherichia coli</i> , <i>Giardia lamblia</i> y <i>Cryptosporidium parvum</i>	Turbiedad	Stauber et al. 2012
Filtros de cerámica	India, Inglaterra, Colombia	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>E. coli</i> , coliformes termotolerantes, quistes y ovoquistes de protozoos.	Turbiedad y Color	Ren y Smith, 2013
Desinfección solar	India, Kenia	<i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp., <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> y <i>Shigella dysenteriae</i>	-	Fontán-Sainz et al. 2012
Tabletas de purificación de agua	India	Bacteriana		Clasen y Edmondson, 2006
Tabletas para coagulación y floculación - Sedimentación	Guatemala	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella terrigena</i> , poliovirus 1, rotavirus SA-11 y quistes de <i>Giardia muris</i> .	Sólidos suspendidos	Bitton 2014
Cloración en estanque de almacenamiento	África, Asia, Latinoamérica, Norteamérica	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>V. cholerae</i>	-	Bitton 2014
Filtración y Cloración	Nigeria, Latinoamérica, Estados Unidos	Bacteriana y protozoos	Turbiedad, Fe, As	Nitzsche et al. 2015;

### 1.1 Producción de agua potable y tratamiento de agua residual.

El agua potable es el resultado de un proceso de potabilización del agua que se extrae de cuerpos acuáticos como fuentes de captación, estos cuerpos acuáticos se enfrentan a diferentes contaminantes ya sea de origen natural o de forma alóctona por causas antrópicas, en este sentido las industrias sanitarias tienen la obligación de tratar el agua asegurando una alta calidad, pero a bajo costo, favoreciendo metodologías limpias y biodegradables. Por otro lado, a nivel de las

sanitarias existe un incremento en la prospección de nuevas fuentes de abastecimiento de agua para potabilización, ya que los cuerpos freáticos explotados están contaminados, lo que incide en los procesos de producción y tratamiento de agua, promoviendo la búsqueda de nuevos cuerpos freáticos de mejor calidad.

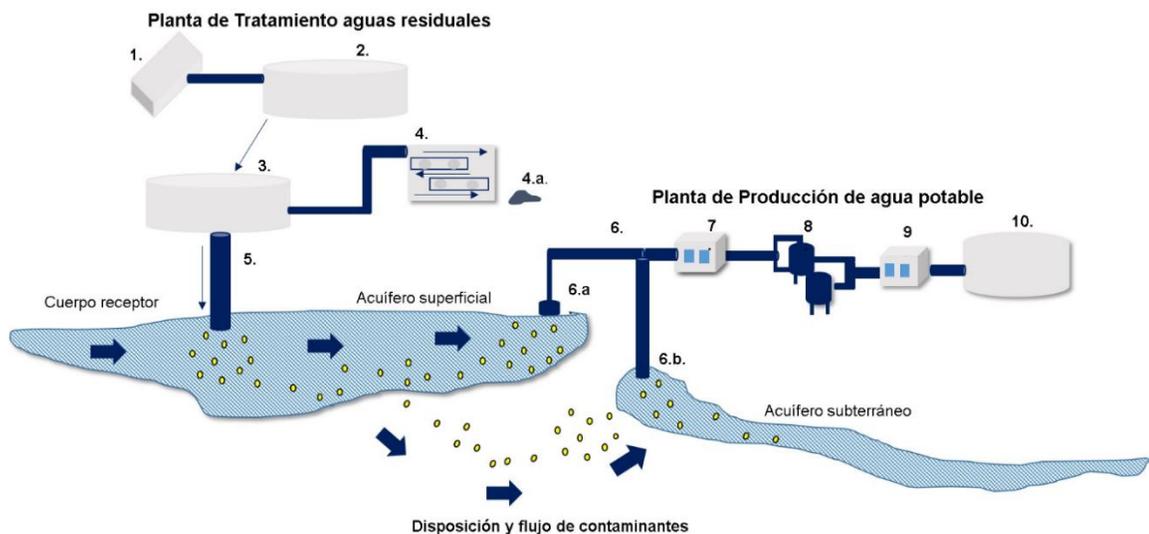
A nivel nacional, en el 2019, la capacidad máxima de producción de agua potable fue de 101.827 litros por segundo, abarcando un universo de más de cinco millones de clientes residenciales (viviendas) en 399 localidades. La producción se encuentra dividida en un 55,06% que corresponde a fuentes de agua subterránea y el 44% a fuentes superficiales. El 1% restante corresponde a agua de mar. El total de producción de agua potable con respecto al 2018 aumento en un 2,93%, explicado fundamentalmente por el incremento de las fuentes subterráneas.

La contaminación el agua es un fenómeno emergente que durante la última década ha tenido una mayor importancia debido a la escasez hídrica mundial. Llorca et al (2016), realizaron un estudio sobre los contaminantes emergentes en Latinoamérica que afectan la biota acuática de agua dulce y marina, entre los años 2002 a 2016, encontrando que en Argentina, Brasil, Chile, Colombia, México y Nicaragua, se pueden detectar contaminantes de origen farmacéutico, productos de cuidado personal, insecticidas, que en su conjunto están siendo clasificados como el nuevo grupo de contaminantes orgánicos persistentes (COPs), evidenciando compuestos halogenados que se utilizan como retardantes de llama y sustancias perfluoralcaloides. Estas sustancias no sólo afectan los cuerpos de agua, sino que también la biota acuática que los bioacumula, activando su introducción a la cadena trófica. Existen contaminantes del tipo metales pesados que están definidos como un grupo de 40 elementos con una densidad superior a  $5 \text{ gr/cm}^3$  (Huet y Puchooa, 2017), y que se reparten en tres familias (a) metales tóxicos como Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn, (b)



metales preciosos Pd, Pt, Ag, Au, Ru, y (c) radioactivos U, Th, Ra, Am (Patel y Chandel, 2015).

Por otra parte, para el agua residual, el tratamiento de los residuos generados por la actividad industrial y en aguas residuales domiciliarias, no están siendo efectivos y eficientes en cuanto se refiere a la remoción de metales pesados (Pugazhenthiran y Anandan, 2016). La recolección de esta agua se lleva a cabo mediante colectores interconectados en puntos domiciliarios y en industrias, que finalmente convergen en una planta de tratamiento de aguas residuales, en donde se aplican técnicas convencionales de remoción de materia orgánica y de compuestos orgánicos, generando un efluente que descargará a un cuerpo receptor; (a) sistema fluvial tipo estero, río, laguna o lago, o (b) sistema marino. Hernández et al (2016), realizaron una caracterización de los contaminantes en el influente de plantas de tratamiento de agua residual en Brasil, Chile, Colombia, México y República Dominicana, los cuales se caracterizaron por contener altas concentraciones de demanda bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno, sólidos suspendidos totales, amonio, nitrito, nitrato, fósforo total y metales pesados como Fe, Mn, Pb, Cd, Hg, As, Cr, Zn y Cu, los que también se detectaron en efluentes que descargan en cuerpos de agua superficiales produciendo la llegada de estos componentes de manera alóctona a cuerpos receptores que aguas abajo pueden ser utilizados como fuente de captación, ingresando al sistema de producción de agua potable pues ocurre infiltración a acuíferos subterráneos siendo captados por obras de captación tipo pozos, sondajes o incluso punteras que potencialmente pueden contaminar el agua potable producida (Figura 1).



**Figura 1:** Diagrama general de los tratamientos de agua. Planta de tratamiento de aguas residuales. 1.- desarenador y desengrasador, el agua llega a través del alcantarillado hasta un sistema de pretratamiento encargado de eliminar material de gran tamaño. 2. sedimentador encargado de sedimentar los sólidos de mayor peso, en donde el clarificado o sobrenadante pasará a la siguiente etapa. 3. reactor, donde ocurre el tratamiento biológico generando lodos sanitarios que mezclan bacterias y materia orgánica. 4. deshidratador encargado de eliminar el agua del lodo a través de un filtro de prensa. 4.a. lodo sanitario. 5. disposición del efluente, luego de desinfectar el agua se procede a disponer el efluente en aguas continentales o marinas. Planta de producción de agua potable, 6. captación, en las plantas de producción de agua potable, el agua se obtiene a través de cuerpos de agua, 6.a. fuente superficial, 6.b. fuente subterránea. 7. oxidación, aplicación de sustancias oxidantes para metales. 8. filtración, el agua es conducida a filtros para retener el material oxidado. 9. desinfección, el agua filtrada se desinfecta por la aplicación de cloro. 9. almacenamiento, el agua filtrada es almacenada en estanques de acumulación en donde luego de un tiempo de residencia es considerada potable y distribuida a la población.

Actualmente en Chile, para la producción de agua potable los métodos convencionales de remoción de contaminantes son por oxidación a través de cloro gas e hipoclorito de sodio (Rawat et al. 2014), luego se somete a una etapa de filtración a través de filtros abiertos y/o en presión con medios filtrantes como antracita y/o "Greensand", tales métodos si bien logran una disminución del 80% a 85%, no logran la remoción total de los contaminantes en el agua, lo que ha generado que durante décadas se vayan acumulando en las redes de distribución de agua potable, por precipitación de óxidos de hierro y óxidos de manganeso, los que ante cualquier perturbación hidráulica se liberan provocando alteraciones organolépticas y estéticas del agua causados por cambios fisicoquímicos, resultando en incumplimientos y/o anomalías en la concentraciones de los contaminantes de acuerdo a los valores establecidos por entidades



fiscalizadoras. Fowler y Smets, (2017) mencionan que la desinfección del agua contribuye a la presencia de sustancias residuales y productos de la desinfección, los cuales son regulados debido a los efectos adversos en salud y en los aspectos físicos del agua que incluyen el color, olor y sabor que son parte de su calidad. Sin embargo, hay un remanente bacteriano que no se elimina, el cual se va depositando en las redes de distribución de agua, formando lo que se conoce como “biopelículas”. Hammes et al (2008) indican que en los sistemas de distribución de agua potable es posible encontrar entre 1000 a 10 000 millones de bacterias por mL<sup>-1</sup>. El crecimiento de las biopelículas en las redes de distribución impacta negativamente en la calidad química y estética del agua potable, aumentando el consumo de cloro libre residual, la resistencia al flujo hidráulico y en algunos casos ocasionando la corrosión de las redes de distribución metálicas debido a la secreción de metabolitos (Liu et al. 2016).

Por otra parte, existen otras tecnologías para el tratamiento del agua, las cuales no incluye adición de sustancias oxidantes. Alluri et al (2007) y Fowler y Smet, (2017), indican biotecnologías para la producción de agua potable, que permiten mejorar sus características fisicoquímicas, organolépticas, microbiológicas y estéticas, a través de técnicas como biofiltración. Los biofiltros consisten en pasar el agua sobre un medio granular compuesto por capas de carbón activado o antracita, conocido como lecho filtrante, que se encuentra cubierto con microorganismos que captan los analitos por mecanismos bioquímicos, removiendo las sustancias contaminantes. En un biofiltro, los microorganismos crecen colonizando los poros de las partículas del lecho filtrante, de acuerdo a propiedades fisicoquímicas de la superficie tales como la adsorción y la concentración de carbono orgánico (Chaudhary et al. 2003). En el caso de un lecho filtrante compuesto por partículas de carbón activado granular, donde existe una mayor superficie de contacto, la carga de biomasa alcanza valores entre 30 a 4000 ng ATP mL<sup>-1</sup> (Hammes et al. 2011). Brown et al. (2015) mencionan que inicialmente en el biofiltro, ocurre una remoción de partículas y

luego el control microbiológico realiza un tratamiento secundario, el cual es efectivo cuando el tiempo de residencia del agua es entre tres a veinte minutos.

De acuerdo con Elsanhoty et al (2016), la reducción de metales por remoción utilizando el método de biofiltración alcanzan del 99% a 100%. Fowler y Smet, (2017), Jaafar (2020) proponen utilizar la biosorción y/o bioacumulación para remover metales desde aguas naturales, empleando como biomaterial sorbente, los microorganismos, generando una biorremediación. La bioacumulación promueve que los analitos se acumulen en la pared celular, mientras que en biosorción debe ocurrir transporte activo del contaminante al interior de la célula aumentando la concentración intracelular del metal. En el caso del tratamiento de aguas residuales, en ambos mecanismos se propone que deben ejecutarse en la primera etapa del tratamiento, en el biofiltro, a fin de obtener un efluente libre de metales que entre al sistema convencional de tratamiento de aguas residuales. Otro mecanismo que puede llevarse a cabo es la bioaugmentación, en la que se adicionan Archea o cultivos bacterianos necesarios para acelerar la velocidad de degradación de un contaminante (Gulay et al. 2014).

En este sentido, y de acuerdo a lo indicado en párrafo anterior, es de gran relevancia encontrar una solución sustentable para remover metales directamente en el agua, ya que las técnicas actuales aplicadas no logran una suficiente remoción, lo que está afectando la calidad de vida de las personas y del agua. A nivel nacional, el agua captada para potabilización posee altas concentraciones de metales, de acuerdo a los límites establecidos por la entidad fiscalizadora, en algunas zonas de la VIII región las concentraciones de hierro total están entre los 7 mg/L. a 8 mg/L. Se ha visto que la presencia de metales como el hierro total es proporcional con la existencia de turbiedad nefelométrica y color verdadero en el agua natural y potable.



## 1.2 Biorremediación.

En un ambiente natural ocurren alteraciones de forma endógena o de manera alóctona en el sistema ambiental lo que provoca un desequilibrio en la homeóstasis del ecosistema. La recuperación del medio ambiente a su condición natural se puede realizar a través de la aplicación de microorganismos, plantas o enzimas. Según Meril et al (2015) los microorganismos más comunes utilizados en biorremediación corresponden a especies de *Acromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Streptococcus lacti*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodobacter sphaeroide*. Estos agentes biorremediadores actúan como biocatalizadores de las reacciones bioquímicas con los contaminantes permitiendo la restauración del ambiente (Abatenh et al. 2017; Abu Hasan, 2020), facilitado por una degradación, alteración, inmovilización o remoción de los compuestos tóxicos (Cheng, 2014; Dzionek et al. 2016).

Las principales variables de las cuales depende la biorremediación son el contenido de materia orgánica, oxígeno disuelto, temperatura, pH, nitrógeno y fósforo (Sode et al. 2013; Tang y Cheng, 2015). De acuerdo con Cheng (2014), existen tres factores de riesgo en la biorremediación, estos corresponden a (i) biológicos, (ii) ambientales y (iii) contaminantes. Los factores biológicos van a depender de las fuentes de energía y de los principales requerimientos de los microorganismos para adaptarse y crecer en condiciones extremas de acuerdo a su hábitat natural. Una vez que los microorganismos se encuentren adaptados serán capaces de metabolizar los contaminantes. Los factores ambientales, corresponden a aquellas condiciones que favorecen la formación de enzimas capaces de metabolizar los contaminantes o que van a facilitar los procesos de remoción. Los factores contaminantes corresponden a plaguicidas, herbicidas, fertilizantes químicos, detergentes, hidrocarburos, aguas residuales, plásticos y otros sólidos. Su presencia en el medio ambiente determinará la concentración de microorganismos presentes en el sistema biológico.

Actualmente la aplicación de esta biotecnología de mejoramiento ambiental está siendo desarrollada en la minería del oro, plata y cobre, lo que suele ser más barato que el uso de las tecnologías convencionales. Por ejemplo, en la desintoxicación de efluentes por biorremediación, las bacterias se han estado aplicando en la minería de cobre y oro en Chile, India, Ghana, Uzbekistan y Australia; siendo importante destacar que al menos 34% del cobre y el 15% del oro producido en el mundo proviene de estos países (Garzón et al. 2017). De acuerdo con Alvarez y Polti (2014), en Latinoamérica la biorremediación está centralizada en remediar residuos sólidos, agua y suelos, contaminados en su gran mayoría con metales pesados y pesticidas como es el caso de Argentina, en tanto México utiliza la biorremediación en suelos contaminados con pesticidas (Tabla 2).

**Tabla 2:** Mejoramiento ambiental en Latinoamérica mediante la biorremediación.

País	Contaminante	Matriz	Microorganismos biorremediador	Referencias
México	Pesticidas	Suelo	<i>Brevibacterium</i> sp. BSP3, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CH7, <i>Bacillus subtilis</i> SK320, <i>Lactobacillus fermentii</i>	Ortiz-Hernández et al. 2014
Argentina	Cr (VI), Cu (II), B, Ni, Zn (II), Ur, Cd (II)	Suelo, agua, residuos sólidos, sedimentos marinos	<i>Cyberlindnera jadinii</i> M9, <i>Wickerhamomyces anomalus</i> M10, <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Amycolatopsis tucumanensis</i> DSM 45259, <i>Streptomyces</i> sp. MC1, <i>Chlorella</i> spp., <i>Bacillus boroniphilus</i> , cianobacterias, <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> , <i>Gracilibacillus boracitolerans</i> sp. nov., <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> , <i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i> , <i>Undaria pinnatifida</i> , <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Ridolfi et al. 2014
Chile, Perú, Guatemala, Ecuador	Pesticidas	Suelo	<i>Anthracophyllum discolors</i> Sp4, <i>Streptomyces</i> sp. AC5, <i>Streptomyces</i> sp. AC16	Briceño et al. 2014



### 1.3 Fuentes de captación.

La mayoría de las fuentes de agua dulce para potabilización son superficiales y subterráneas, ambas formas de agua están expuestas a contaminación y requieren de algún tipo de tratamiento para ser considerada potable, aunque también existen fuentes de origen marino, embalses o tranques en base a agua de lluvia (Treacy 2019; Chowdhury et al. 2016).

Las fuentes de captación se categorizan en (a) fuentes subterráneas, en las cuales el agua está contenida en cuerpos freáticos y la infraestructura de extracción está clasificada como; punteras, drenes, sondajes, norias y pozos profundos, (b) fuentes superficiales que corresponden a cuerpos acuáticos que se encuentran sobre la superficie terrestre como ríos, lagos, embalses y esteros en los cuales la extracción del agua contenida se realiza por bocatomas de agua que la embalsan para posteriormente conducir las a través de impulsiones a la planta de tratamiento de agua para su potabilización, y (c) fuentes mixtas en las cuales existe una combinación de ambas fuentes de captación mencionadas anteriormente.

Las fuentes de captación presentan un ecosistema bien definido, dado por los hábitats que podemos encontrar, por ejemplo; en aguas subterráneas el periodo de residencia del agua es entre dos semanas a 100.000.000 de años, su hábitat principalmente es anaeróbico, estratificado geológica, química e hidrológicamente, el modelo de metabolismo de los organismos es heterotrófico y quimioautotrófico, la dinámica del ambiente es predecible y constante, el sistema en términos de productividad es oligotrófico (Madsen y Ghiorse, 1993; Gilbert, 1994; Whitman et al. 1998). En tanto para aguas superficiales, el periodo de residencia del agua es entre dos semanas a diez años, el modelo de metabolismo puede ser fotoautotrófico o heterotrófico. El hábitat de estos microorganismos se puede ubicar en; la columna de agua, zona hiporreica o sedimentos finos granulados, cuyo nivel de trofia puede ser oligotrófico a eutrófico (Madsen y Ghiorse, 1993; Gilbert, 1994; Whitman et al. 1998).

#### **1.4 Ecosistemas acuáticos.**

Los ecosistemas de las zonas subterráneas presentan un vasto complejo de hábitats y diversidad de comunidades bacterianas, llegando a un 40% de biomasa de células procariontes bajo la superficie terrestre (Griebler y Lueders, 2009). Una de las principales diferencias entre los ecosistemas de agua subterránea y superficial es la falta de recambio de agua y la disponibilidad de carbono orgánico (Gilbert, 1994). El término “Biosfera profunda”, fue postulado hace alrededor de 30 años atrás (Gold, 1992), en donde actualmente es conocido que los microorganismos habitan esta biosfera varios kilómetros bajo la superficie (Lin et al. 2005). En estudios recientes se ha estimado la abundancia de especies en esta biosfera profunda, encontrando que en sedimentos marinos residen  $4,1 \times 10^{15}$  g C (Kallmeyer et al. 2012), en cambio en la superficie continental se ha valorado en  $10^{16}$  g C a  $10^{17}$  g C (McMahon y Parnell, 2014). Existe una interacción entre aguas superficiales y aguas subterráneas, dada por el agua filtrada de las orillas de los ríos, la que permite el flujo de las comunidades microbianas, factor importante en la calidad de la fuente de captación para potabilización. A pesar de que los microorganismos habitan en condiciones limitadas de energía en los sistemas acuáticos, presentan una viabilidad activa adaptándose a estas condiciones, Wu et al (2016) proponen que la diversidad de microorganismos en acuíferos subterráneos comprende grupos no identificados hasta ahora, en donde las células a encontrar se caracterizan por ser físicamente pequeñas y de un genoma simplificado.

#### **1.5 Microorganismos en ecosistemas de cuerpos acuáticos naturales.**

De acuerdo con Griebler y Lueders (2009), el número total de bacterias que podemos encontrar en sistemas acuáticos subterráneos puede ser entre  $10^1$  y  $10^6$  células/mL, en tanto para sedimentos subterráneos esta abundancia alcanza valores entre  $10^4$  y  $10^8$  células/mL de sedimento. Además de estos microorganismos, se han detectado en acuíferos subterráneos Protozoa, Fungi y



representantes de levaduras. Su distribución es estratificada, centrada en las zonas poco profunda, cercanas a la superficie y zonas profundas (Griebler y Lueders, 2009). La mayoría de los procariontes que habitan acuíferos se encuentran adheridos a partículas de sedimento, superficie de rocas, detritus, formando microcolonias o biopelículas (biofilm). Esta adherencia al sustrato es una adaptación ventajosa frente a ambientes con escasos nutrientes y/o carbono, sumado a que las superficies de los sedimentos otorgan mayor diversidad de nichos ecológicos disponibles en el acuífero subterráneo (Griebler y Lueders, 2009).

Duar et al (2017) han develado que las aguas biológicamente estables, contienen microorganismos nativos y no patogénicos, que conforman un microbioma y cohabitan en simbiosis, jugando un rol primordial y evitando el asentamiento de microorganismos patógenos a las fuentes de agua, clasificándolo como una barrera. Ésta propiedad mejora significativamente el proceso de potabilización de estas aguas. El microbioma de estas aguas participa como un filtro biológico conformado por la interacción de las comunidades microbiológicas residentes en el cuerpo acuático (Pinto et al. 2012; Lautenschlager et al. 2014). Estos sistemas ofrecen un reservorio de microorganismos para ser utilizados en procesos de biorremediación. En lagos, es posible encontrar procariontes adheridos a partículas de sedimento, superficie de rocas, detritus, formando microcolonias o biopelículas, y ocupando un gran número de nichos ecológicos (Lindström y Östman. 2011). En tanto en los acuíferos subterráneos se encuentran consorcios bacterianos de  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria,  $\epsilon$ -Proteobacteria,  $\delta$ -Proteobacteria, Bacteroidetes, actinobacterias, Firmicutes, espiroquetas, acidobacterias y bacilos, los que pertenecen a diferentes grupos funcionales que incluyeron organoheterótrofos aeróbicos, bacterias nitrificadoras, manganeso oxidante, sulfuro oxidante, sulfato y hierro reductoras. Todos estos grupos funcionales se pueden encontrar entre los primeros 10 m a 90 m de profundidad (Griebler y Lueders, 2009).

De acuerdo con Yanagida et al (2007), en las fuentes de agua superficiales como los lagos, es posible encontrar bacterias entéricas adaptadas a este tipo de ecosistemas. Estos cuerpos acuáticos pueden presentar distintos niveles de trofía, en donde la disponibilidad de nutrientes es uno de los principales factores que afectan su supervivencia (Barcina et al. 2006). En la naturaleza, las bacterias de origen entérico han desarrollado varios mecanismos de resistencia frente al estrés medioambiental, modificando su expresión genética (Phaiboun et al. 2015), y desarrollando una reprogramación metabólica en donde la célula entra en un estado de resistencia “mejorado”. Bajo estas condiciones de estrés ocurre un fraccionamiento de nicho entre los microorganismos que coexisten; levaduras y bacterias, los cuales comparten el mismo hábitat natural. Dentro de este grupo bacteriano es posible encontrar bacterias del tipo ácido lácticas (BAL) (Duar et al. 2017).

### **1.6 Bacterias ácido lácticas (BAL).**

Las BAL son procariontes Gram (+), no esporulados, ácidotolerantes y de hábitat entéricos, encontrándose en órganos de almacenamiento de alimento como la molleja y el fundus de macroinvertebrados como *Diptera*, *Coleoptera* e *Hymenoptera*, y también en vertebrados superiores como aves, roedores y homínidos. En homínidos se pueden encontrar en la cavidad oral, tracto gastrointestinal y vagina (Walter 2008). Continuamente están expuestas a cambios en su hábitat pudiendo estar presentes en agua residual que se encuentra contaminada con materia fecal de vertebrados e insectos. Esta agua puede entrar en contacto con el suelo, parte de la rizósfera, flores, filósfera e incluso con el néctar (Duar et al. 2017). De acuerdo con Salman y Ahmaed (2019), las BAL poseen una tendencia a formar biopelículas en estos ambientes naturales contaminados, las que pueden durar unos pocos días hasta meses, creando una barrera física contra los compuestos tóxicos, radiación ultravioleta y a cambios de pH. De acuerdo con Kubota et al (2008) la presencia de las



biopelículas de BAL funcionan como control frente al asentamiento de otros microorganismos otorgando una protección al ambiente. Según Sahed y Ahmaed (2020) las BAL que son más propensas a formar biopelículas corresponden a *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* GG. Hartke et al (1998) estudió las adaptaciones morfológicas y fisiológicas de BAL en ambientes oligotróficos, descubriendo que en medios carentes de glucosa desarrollan una modificación en la síntesis proteica por efectos de la inanición, adoptando cambios morfológicos en la pared celular desde las 3 a 7 semanas. Dado lo anterior, si bien las BAL son microorganismos de origen entérico, al entrar en sistemas acuáticos contaminados o con restricción de nutrientes, cambian sus funciones fisiológicas y metabólicas para establecerse en estos ambientes, logrando una exitosa adaptación.

Las BAL se pueden clasificar como alóctonas o autóctonas. Las autóctonas se asientan en poblaciones estables, por largos periodos ejerciendo funciones ecológicas específicas en su hábitat, en tanto las especies alóctonas pueden establecerse en un nicho específico si su introducción en el hábitat se realiza de forma regular (Tannock, 2004).

Zheng et al (2015) clasificaron filogenéticamente al grupo de los lactobacilos dependiendo de la fuente y frecuencia de aislamiento, capacidad metabólica, temperatura de crecimiento y habilidad de resistir a estresores medioambientales, en tres categorías (i) vida libre, (ii) adaptadas al hospedador (asociadas a invertebrados o vertebrados) o (iii) "Nómada" de acuerdo con los conceptos propuestos por Martino et al (2016). En una revisión realizada por Duar et al (2017) se sugiere que esta clasificación responde a una adaptación evolutiva de los lactobacilos a diferentes estilos de vida y a un alto grado de conservación de los nichos ecológicos. Específicamente *Lactobacillus perolens*, *L. sakei*, *L. vaccinoferus*, *L. collinoides*, *L. brevis* y *L. buchneri* corresponden a especies que raramente son encontradas en animales, ubicándose principalmente en el

medio ambiente como formas de vida libre. *L. plantarum* y *L. casei* son un grupo “nómada” que se pueden encontrar en una amplia variedad de nichos tanto ambientales como animales, presentan modificaciones para condicionar la respiración celular y exhiben flexibilidad en la utilización de fuentes de carbono en diferentes hábitats (Duar et al. 2017).

Filogenéticamente las especies de BAL evolucionaron de formas de vida libre y éstas a microbiotas intestinales de vertebrados e invertebrados, cambiando su grado de especificidad de adaptación al hospedador. De acuerdo con George et al (2018) las BAL son parte fundamental y primordial de los ambientes naturales protegiéndolos en los estados de disbiosis, por lo cual también son llamadas “protectoras”.

### **1.7 BAL de vida libre.**

Las BAL de vida libre, evolutivamente han desarrollado modificaciones de sus propiedades metabólicas y fisiológicas, cambiando su metabolismo a aerotolerantes. Sus condiciones óptimas de crecimiento se acotan a temperaturas en hábitats terrestres y acuáticos que comprenden un rango de 15°C a 45°C (Duar et al. 2017). Asimismo, los lactobacilos de vida libre poseen un genoma más grande (mayor a 2.3 kb), lo que les puede otorgar una mayor versatilidad en la codificación de enzimas involucradas en la degradación de pentosas, sacarosa, lactosa, manitol, melecitosa, celubiosa, nitrato, ácido cítrico y ácido málico (Danner et al. 2003).

*Lactobacillus sensu lato*, se agrupan de acuerdo a su metabolismo en homofermentativos y heterofermentativos, los cuales degradan monosacáridos como hexosas y pentosas-hexosas respectivamente, con el propósito de generar moléculas de ATP (Duar et al. 2017). En la naturaleza las pentosas son liberadas luego de la degradación de tejido vegetal por la hidrólisis de la hemicelulosa (Gänzle, 2015). De acuerdo con Siezen y van Hylckama Vlieg (2011) es posible



encontrar a BAL en sustratos ricos en carbohidratos como los de origen vegetal, alimentos vencidos o fermentados o en asociación con el cuerpo de animales.

En sistemas dulceacuícolas existe una gran abundancia y diversidad de BAL, lo que permite inferir que cumplen un rol importante dentro de estos ambientes. Por ejemplo, Byappanahalli et al (2012), Kalinowska et al (2021) han reportado el aislamiento de *Enterococcus faecalis* desde lagos y ríos. Franzmann et al (1991) identificaron a varias BAL psicrófilas como *Carnobacterium spp.*, *C. funditum* y *C. alterfunditum*, aisladas desde agua anóxica de un lago antártico. Mañes-Lázaro et al (2009) identificaron especies de *Lactobacillus aquaticus* de sistemas dulceacuícolas de Corea. Mwirichia et al (2010) aislaron, desde un lago haloalcalino de Kenia, *Enterococcus*, *Alkalibacterium* y *Marinilactobacillus*. González et al (1999) identificaron especies de BAL en nueve ríos de la región Noreste de España, tales como *Carnobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* Lauzon y Ringø (2011) lograron identificar a especies de *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Weissella*, y *Marinilactibacillus* que habitan tanto en aguas continentales como marinos. Yanagida et al (2007) investigaron el aislamiento y caracterización de BAL desde 22 lagos en la prefectura de Yamamashi, Japón, encontrando 12 especies de bacterias lácticas; *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *Carnobacterium sp.*, *C. maltaromaticum* y *Weissella cibaria*.

### **1.8 Características probióticas de las BAL.**

Las propiedades probióticas de las BAL son utilizadas y estudiadas para realizar una caracterización de aquellas bacterias que son resistentes y tolerantes a metales pesados. Nanda et al (2019) realizaron una revisión de los mecanismos de tolerancia bacteriana a metales pesados, describiendo los mecanismos celulares que están involucrados en la resistencia o tolerancia. Estos corresponden a (a) expulsión, ocurre cuando las concentraciones del metal se

vuelven tóxicas intracelularmente, activando proteínas transportadoras tipo ATPasa que expulsan el metal, (b) barreras extracelulares, alteración en la producción de la proteína de membrana impidiendo la entrada del metal, (c) secuestro extracelular, regulado por proteínas extracelulares que secuestran el metal para su absorción, (d) secuestro intracelular, mediado por un operón, que permite la acumulación del metal cuando los niveles se vuelven tóxicos en la célula, y (e) reducción del ion metal, regulado por proteínas del tipo reductasa. La reacción de la catalasa es una característica de las BAL, que se asocia a propiedades mévalo-resistentes, ya que las BAL habitan ambientes anóxicos como lodos sanitarios y plantas de tratamiento de agua residual los cuales presentan una significativa concentración de metales pesados. (Bhakta et al. 2012). La propiedad probiótica hidrofobicidad de la superficie celular está relacionada con la adhesión de las BAL con hidrocarburos (Kaczorek et al. 2008). Esta propiedad es principalmente utilizada en los procesos de degradación de contaminantes hidrocarbonados (Obuekwe et al. 2009). Por ejemplo, ciertas bacteria Gram (+) poseen la habilidad de cambiar su hidrofobicidad celular dependiendo de su medio ambiente circundante (Torres et al. 2011). De acuerdo con Halttunen et al (2008), la remoción de contaminantes ocurre porque existe una interacción entre dos características de las BAL que corresponden a la hidrofobicidad y el índice de autoagregación. Elsanhoty et al (2016) comprobaron que el porcentaje de hidrofobicidad aumenta cuando se mezclan cepas de BAL, sin embargo, la autoagregación puede reducir el contacto del analito a la superficie celular.

Existe una prueba preliminar para identificar la tolerancia a metales pesados la que corresponde a la concentración mínima inhibitoria, la cual se utiliza para determinar e identificar cuál microorganismo es tolerante a una concentración estándar de un metal y cuál no es tolerante. En este sentido, Huet y Puchooa (2017) encontraron que *Enterococcus* spp. presentan una muy buena tolerancia en medio MRS enriquecido con 10 mg L<sup>-1</sup> de Hg, As, Cr o Pb.



### 1.9 Remediación por BAL en medios acuosos.

La biorremediación de metales por BAL se basa en la capacidad metabólica de los microorganismos para transformar los contaminantes en sustancias menos nocivas y no peligrosas, ocurre por mecanismos biológicos tales como biosorción y bioacumulación, disminuyendo su presencia en el medio circundante. Ameen et al (2020), Kargar y Hadizadeh Shirazi (2020), Halttunen et al (2007), Halttunen et al (2008), Huët y Puchooa (2017), Elsanhoty et al (2016), Kirillova et al (2017), Yilmaz et al (2010), Bhakta et al (2010), Li et al (2017), han estudiado el uso de BAL en la remediación de agua contaminada con metales pesados. De acuerdo con Saheh y Ahmaed (2020), este tipo de biorremediación ocurre por la unión del metal con estructuras específicas de la pared celular, como peptidoglicano, ácidos teicoicos, ácidos lipoteicoicos, proteínas de la capa-S y en algunas especies podemos encontrar polisacáridos neutros, que en su conjunto conforman la adhesión a las macromoléculas. Mrvčić et al (2012) postulan que sólo es necesario un periodo entre cinco minutos a una hora para una unión eficiente del metal con la bacteria. Halttunen et al (2007) indican que tras cinco minutos se logra una unión efectiva entre célula-metal. Esta remoción puede suceder por dos mecanismos (i) bioacumulación y (ii) biosorción. La bioacumulación es un proceso de transporte asociado al metabolismo en el cual, el ion-metal atraviesa la membrana celular, acumulándose en el citoplasma (Chojnacka, 2010), como por ejemplo *Leuconostoc mesenteroides* que bioacumula zinc (Mrvčić et al. 2009). La biosorción es la absorción del metal en la célula, coadyudando a los procesos de bioapagado o “*bioquenching*” del metal, facilitando el cambio del estado de valencia del analito a una menos tóxica (Patel et al. 2018). Una desventaja de este método es que al ocurrir un incremento del crecimiento bacteriano los puentes de unión se saturan, deteniendo la biosorción (Dai et al. 2019). En **Tabla 3** se detallan las diferentes especies investigadas para remoción de metales en soluciones acuosas y aguas residuales.

**Tabla 3:** Bacterias ácido lácticas utilizadas para la remoción de metales pesados en soluciones acuosas.

Especie	Analito removido	Referencia
<i>Lactobacillus paracasei</i> ML13, <i>L. paracasei</i> ML35, <i>L. paracasei</i> CH135, <i>L. paracasei</i> CH139, <i>L. parabuchneri</i> ML4, <i>Enterococcus faecalis</i> CH121, <i>E. faecalis</i> CH124 y <i>Lactobacillus plantarum</i> CH131,	Se	Mörschbacher et al. 2018
<i>Lactobacillus plantarum</i> MF042018	Ni (II), Cr (II)	Ameen et al. 2020
<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	Ag	Milanowski et al. 2017
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> KLDS1.0207	Pb	Li et al. 2017
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103), <i>L. casei</i> Shirota, <i>L. fermentum</i> ME3, <i>Bifidobacterium longum</i> 2C, <i>B. longum</i> 46, <i>B. lactis</i> Bb12, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. pseudomesenteroides</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> biovar. <i>diacetyllactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .	Cd, Pb	Halttunen et al. 2007
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, <i>L. rhamnosus</i> LC705, <i>Propionibacterium freudenreichii shermanii</i> JS, <i>Bifidobacterium breve</i> Bbi 99/E8	Cd, Pb, MC-LR, AFB1	Halttunen et al. 2008
<i>Lactobacillus</i> spp.	Cd, Pb	Kirillova et al. 2017
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> Lb.12, <i>Streptococcus thermophilus</i> ST-M7	Fe (II) y Zn (II)	Sofu et al.2015
<i>L. acidophilus</i>	As (III)	Elsanhoty et al. 2016
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. plantarum</i> .	Zn	Mrvčić et al. 2009
<i>L. fermentum</i>	Cu, Zn	Kargar y Hadizadeh-Shirazi, 2020
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> (ATCC 25866), <i>B. brevis</i> (ATCC 15700), <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 4356), <i>L. delbruecki</i> var. <i>bulgaricus</i> (ATCC 11842), <i>L. plantarum</i> (ATCC 14917), <i>Streptococcus thermophilus</i> (ATCC 19258)	Fe (II)	Kot et al. 1995
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	Pb	Salman y Ahmaed 2019
<i>Lactobacillus reuteri</i> Cd70-1, <i>L. reuteri</i> Pb71-1	Cd, Pb	Bhakta et al. 2012
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pb	Jaafar et al. 2020
<i>Enterococcus</i> spp.	Hg, Cd, Cr (VI), Pb	Huet y Puchooa 2017; Bhakta et al. 2010
<i>E. faecium</i>	Cu (II)	Yilmaz et al. 2010
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium angulatum</i>	Cd, Pb, As, AFB1	Elsanhoty et al. 2016

Monachese et al (2012) proponen que (i) la habilidad de los lactobacilos para unirse a los metales depende de los mecanismos de resistencia de las cepas, para el caso del As y Hg, el principal mecanismo de resistencia es mediante la expulsión del metal tóxico desde el citosol a través de proteínas transportadoras disminuyendo la concentración interna y por consiguiente el daño intracelular, y (ii) los sitios de unión de los metales catiónicos a la pared celular se ven afectados



por los cambios de pH del medio, mencionando que el pH neutro, es el óptimo para la unión del metal con la pared celular.

Mörschbacher et al (2018) evaluaron la bioacumulación de selenio (Se) desde medios acuosos en *Lactobacillus paracasei* ML13, *L. paracasei* ML35, *L. paracasei* CH135, *L. paracasei* CH139, *L. parabuchneri* ML4, *Enterococcus faecalis* CH121, *E. faecalis* CH124 y *Lactobacillus plantarum* CH131, encontrando que el rango de concentración para que ocurra la bioacumulación, es entre 20 a 200 mg L<sup>-1</sup>. de selenito de sodio, logrando un 38.1 ± 1.7 mg g<sup>-1</sup>. y 40.7 ± 1.1 mg g<sup>-1</sup> de bioacumulación respectivamente. Milanowski et al (2017), investigaron la biosorción de Ag en *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus casei*, encontrando que las BAL funcionan de buena manera, absorbiendo entre 70 a 96% de Ag en soluciones con 1 mg L<sup>-1</sup>. del metal.

Singh y Sarma (2010), utilizaron *Lactobacillus acidophilus* para remover As(III) de soluciones con concentraciones de entre 50 ppb a 2000 ppb, encontrando que a medida que aumenta la biomasa de *L. acidophilus* y el tiempo de contacto, mayor es la remoción de As(III). Una concentración de peso seco de 1 mg mL<sup>-1</sup> es capaz de remover 30 ppb, 60 ppb, 300 ppb, 420 ppb y 600 ppb de As(III) en soluciones de 50 ppb, 100 ppb, 500 ppb, 1000 ppb y 2000 ppb, del metal, respectivamente. Si se incrementa la biomasa en peso seco a 2 mg mL<sup>-1</sup> la remoción aumenta a 1.66, 1.33, 1.16, 1.42 y 1.33 veces en comparación con el primer ensayo realizado, en ambas experiencias el pH de trabajo fue entre 3 a 7, en donde a pH 7 y con un tiempo de contacto de 3 horas se obtuvo la máxima remoción de As(III).

Sofu et al (2015) aplicaron un diseño experimental para remover Fe(II) y Zn(II) utilizando 2 especies de bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, aisladas de efluentes de aguas residuales, en donde pudieron evaluar qué en soluciones de 100 mg L<sup>-1</sup>. de Fe(II)

y Zn(II) y utilizando una concentración de 10 g L<sup>-1</sup> de cada una de las especies y una mezcla de ambas, a temperatura de 30 °C., y pH de 6 se logra una remoción de Fe(II) sobre 60%. En tanto para una remoción óptima de Zn(II) por sobre el 60% se debe utilizar una biomasa de 15 g L<sup>-1</sup>. a pH 9 y a 40 °C.

Kot et al (1995) realizó una descripción del mecanismo de acumulación del hierro en bacterias ácido lácticas y bifidobacterias, como; *Bifidobacterium thermophilum* (ATCC 25866), *B. brevis* (ATCC 15700), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), *L. delbruecki var. bulgaricus* (ATCC 11842), *L. plantarum* (ATCC 14917), *Streptococcus thermophilum* (ATCC 19258), detallando que el hierro acumulado es asimilado por bacterias del grupo LAB y bifidobacterias como estrategia de disponibilidad frente a otras bacterias patógenas ya que disminuye la concentración disponible del metal en el medio. En ciertos casos el hierro es asimilado intracelularmente y oxidado por ferroxidasas y precipitado como Fe(OH)<sub>3</sub>, esto ayuda a mantener las concentraciones intracelulares de Fe<sup>+2</sup>. Las bifidobacterias y el grupo lactobacilos acumulan Fe<sup>+2</sup>, en medios de cultivo a los cuales se agregó glucosa. En medios sin glucosa la acumulación es menor que con glucosa, excepto *L. delbruecki var. bulgaricus* (ATCC 11842) que acumulo 168 % más de hierro en medio sin glucosa. La acumulación de Fe<sup>+2</sup> ocurre de forma automática, uno de los interferentes en esta unión metal-célula es el magnesio, el cual inhibe la asimilación de Fe<sup>+2</sup> cuando está presente en el agua. El mecanismo para *Bifidobacterium* spp, se describe como una remoción de hierro desde el medio por internalización intracelular, pero cuando el oxígeno está presente se oxida parcialmente a forma insoluble Fe(OH)<sub>3</sub> por ferroxidasas putativas. En tanto, el grupo de lactobacilos presenta similar forma de remoción, pero el aumento de la temperatura ayuda a la oxidación del hierro, en este caso la remoción de hierro por bacterias lácticas no está influenciado por el magnesio, sin embargo, para el caso de las bifidobacterias está fuertemente inhibido por este metal, esta diferencia se puede deber a la función permeasa del hierro para los distintos tipos de bacterias. Metabólicamente en la acumulación de hierro la liberación de energía es regulada por el potencial redox del aceptor terminal de



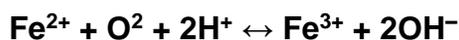
electrones, bajo condiciones anaerobias las bacterias utilizan nitrato,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Mn}^{+4}$ ,  $\text{SO}_4$  y  $\text{CO}_3$ .

En aguas subterráneas, el medio es reductor, el ion ferroso se encuentra en concentraciones elevadas, en presencia de oxígeno el ion ferroso se oxida a ion férrico, el  $\text{Fe}^{3+}$  se hidroliza y precipita como forma insoluble  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Adicionalmente, en este tipo de cuerpos freáticos las concentraciones de hierro elevadas se deben a que el manto freático constituido por capas de rocas y suelo que se componen en mayor concentración por Fe sólido y que en presencia con agua y oxígeno se oxida a  $\text{Fe}^{2+}$ , sumado a la presencia de materia orgánica del suelo que absorbe el oxígeno del agua. (Majkić-Dursun et al. 2015; Morgan y Lahav. 2007).

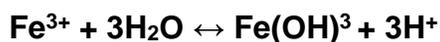
Normalmente las aguas subterráneas con gran carga orgánica suelen tener mayor hierro produciéndose asociaciones y complejos entre ellos, cuya eliminación y potabilización es compleja.

Majkić-Dursun et al (2015) estudio el origen de la oxidación del hierro, indicando las reacciones estequiométricas que se producen, y el origen de las incrustaciones sólidas en los sistemas de conducción de agua, señalando lo siguiente:

La oxidación del hierro en presencia de oxígeno disuelto esta expresado como:



Produciendo inmediatamente  $\text{Fe}^{3+}$  a la forma hidrolizada:



La reacción general que describe la formación de incrustaciones de hierro insoluble está dada por:



Bajo condiciones de insaturación, que están presentes en fuentes subterráneas, ocurren reacciones de óxido-reducción, en donde la reducción de contaminantes es mayor, provocando una disminución de la permeabilidad del acuífero. El hierro en acuíferos confinados se encuentra en su estado más reducido ( $\text{Fe}^{+2}$ ) y que en el contacto con el oxígeno formara óxidos de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) (Majkić-Dursun et al. 2015; Morgan y Lahav, 2007), en este sentido la utilización de LAB para biosorber el hierro presente en el agua se debe realizar bajo condiciones de anoxia. En ausencia de oxígeno los anaerobios utilizan preferentemente aceptor de electrones basados en la energía libre ganada por la reducción de un aceptor de electrones. Las LAB anaerobias facultativas degradan la materia orgánica a una tasa más baja en ausencia de oxígeno (Kot et al. 1995).

Haltunnen et al (2007) investigaron la remoción de Pb y Cd en cepas de *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) (Valio Ltd., Helsinki, Finland), *L. casei* Shirota (Professor Y-K Lee, Yakult Singapore Pty. Ltd., Singapore), *L. fermentum* ME3 (University of Tartu, Tartu, Estonia), *Bifidobacterium longum* 2C (Probiotal srl, Novara, Italy), *B. longum* 46 (Probiotal srl, Novara, Italy), *B. lactis* Bb12 (Chr. Hansen Ltd., Horsholm, Denmark) y dos cultivos comerciales; FV-DVS XT-303-eXact (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. pseudomesenteroides* y *L. lactis* biovar. *diacetylactis*) y YO-MIX 401 (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) (Danisco Niebüll GmbH, Niebüll, Alemania), obteniendo que la unión del  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  ocurre rápidamente en todas las cepas estudiadas, la unión del  $\text{Cd}^{2+}$  (10 mg L<sup>-1</sup>) a pH 6 y  $\text{Pb}^{2+}$  (50 mg L<sup>-1</sup>) a pH 5 están en un rango de  $61.8 \pm 3.3\%$  -  $87.8 \pm 2.9\%$  y  $30.2 \pm 7.9$  –  $92.6 \pm 1.9\%$ , respectivamente.

Mrvčić et al (2009) proponen que hay una competencia entre los iones metálicos con los H<sup>+</sup> en los sitios de unión de la pared celular, en medios de alta concentración de H<sup>+</sup>, pH ≤ 3, hay pérdida de la actividad de unión en el analito y



la pared celular, en cambio a bajas concentraciones de  $H^+$ , pH 6, en la solución, la concentración de metales se vuelve despreciable y los grupos carboxilos de la pared celular, que poseen carga eléctrica negativa (-), participan en una unión eficiente con el metal, el que posee carga eléctrica positiva (+), haciendo eficiente el proceso. Sin embargo, es posible observar que a  $pH > 6$  ocurre precipitación, tal es el caso de  $Fe(II)$ , el cual se oxida a  $Fe(OH)_3$ .

El tratamiento de descontaminación de masas de agua mediante la biorremediación por BAL permite la recuperación de estas fuentes de manera ventajosa desde el punto de vista ambiental y económico industrial. Los tratamientos biológicos permiten una restauración *in situ* evitando procesos costosos en tratamiento. Dado lo anterior, la aplicación de BAL a sistemas acuáticos contaminados (i) biorremediará aguas contaminadas con hierro total, (ii) no generará residuos tóxicos, (iii) evitará la precipitación de metales en las redes de conducción del agua, (iii) facilitará el proceso de tratamiento y producción de agua potable, (iv) disminuirá la adición de productos químicos abatidores de contaminantes del agua. Por lo tanto se propone crear un consorcio de bacterias benéficas aisladas desde cuerpos acuáticos naturales de la zona central de Chile, para esto los ejes en que se basa este estudio estarán orientados a (i) desarrollar un consorcio de bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas para la remoción y/o reducción de contaminantes del agua, (b) aplicar el consorcio de bacterias benéficas a sistemas acuáticos mejorando su calidad a través de la biorremediación y (iii) recuperar las fuentes saturadas que han sido abandonadas o que se encuentren fuera de uso. Para lo cual se ecodiseñará un producto biotecnológico de alta calidad en base a un consorcio de bacterias ácido lácticas, con propiedades probióticas, aisladas desde cuerpos acuáticos superficiales como vertientes y esteros de Chile central, que cumplen requisitos de mejoras operacionales y fomenten la economía circular.

Este producto será desarrollado para la aplicación al proceso de potabilización del agua, en la etapa de captación. Como primera alternativa se encuentra su dosificación en estanques de almacenamiento de agua contaminada de diversa capacidad. Como segunda alternativa es su utilización en aquellas fuentes subterráneas de agua para potabilización que se encuentren colmatadas de contaminantes, acá el tratamiento se realizará *in situ*, utilizando las cañerías pozo métricas destinadas para medir los niveles freáticos en donde el consorcio se aplicará y llegará directamente a la napa subterránea, permitiendo la remoción y por consiguiente se explotará agua de mejor calidad con menor concentración de contaminantes. Ambos métodos permitirán un ahorro estimado del 30 % del presupuesto asignado para prospección de nuevas fuentes.

En la perspectiva empresarial, existen fuentes de agua para potabilización que se encuentran abandonadas, fuera de uso o cuya explotación se reduce en las horas de funcionamiento de las bombas de succión, entonces para aquellas fuentes que se encuentren bajo este espectro se acumulará esta agua en estanques, siendo tratada con el consorcio benéfico por al menos dos horas como tiempo de contacto, o bien se aplicara el consorcio directamente a las napas subterráneas de agua para potabilización.



## Capítulo 2: Hipótesis y objetivos

### 2.1 Hipótesis científica.

- a) Las bacterias ácido lácticas, originarias de cuerpos acuáticos naturales, son capaces de remover elementos inorgánicos como hierro total, favoreciendo el proceso de potabilización del agua.

### 2.2 Hipótesis de bionegocio.

- b) La aplicación de un consorcio de bacterias ácido lácticas a fuentes de agua para potabilización que se encuentren contaminadas, recuperará los acuíferos, mejorando su calidad, activando la explotación de fuentes de captación abandonadas y reduciendo los costos de tratamiento del agua e inversiones en nuevas obras de infraestructura.

### 2.3 Objetivos.

1. Desarrollar un consorcio de bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas para la remoción y/o reducción de contaminantes del agua
2. Aplicar el consorcio de bacterias probióticas a sistemas acuosos mejorando su calidad a través de la biorremediación.
3. Recuperar las fuentes saturadas que han sido abandonadas o que se encuentren fuera de uso.

## Capítulo 3: Metodología.

### 3.1 Proceso creativo.

Para el desarrollo del proceso creativo de esta propuesta se utilizó la metodología *Design Thinking* de acuerdo a sus 5 fases basadas en; observar, detectar necesidades y, finalmente, solucionarlas (Figura 2).



Figura 2: Metodología para proceso creativo *Design Thinking*.

#### 3.1.1 Fase 1: Empatizar.

Para el desarrollo de esta fase se observaron los problemas que presentan las obras de captación para potabilización de agua y su calidad, reconociendo las soluciones actuales a esta problemática y como se podrían mejorar. Existe una clara evidencia en la disminución de la vida útil de las obras de infraestructura cuya causa se debe a la saturación de los cuerpos freáticos con contaminantes del tipo metálicos como hierro total, que ha ido en aumento durante este último periodo, afectando los procesos de abatimiento clásico de metales, ya sea por oxidación con cloro gas, hipoclorito de sodio y/o permanganato de potasio, resultando en el abandono de la fuente de captación, y dando comienzo a la búsqueda de nuevas fuentes para potabilización, perdiendo la inversión inicial realizada.



### **3.1.2 Fase 2: Definir.**

En esta fase se investigó las soluciones biotecnológicas aplicadas en el área de abatimiento de metales para el mejoramiento del agua a nivel nacional y mundial, eligiendo aquellas técnicas que eliminen, reduzcan o remuevan los metales del agua, sean biodegradables y no generen residuos tóxicos para el medio ambiente. Estas tecnologías se deben adecuar a las necesidades de la empresa sanitaria, normativas, organizacionales y sociales, integrando diversas variables con una visión estratégica que satisfaga los requerimientos del entorno. Luego de esta búsqueda de información se optó por la tecnología de biorremediación debido a que son métodos que remueven altas concentraciones de metales, tienen un bajo consumo energético y son de bajo costo. Asimismo, los microorganismos biorremediadores elegidos serán bacterias ácido lácticas (BAL), escogidas por tres razones; (i) su capacidad para remover metales pesados por biosorción, (ii) en el ser humano adsorben y bioacumulan sustancias tóxicas generando una “protección” en su ambiente, que se puede replicar en el medio ambiente y (iii) para tecnologías dirigidas a alimentos, solo se pueden utilizar bacterias aptas para aquello, y las BAL cumplen con este requerimiento debido a sus propiedades probióticas (Huët y Puchooa. 2017; Mrvčić et al. 2012). Estas bacterias se aislarán desde cuerpos acuáticos locales, tales como esteros y vertientes.

### **3.1.3 Fase 3: Idear.**

En esta etapa, se confeccionó el modelo de negocio que sustenta el desarrollo y la propuesta de valor del producto “Naturewaters Probiotics”. Se propuso como propuesta de valor, “Biorremediar fuentes de agua contaminada a través de la aplicación de un producto natural e innovador hecho a base de BAL locales cuyo objetivo es recuperar los acuíferos mejorando la calidad de agua, entregando confianza y seguridad a nuestros clientes”.

Se estableció el segmento de clientes, los canales, la estructura de ingresos y costos asociados, las alianzas estratégicas que permiten el desarrollo del producto, la relación con el cliente, proveedores claves y los recursos y actividades que son importantes para que el producto pueda ser creado.

#### **3.1.4 Fase 4: Prototipar.**

Se estableció que el prototipo a desarrollar de “Naturewaters Probiotics”, consiste en una emulsión constituida por un consorcio de bacterias ácido lácticas de concentración  $10^7$  UFC/100 mL, seleccionadas por su capacidad de crecimiento en medios ricos en hierro, su capacidad de remoción y sus propiedades probióticas. La presentación de este producto será en formato de emulsión de 2 g/L de BAL. A la emulsión obtenida se le realizarán pruebas de laboratorio en cuanto a la remoción de metales en medios acuosos.

#### **3.1.5 Fase 5: Evaluar**

En esta fase y ya obtenidos los resultados de las pruebas de campo se definió como estrategia del negocio un modelo de integración tecnológica del producto, es decir una presentación del producto, a través de la divulgación del consorcio benéfico a empresas objetivas como sanitarias regionales categorizadas como grandes, pequeñas, y cooperativas de agua potable rural de la zona Bío Bío cordillera y costa. Como segunda estrategia de negocio se decidió el modelo de transferencia tecnológica entre la Universidad San Sebastián con empresas del rubro. La variabilidad económica del proyecto se determinó utilizando los indicadores VAN y TIR a un plazo de 5 años.



### 3.2 Modelo de negocios.

Tabla 4: Modelo de negocios Canvas.

<p><b>1. Segmento clientes</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>•Empresas sanitarias</li><li>•Cooperativas agua potable rural</li><li>•Personas naturales</li></ul> <p><b>•Early adopters</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>•ESSBIO S.A. y Aguas San Pedro S.A.</li></ul>	<p><b>2. Problema</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>•Contaminación napas subterráneas y agua potable de mala calidad.</li><li>•50.000 clientes afectados.</li><li>•Explotación de nuevas fuentes de agua para potabilización.</li><li>•A nivel nacional se comercializan consorcios bacterianos que se aplican para biorremediación en agua residual y lodos sanitarios.</li></ul>	
<p><b>3. Propuesta única de valor</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>•Biorremediar fuentes de agua contaminada a través de la aplicación producto natural, innovador hecho a base de BAL locales cuyo objetivo es recuperar los acuíferos mejorando su calidad de agua y así entregar confianza y seguridad a nuestros clientes</li><li>•Seremos una empresa innovadora en el área de biorremediación por BAL y pioneras en la implementación de economía circular en la recuperación de fuentes de captación.</li></ul>	<p><b>4. Solución</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>•Aplicar un consorcio de bacterias ácido lácticas, obtenidas y aisladas de vertientes y esteros locales, a fuentes de captación de agua para potabilización que se encuentren contaminadas y/o en estanques de acumulación de agua.</li></ul>	
<p><b>5. Canales</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>•Campañas publicitarias a través de redes sociales y portales web relacionados al tratamiento del agua.</li><li>•Visitas a empresas, envíos de presentación de la innovación a través de correo electrónico.</li><li>•<b>Aliados estratégicos;</b> OIKOS Chile LTDA, y Probionature LTDA.</li><li>•<b>Socios comerciales;</b> ANASAC, Inversiones Nutraterra S.A., BTS Intrade Laboratorios. Agrocomercial Buenas Prácticas Ltda.</li></ul>	<p><b>6. Flujo de ingresos</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>•El flujo de ingreso será por venta directa a través de tiendas digitales.</li><li>•Ingreso por comisión, que se dará entre los distribuidores OIKOS Chile LTDA y Probionature LTDA.</li></ul>	
<p><b>7. Estructura de costos</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>•Costos variables: Medios de cultivo, insumos, reactivos, soluciones, material fungible, material de terreno, costos de marketing.</li><li>•Costos fijos: Sueldos, servicios básicos, gastos oficina.</li><li>•Inversión: Equipos de medición portátiles.</li><li>•Gastos operaciones: 12%, Gastos administración: 12 %, Utilidad: 72%, Depreciación: 1 % todo en promedio 3 años.</li></ul>	<p><b>8. Métricas</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>•Ingresos</li><li>•Remoción</li><li>•Cuantificación</li><li>•Recuperación</li></ul>	<p><b>9. Ventaja especial</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>•Utilización de BAL locales para la recuperación de fuentes para potabilización desde su captación</li><li>•Aliados estratégicos</li></ul>

Como método para establecer el modelo de negocios, se utilizó el modelo Canvas (**Tabla 4**). A continuación, se describen sus bloques.

### **3.2.1 Selección de clientes**

La emulsión de consorcio de bacterias ácido lácticas (Naturewaters Probiotics), está desarrollado para recuperación captaciones de agua para potabilización que se encuentren saturadas por hierro total, color verdadero y turbiedad nefelométrica de propiedad de empresas sanitarias, cooperativas de agua potable rural y personas naturales que cuenten con sus propias fuentes de agua. Se definió como segmento *Early adopters* a empresa sanitaria Aguas San Pedro S.A. y ESSBIO S.A.

### **3.2.2 Problema**

Dentro del mundo sanitario y de los problemas que se enfrentan por escasez hídrica, se observó que existe una evidente contaminación de napas subterráneas, lo que está generando que el agua potable producida sea de mala calidad, provocando el abandono de la obra de captación y activando la prospección de nuevas fuentes de agua. Actualmente, a nivel nacional se comercializan consorcios bacterianos que se aplican para biorremediación en agua residual y lodos sanitarios.

### **3.2.3 Propuesta única de valor.**

La propuesta única de valor para este bionegocio se centra en biorremediar fuentes de agua contaminada a través de la aplicación Naturewaters Probiotics, producto natural, innovador hecho a base de BAL locales cuyo objetivo es recuperar los acuíferos mejorando su calidad de agua y así entregar confianza y seguridad a nuestros clientes.



### 3.2.4 Solución.

Aplicar Naturewaters Probiotics a fuentes de captación de agua para potabilización que se encuentren contaminadas y/o en estanques de acumulación de agua.

### 3.2.5 Canales.

Los canales que tendrá Naturewaters Probiotics serán por campañas publicitarias a través de redes sociales y portales web relacionados a la potabilización del agua. Se creará una página web en la cual se ofrecerá y venderá el producto. También se realizarán visitas a empresas y envíos de presentaciones de la innovación a través de correo electrónico.

### 3.2.6 Flujo de ingresos.

El modo principal de obtención de ingresos que tendrá el bionegocio está dado por venta directa a través de tiendas digitales y por ingreso por comisión, que se dará entre los distribuidores OIKOS Chile LTDA, Probionature LTDA, y SolBioChile S.A.

### 3.2.7 Estructura de costos.

La estructura de costos de acuerdo a la evaluación económica del producto Naturewaters Probiotics (**Tabla 5**), arrojo lo siguiente:

**Tabla 5:** Estructura de costos Naturewaters Probiotics.

Items/ Años	1	2	3	4	5
<b>INGRESOS</b>					
Ventas		100%	100%	100%	100%
<b>EGRESOS</b>					
Costos Variables de Producción		0%	1%	1%	1%
Gastos Operaciones		39%	22%	10%	8%

<b>Gastos Administración</b>		33%	18%	9%	6%
<b>Gastos Marketing</b>		30%	17%	8%	6%
<b>Depreciación y Amortización</b>		8%	4%	2%	0%
<b>Gastos financieros</b>		0%	0%	0%	0%
<b>Utilidad</b>		-11%	38%	70%	79%

Fuente: Elaboración propia

Como costos variables fueron considerados los medios de cultivo, insumos de laboratorio, reactivos, soluciones, material fungible, material de terreno, costos de marketing. En costos fijos se agruparon los sueldos, servicios básicos y gastos de oficina.

Para inversión se incluyeron equipos de medición portátil para terreno, turbidímetro Marca HACH 2100P, Kit Estándar de calibración y verificación de formazina, pHmetro HQ40D y su respectiva sonda, soluciones tampón pH 4,00-7,00-10,01 para calibración y verificación. Se considera la compra de un automóvil para terreno.

Se propone que en un promedio de 3 años los gastos operaciones sean de un 13 %, Gastos administración: 13 %, Utilidad: 63 %, Depreciación: 2 % y Gastos en marketing 10 %.

### 3.2.8 Métricas claves.

En este bionegocio se identificaron cuatro indicadores de desempeño, los cuales se enumeran a continuación:

- I. Ingresos
- II. Remoción
- III. Cuantificación
- IV. Recuperación



### 3.2.9 Ventajas especiales

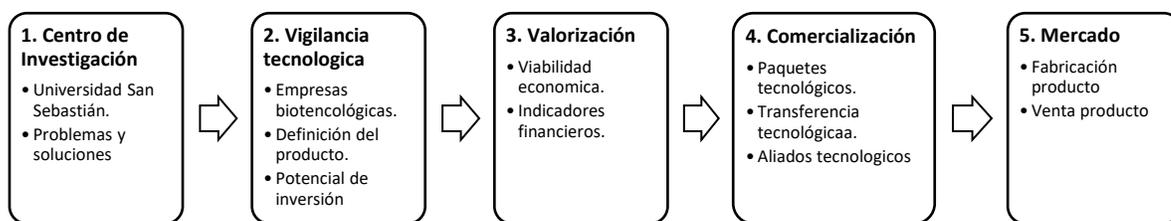
La gran ventaja que posee Naturewaters Probiotics es la recuperación de fuentes para potabilización, en la etapa de captación de agua

Durante el desarrollo del proceso creativo se lograron identificar a empresas que distribuyen productos biotecnológicos en el mercado nacional y también a empresas que producen biomasa bacteriana para investigación, estas fueron seleccionadas por su experiencia y trayectoria en el rubro de la biotecnología. Como aliados estratégicos se encuentra OIKOS Chile LTDA, que comercializa consorcios bacterianos para la biorremediación de suelos, agua residual y lodos sanitarios o industriales, SolBioChile S.A. que entrega servicios para soluciones biotecnológicas a empresas e industrias sanitarias y Biohidrica LTDA, que comercializa productos relacionados con la detección y control de la contaminación ambiental, microbiológica y biominera. Estas empresas se contactarán cuando ya se ha obtenido y probado Naturewaters Probiotics para su distribución en el mercado. Por otra parte la empresa Probionature LTDA, será la encargada del desarrollo de esta innovación, siendo la Universidad San Sebastián la institución que proporcionará el *Know-How* fundamental para la producción del probiótico.

Probionature LTDA será el aliado estratégico ya que posee la tecnología para el desarrollo de biomasa de manera industrial, siendo una empresa clave en el proyecto, entrará en este proyecto en la etapa de formulación del consorcio, entregando las cepas que conforman el consorcio a comercializar de manera nacional.

### 3.3 Estrategia de negocio.

La estrategia del negocio se detalla en la figura 3:



**Figura 3:** Esquema de estrategia de negocio de Naturewaters Probiotics.

A continuación se detallan las etapas de la estrategia de negocio.

### **3.3.1 Centro de investigación.**

En esta etapa se llevó a cabo la investigación básica/aplicada, generando el desarrollo de la propuesta de producto de acuerdo con lo detallado en el capítulo 3, punto 3.1.3 y 3.1.4.

### **3.3.2 Vigilancia tecnológica.**

La vigilancia tecnológica se realizó haciendo una búsqueda exhaustiva de las soluciones desarrolladas por empresas biotecnológicas locales e internacionales. Luego de lo cual se definió el producto estableciendo el potencial de inversión.

### **3.3.4 Valorización.**

En esta etapa, luego de la información obtenida por la vigilancia tecnológica, se desarrolló la viabilidad económica tal como se describe en el Capítulo 4, mostrando los indicadores financieros utilizados con la finalidad de verificar la sostenibilidad de esta propuesta para luego dar paso a la protección y patentamiento de los resultados y del producto ante el Instituto Nacional de Propiedad Intelectual (INAPI) en Chile y/u organismo extranjero en Europa y Estados Unidos.

### **3.3.5 Comercialización.**

Para la comercialización se desarrollarán paquetes tecnológicos asociados al licenciamiento y al know-how del producto por medio de contratos a mediano y



largo plazo para así dar paso a la transferencia del conocimiento del producto hacia los aliados tecnológicos.

### **3.3.6 Mercado.**

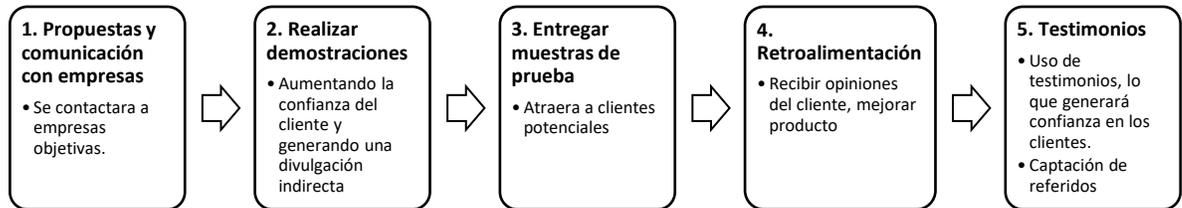
Luego de establecidos los contratos por transferencia tecnológica se dará comienzo a la producción de la innovación y su posterior comercialización y distribución en el mercado.

### **3.4 Estrategia de posicionamiento por beneficios.**

Para esta innovación, la estrategia de posicionamiento por beneficios estará dada en la comunicación de los beneficios exclusivos del producto Naturewaters Probiotics, estando incluido en el ítem gastos marketing indicados en la **Tabla 5**. El concepto del probiótico será “Agua sana desde su captación”, favoreciendo a su posicionamiento en el mercado.

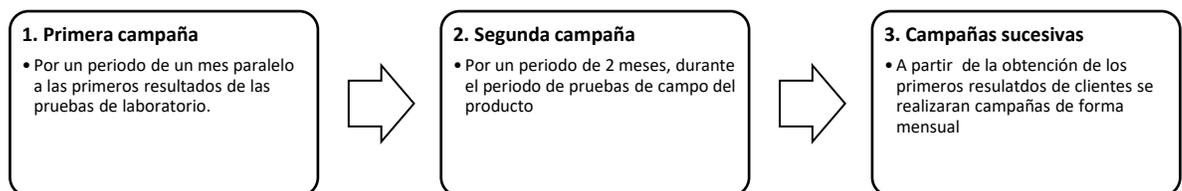
La estrategia está conformada por una integración tecnológica del producto, la que se compone de 5 etapas (Figura 4), la primera etapa corresponde a; (1) propuestas y comunicación con empresas, se contactara a empresas objetivas como sanitarias regionales categorizadas como grandes, pequeñas, y cooperativas de agua potable rural de la zona Bío Bío cordillera y costa norte, en primera instancia, enviando correos corporativos y agendando reuniones explicativas, (2) realizar demostraciones a través de presentaciones del producto, iniciando la apertura de conocimiento por parte del cliente y favoreciendo a una divulgación indirecta, (3) entregar muestra de prueba, facilitar muestras de la tecnología para que puedan realizar pruebas de campo con su propio suministro, lo que le da la tranquilidad y convicción al cliente de la compra del producto y lo más importante es que la incorporación del consorcio en sus procesos significara una real ayuda en el abatimiento de los contaminantes y tranquilidad para producir un agua de calidad que se distribuya a sus clientes. (4) Retroalimentación, en esta etapa se realizarán encuestas de satisfacción del

cliente, recibiendo comentarios, sugerencias y observaciones, que permitirán una mejora continua del producto. (5) Testimonios, como fase final se utilizarán las experiencias de los ensayos de empresas que han implementado esta tecnología a corporaciones que están en proceso de conocimiento y exploración del producto, esto con la finalidad de captar nuevos clientes y referidos de estos.



**Figura 4:** Esquema de integración tecnológica de Naturewaters Probiotics.

La integración se hará por campañas (Figura 5), la primera se desarrollará durante el periodo de prueba del consorcio, a modo de generar expectativa a potenciales clientes y desde el origen comenzar con el establecimiento de contactos y redes, la segunda campaña se hará cuando se realicen pruebas de campo del probiótico, y después mensualmente se realizarán campañas publicitarias en medios digitales y portales web relacionados al tratamiento del agua.



**Figura 5:** Esquema de campañas publicitarias de “Naturewaters Probiotics”, las que serán parte fundamental de la integración tecnológica del producto.



### 3.5 Transferencia tecnológica.

Para lograr una transferencia tecnológica primero se recurrió a realizar una vigilancia tecnológica la cual se logró de acuerdo a estas fases: (a) Identificar el problema y sus necesidades, (b) Obtener la información a través de motores de búsqueda, bases de datos especializadas y en herramientas tales como Scopus, Web of Science (WoS), World Intellectual Property Organization (WIPO), paralelo a esta esquema de búsqueda de información, se utilizó como herramienta a Google Alert (<https://google.cl/alerts>) el cual permitió supervisar en la web nuevos contenidos mediante notificaciones *push* enviadas al correo electrónico una vez al día. (c) Analizar, procesar y valorizar la información, (d) difundir la información para luego, (e) usar la información y decidir sobre que producto ofrecer y como solucionará las necesidades en el área sanitaria.

Para la búsqueda de patentes se utilizó el motor de búsqueda Google Patent. En la **Tabla 6** se muestran las principales patentes de invención relacionadas con la biorremediación y aplicación de bacterias ácido lácticas a medios acuosos con el fin de remover contaminantes o entregar propiedades probióticas.

**Tabla 6:** Patentes relacionadas con el mejoramiento de medios acuosos.

N° patente	Analito removido	Microorganismo	Nombre
US 6719902 B1	Remueve analitos Cromo, Uranio Hierro	<i>Shewanella putrefaciens</i>	FE(O)-BASED BIOREMEDIATION OF AQUIFERS CONTAMINATED MIXED WASTES
US-4519912-A	Remueve Sulfato	<i>Clostridium sp, Desulfovibrio sp, Desulfotomaculum sp.</i>	PROCESS FOR THE REMOVAL OF SULFATE AND METALS FROM AQUEOUS SOLUTIONS
US4522723	Remueve Sulfato	<i>Desulfovibrio and Desulfotomaculum</i>	PROCESS FOR THE REMOVAL AND RECOVERY OF HEAVY METALS FROM AQUEOUS SOLUTIONS
US20140342437A1	Disminuye concentración de demanda bioquímica de oxígeno, sólidos suspendidos totales, nitrógeno total Kjeldahl, y aceites y grasas del agua residual	<i>Bacillus spp Lactobacillus spp</i>	MICROORGANISM-BASED WASTEWATER TREATMENT COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF

CA2839383C	Remueve Hidrocarburos y solventes	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Aspergillus otyzae</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus</i> spp.	MICROORGANISM-CONTAINING COMPOSITION FOR BIOMEDIATION AND AGRICULTURAL USE
WO2007054691A1	Remueve hidrocarburos, tricloroetilenos y fenoles	<i>Arthrobacter</i> , <i>Actinobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> spp, <i>Mycobacteria</i> , <i>Rhodococcus</i> spp, <i>Sphingomonas</i> , <i>fungi que producen peroxidos y laccases</i> , <i>Bacillus</i> spp, <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>mycorrhiza</i> , <i>Rhizobium</i> spp, <i>Frankia</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Anabeana</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Lactobacilli</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconstoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces</i> spp.	BIOREMEDIATION MATERIALS
CA3064942A1	Formación de biofilms sobre partículas de carbón	<i>Bacillus</i> spp, <i>Lactobacillus</i> spp.	METHOD OF GENERATION BACTERIAL COMPOSITIONS COMPRISING A BIOFILM WITH BENEFICIAL BACTERIA
KR101187731B1	Remueve sustancias odoríferas de amonio y amidas	<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	<i>LACTOBACILLUS PARAFARRAGINIS</i> STRAIN HAVING DEODORIZATION ACTIVITY AND WATER PURIFICATION ABILITY IN EEL FARM AND USES THEREOF
RU2372788C2	Aditivo alimentario y para el agua potable	<i>Enterococcus faecium</i> , DSM 16211, <i>Lactobacillus reuten</i> , DSM 16350 y <i>Lactobacillus salivanus</i> ssp. <i>salivanus</i> , DSM 16351, <i>Pediococcus acidilactici</i> , DSM 16210 y <i>Bifidobacterium animalis</i> , DSM 16284.	PROBIOTIC, HEALTH- OR PRODUCTIVITY-STIMULATING FODDER ADDITIVE OR PORTABLE WATER ADDITIVE AND ITS APPLICATION

Las principales diferencias de las patentes presentadas con la invención propuesta son:

- a. Existen dificultades en la preparación de los medios de cultivo específicos para las bacterias a enriquecer debido a los requerimientos energéticos específicos de los grupos;



- b. El sustrato base, se debe complementar con sales y diversas fuentes de nitrógeno para sostener el crecimiento microbiano.
- c. Las patentes fueron realizadas para tratar aguas residuales y suelo, adicionar probióticos al agua potable y para el mejoramiento de los alimentos, no para aguas naturales para potabilización.
- d. Los productos patentados no son aplicados en las captaciones de agua para potabilización.

Tanto en la búsqueda de patentes, alertas y detección de señales se emplearon las siguientes palabras claves:

- Lactic acid bacteria water
- Water Lactobacillus
- Water bioremediation
- Removed metals water

En la actualidad no se evidencian patentes de invención de mezclas de microorganismos utilizados para remover hierro en cuerpos acuáticos saturados, y más aún especificados como de bacterias lácticas.

### 3.6 Análisis económico

Se realizó el análisis económico por medio de la estimación del flujo de caja del proyecto por medio del análisis de sensibilidad evaluando el Valor Actual Neto (VAN), la Tasa Interna de Retorno (TIR), el Retorno sobre la Inversión (ROI) y el Payback en dos escenarios posibles.

Para el cálculo del VAN se utilizó la fórmula que se muestra a continuación:

$$VAN = \sum_{t=1}^n \frac{F_t}{(1+k)^t} - I_0$$

En donde  $F_t$  corresponde al flujo neto en un periodo de tiempo  $t$ ,  $I_0$  es la inversión inicial y el término  $k$  es la tasa de descuento que para fines de evaluación se asumió a 12%. Debido a que en el índice IPSA durante los últimos 5 años (2015-2020) su variación fue negativa en comparación con el índice bursátil Dow Jones de Norteamérica en donde su variación promedio anual no supera el 5% además cabe mencionar que la inflación en nuestro país se encuentra en un 3%, por tanto, la tasa de descuento está acorde con proyectos de plazo 5 años.

La TIR se calculó de la siguiente forma:

$$\sum_{t=0}^n \frac{FC_t}{(1 + TIR)^t} = 0$$

$FC_t$  corresponde al flujo de caja cuando VAN equivale a cero en un periodo de tiempo  $n$ .

Otro parámetro utilizado fue el Retorno sobre la Inversión dado que nos entrega información sobre la rentabilidad del proyecto. Este fue calculado en un periodo de 5 años acorde a la siguiente fórmula:

$$ROI = \frac{\text{Ganancia} - \text{Inversión}}{\text{Inversión}} \times 100$$

Cómo último parámetro se utilizó el payback para conocer el periodo de tiempo en que la inversión retorna. Para ello se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Payback} = \frac{\text{Inversión}}{\text{Flujos de caja}}$$



## Capítulo 4: Resultados.

### 4.1 Descripción del producto/proceso.

Naturewaters Probiotics, “agua sana desde su captación”, es un producto biotecnológico de alta calidad en base a un consorcio de bacterias ácido lácticas, con propiedades probióticas, aisladas de cuerpos acuáticos superficiales como vertientes y esteros locales, que se encuentren en un estado de homeóstasis del medio abiótico y biótico, que contribuyan a cumplir requisitos de mejoras operacionales en una planta potabilizadora, ya que su aplicación en fuentes de agua abandonadas permitirá su reactivación y uso. Su aporte como innovación será su propia composición microbiana con más de  $10^7$  UFC, caracterizada por su capacidad abatidora de contaminantes en sistemas acuosos. La presentación de este producto será en formato de emulsión de 2 g/L de BAL, en envases de 1 L, 10 L y 230 L. Naturewaters Probiotics al ser un probiótico cuyo foco es la mejora del agua para potabilización contará con certificados de calidad y de inocuidad alimentaria de acuerdo con lo exigido por la Secretaría Regional Ministerial de Salud y certificación del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA).

Se desarrolló una imagen publicitaria (Figura 6.A), para presentaciones en empresas a través de pendones publicitarios como también se contará con un logotipo descriptivo (Figura 6.B), el cual entrega información sobre el origen del producto, cuyo objetivo es el establecimiento en el mercado sanitario.

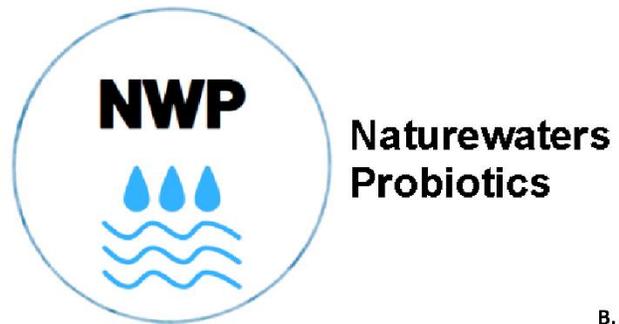
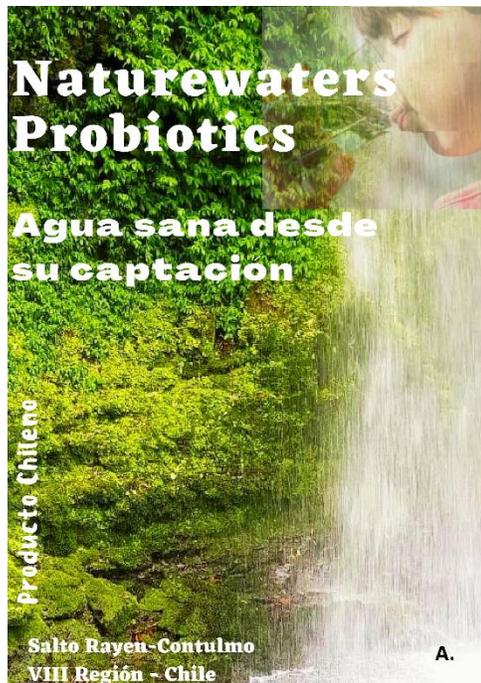


Figura 6: A, Imagen publicitaria. B, Logotipo de Naturewaters Probiotics.

Este producto es desarrollado para su aplicación al proceso de producción de agua potable en la etapa de captación, dosificándolo en estanques de almacenamiento de agua contaminada o aplicándolo directamente fuentes subterráneas, como pozos, sondajes o punteras, para lo cual se utilizarán los ductos pozométricos.

En estanques, la dosificación del producto debe ser antes de la etapa de oxidación y luego de su captación. El tiempo de contacto debe ser por lo menos 2 horas. Para llevar un control operacional de la remoción de los contaminantes se recomienda instalar una llave de muestreo antes de la entrada al estanque y en la salida del estanque a fin de registrar las concentraciones de entrada y de salida, para mayor control del cliente, y un sistema de purgado simple que conste de un sistema de evacuación de las partículas sedimentadas, para la eliminación de la biomasa muerta.



#### **4.2 Publicación formato “Review”.**

Como parte de esta tesis se realizó un artículo de revisión del estado del arte y bibliográfico actualizado, cuyo título es el siguiente “Potencial aplicación de bacterias ácido lácticas en sistemas de tratamiento de agua”, que trata los siguientes tópicos, (i) problema actual y medidas de tratamiento del agua a nivel latinoamericano, (ii) producción de agua potable y tratamiento de aguas residuales, (iii) mecanismo de biorremediación, como agente biotecnológico, (iv) comunidades bacterianas en sistemas dulceacuícolas, (v) bacterias ácido lácticas, de vida libre, remoción de analitos en sistemas acuosos, y sus propiedades probióticas y (vi) conclusiones, ¿qué se puede hacer?, ¿cómo utilizar las BAL y que beneficios tendría?. El artículo de revisión fue enviado a la revista Ecosistemas, revista científica de ecología y medio ambiente (España), la cual lo aprobó para publicación.

La referencia bibliográfica del artículo de revisión es la siguiente:

Balboa Luna, C., & Vergara Gonzalez, L. (2021). Potencial aplicación de bacterias ácido lácticas en sistemas de tratamiento de agua. *Ecosistemas*, 30(2), 2224. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2224>

#### **4.3 Identificación de competidores.**

La competencia directa estará dada por aquellas empresas biotecnológicas que investigan y desarrollan productos microbiológicos bacterianos para tratamiento de agua contaminada.

Actualmente a nivel nacional para el rubro del agua existe OIKOS Chile LTDA, que ofrece el producto OikoVersal AMB para biorremediación de agua residual y lodos industriales o sanitarios, utilizando cepas madres originarias de Estados Unidos de la compañía SCD Probiotics. Los ingredientes activos de este producto son microorganismos entre los cuales se encuentran *Lactobacillus plantarum*,

*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbruekii*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Rhodopseudomonas palustre* en concentración de  $10^6$  UFC/mL al 1%, además la solución posee 96% de agua y 3 % de melaza.

Como otra empresa competidora esta SCD Probiotics SCD la cual que desarrolla biotecnología innovadora, ecoamigable, y no contaminante con el medio ambiente. Posee productos patentados cuyo campo de aplicación es en plantas, animales y personas. Los probióticos son fabricados utilizando microorganismos beneficiosos ambientales mediante tecnologías de fermentación patentadas. Comercializa soluciones madres para la preparación de probióticos, dentro de las cuales se encuentra ProBio Balance - Probiotic Mother Culture - SCD Probiotics Original (concentrado de probióticos para preparación de inóculo para uso de suelo, aguas residuales y aplicaciones en agricultura) y ProBio Balance plus - ProBiotic Mother culture and soil inoculant - SCD Probiotics (concentrado líquido de microorganismos beneficiosos, que presenta niveles mejorados de bacterias púrpuras fototróficas)

A nivel europeo se encuentra Minnepura Co. empresa norteamericana, que comercializa enzimas bacterianas para remover ácido cianúrico y otros contaminantes del agua. Los microorganismos utilizados para la obtención de estas enzimas son, *Azorhizobium caulinodans*, *Sarocladium* sp, *Halanaerobium*, *Marinobacter*, *Oceanimonas*, *Streptohalobacillus*, *Thauera*, *Pseudomonas*, *Marinobacterium*, *Williamsia*, *Colwellia* y *Pseudomonas* sp NCIB 9816-4.

Microvi BioTech compañía norteamericana que desarrolla plantas abatidoras de nutrientes para agua residual y plantas de potabilización para contaminantes como nitratos, perclorados y solventes clorados, 1,4-dioxane, en base a biotecnologías, las cuales ocupan sustancias poliméricas y enzimas que se obtienen de microorganismos como microalgas; *Chlorophyceae*, *Cyanophyceae*, *Xanthophyceae*, *Chrysophyceae*, *Chlorella* (e.g., *Chlorella protothecoides*),



*Cryptocodinium*, *Schizocytrium*, *Nannochloropsis*, *Ulkenia*, *Dunaliella*, *Cyclotella*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Cyclotella*, *Phaeodactylum*, y *Thaustochytrids*; levaduras como *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Apiotrichum* y un consorcio bacteriano compuesto por: M-5 *Clostridium acetobutylicum* ATCC® 824™, M-6 *Clostridium pasteurianum* ATCC® 6013™, M-7 *Clostridium beijerinckii* ATCC® 10132™, M-8 *Clostridium butyricum* ATCC® 19398™, M-9 *Botryococcus braunii* UTEX 572™, M-10 *Botryococcus braunii* UTEX 2441™, M-11 *Botryococcus braunii* var. *Showa* UC Herbarium UC147504, M-12 *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391™, M-13 *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718™, M-14 *Nitrosomonas oceani* ATCC® 19707™, M-15 *Lactobacillus delbrueckii* ATCC® 9649™, M-16 *Lactobacillus casei* ATCC® 393™, M-17 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC® 19435™, M-18 *Lactobacillus amylovorus* ATCC® 33620™, M-19 *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048™, M-20 *Enterobacter cloacae* ATCC® 13047™, M-21 *Rhodobacter sphaeroides* ATCC® 17029™, M-22 *Pseudonocardia dioxanivarans* ATCC® 55486™, M-23 *Mycobacterium vaccae* ATCC® 15483™, M-24 *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC® 29305™, M-25 *Actinobacillus succinogenes* ATCC® 55618™, M-26 *Corynebacterium glutamicum* ATCC® 13032™, M-27 *Mannheimia succiniproducens* ATCC® 29305™, M-28 *Methanosarcina acetivorans* ATCC® 35395™, M-29 *Methanobrevibacter smithii* ATCC® 35061™, M-30 *Methanothermobacter thermautotrophicus* ATCC® 29096™, M-31 *Methanospirillum hungatei* ATCC® 27890™, M-32 *Methylosinus trichosporium* ATCC® 35070™, M-33 *Methylococcus capsulatus* ATCC® 19069™, M-34 *Pseudomonas syringae* ATCC® 19310™, M-35 *Pseudomonas* sp. ATCC® 13867™, M-36 *Achromobacter denitrificans* ATCC® 15173™, M-37 *Paracoccus denitrificans* ATCC® 17741™, M-38 *Dechloromonas agitata* ATCC® 700666™, M-39 *Dechloromonas aromatica* ATCC® BAA-1848™, M-40 *Rhodococcus* sp. ATCC® 55309™, M-41 *Rhodococcus* sp. ATCC® 21504™, M-42 *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC® 27774™, M-43 *Cyanothece* sp. ATCC® 51142™, M-44 *Synechocystis* sp. ATCC®

27184 <sup>TM</sup>, M-45 *Chlamydomonas reinhardtii* ATCC® 30483 <sup>TM</sup>, M-46 *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC® 23350 <sup>TM</sup>, M-47 *Citrobacter freundii* ATCC® 8090 <sup>TM</sup>, M-48 *Klebsiella pneumonia* ATCC® 25955 <sup>TM</sup>, M-49 *Bacillus selenitireducens* ATCC® 700615 <sup>TM</sup>, M-50 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC® 23270 <sup>TM</sup>, M-51 *Phanerochaete chrysosporium* ATCC® 24725 <sup>TM</sup>, M-52 *Escherichia coli* ATCC® 33456 <sup>TM</sup>, M-53 *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC® 23055 <sup>TM</sup>, M-54 *Variovorax paradoxus* ATCC® 17713 <sup>TM</sup>, M-55 *Paracoccus denitrificans* ATCC® 19367 <sup>TM</sup>.

Naturewaters Probiotics, presenta las siguientes ventajas competitivas respecto a nuestros competidores:

- I. El producto se enmarca en la implementación de una oportunidad de innovación tecnológica en el tratamiento del agua captada para potabilización, cambiando la forma de abatimiento de contaminantes a través del uso de un consorcio de bacterias probióticas, en donde la principal ventaja de las empresas que lo utilicen estará en la remoción de contaminantes en la captación del agua, entregando al sistema un agua más pura y de mejor calidad a las siguientes etapas del proceso de producción de agua potable.
- II. Los microorganismos aislados y seleccionados para formar parte del consorcio son sólo BAL, lo que diferencia a los probióticos distribuidos por OIKOS Chile LTDA o a los generados por SCD Probiotics.
- III. Las BAL que conforman el consorcio se aislarán desde cuerpos acuáticos locales, cuyas condiciones fisiológicas y metabólicas ya se han adaptado a la condición de escases de nutrientes, igualando a las fuentes de potabilización.
- IV. Es ecoamigable. La aplicación de bacterias beneficiosas no genera residuos. Según Ippolito et al (2011), indican que los procesos de tratamiento de agua que se utilizan para producir el agua potable genera una amplia variedad de productos



residuales dependiendo de la fuente de agua y los productos químicos utilizados para el tratamiento y desinfección. En el tratamiento convencional de agua potable (Coagulación-filtración) se generan sólidos en suspensión tipo sales de hierro, aluminio y partículas coloidales, este material suspendido y disuelto se elimina con trazas de coagulantes. En general estos residuos son eliminados a cuerpos receptores afectando la microfauna, insectos y animales; provocando efectos ambientales negativos.

- V. Evitará la precipitación de metales en las redes de conducción del agua. La aplicación de BAL en la etapa inicial del proceso de producción de agua potable, reducirá de manera significativa los contaminantes y por sobre todo la presencia de metales que pueden precipitar en las redes de distribución.
- VI. Disminuirá la adición de productos químicos abatidores de contaminantes del agua. Para el año 2019, en Chile el total de clientes regulados de servicios sanitarios fue de 5.615.104 clientes, en el cual el 4% del total de clientes corresponde a empresas menores, en éstas el costo anual por compra de sustancias oxidantes para la potabilización alcanza el valor de M\$ 52. La proposición de aplicación del consorcio de bacterias pretende disminuir estos costos solo en la compra de oxidantes.
- VII. Recuperará el uso de fuentes de contaminadas o saturadas evitando la construcción de nuevas obras lo que generará un ahorro significativo en el presupuesto asignado en la concesión sanitaria. Por otro lado, disminuirá los niveles de escaridad presentes en Chile, impidiendo el avance en la disminución de la disponibilidad de fuentes de agua debido a la construcción de nuevas obras de captación.

#### **4.5 Descripción de las etapas**

Las etapas a seguir para que el producto esté disponible en el mercado son los que se describen a continuación:

#### **4.5.1 Etapa negociación y comercialización.**

En esta etapa se definirán los contratos, licencias y paquetes tecnológicos para que Naturewaters Probiotics pueda ser transferido a los aliados estratégicos y se proceda a la industrialización y escalamiento del producto.

#### **4.5.2 Etapa Redefinición.**

Para garantizar que el producto se comercialice se realizará un producto mínimo viable (PMV), que básicamente será una versión más sencilla del producto para biorremediar aguas. En esta etapa se recogerán testimonios y retroalimentación de un grupo de usuario para definir la versión final del producto. Luego, se procederá con la industrialización, escalamiento, certificación de calidad e inocuidad alimentaria, pudiendo ser modificado por la empresa para su adaptación al mercado, se revisarán las normativas vigentes sobre la comercialización de los probióticos tanto en Europa y EEUU como en Chile.

#### **4.5.3 Etapa de ingeniería del producto.**

En esta etapa se realizará una revisión del diseño del producto, si es un producto atractivo para los clientes, si entrega confiabilidad y seguridad. También se procederá a mejoras en la realización de análisis de seguridad del producto. Además, en esta etapa se deberá realizar la búsqueda de proveedores y colaboradores.

#### **4.5.3 Etapa de verificación.**

Durante esta fase se procederá al testeo del producto-mercado, observando oportunidades y mejoras. Se robustecerá las especificaciones de industrialización en la cadena de suministro. Se realizarán sondeos de comercialización



#### **4.5.4 Etapa de desarrollo.**

En la etapa de desarrollo se hará una redefinición de los costos e inversión para su masificación, escalabilidad, sostenibilidad y sustentabilidad. Se diseñarán las campañas de marketing mencionadas en el numeral 3.4. Se podrá reacondicionar el producto y servicio de preventa y postventa.

#### **4.5.5 Etapa de aprovisionamiento.**

En esta fase se programará, (a) la adquisición de los materiales necesarios para la elaboración y comercialización del producto, (b) la gestión del almacenaje del consorcio, manteniendo los stocks mínimos de cada material, (c) el control de los inventarios y los costos asociados a los mismos.

#### **4.5.6 Etapa de finalización.**

Se realizarán los ajustes necesarios tanto al producto y su presentación final. Se implementará un soporte técnico de manera remota y por visitas a terreno a los clientes.

El tiempo estimado corresponden a un periodo de 8 meses desde la etapa de redefinición.

#### **4.5.7 Identificación del segmento.**

El mercado potencial para este proyecto de innovación son las empresas sanitarias y cooperativas de agua potable rural. A nivel local, en la Octava región existen 103 sistemas de producción de agua potable rural, que son administrados por cooperativas, además de dos empresas sanitarias ESSBIO S.A. y Aguas San Pedro S.A. que en conjunto suman 44 plantas de producción de agua potable. Por lo tanto, en la región existen 147 plantas de producción que pueden utilizar el producto, si bien no en todas las localidades existen contaminantes del tipo metales, si presentan interferentes coloidales o partículas en suspensión, que

generan desviaciones en el agua producida. En una mirada local, en la región del Bío Bío y región de Ñuble, ninguna planta posee tecnologías de tipo microbiológico. Las tecnologías que se utilizan para potabilizar agua son: adsorción, filtración, intercambio iónico y osmosis inversa. (Superintendencia de servicios sanitarios. 2018).

Se proyecta que, al cabo de dos años, y luego de haber realizado una integración tecnológica exitosa a la empresa, se amplíe el mercado objetivo hacia plantas de producción de las regiones Metropolitana, O'Higgins, Maule, Ñuble y Los Lagos, de las mismas sanitarias, ya que ESSBIO S.A. y Aguas San Pedro S.A poseen concesiones en las mencionadas regiones y utilizaríamos la experiencia de trabajo que ya fue conocida por las sanitarias.

Durante el 2019, a nivel nacional, la capacidad máxima de producción de agua potable fue de 101.827 litros por segundo, abarcando un universo de más de cinco millones de clientes residenciales (viviendas) en 399 localidades. La producción se encuentra dividida en un 55,06% que corresponde a fuentes de agua subterránea y el 44% a fuentes superficiales. El 1% restante corresponde a agua de mar. El total de producción de agua potable con respecto al 2018 aumento en un 2,93%, explicado fundamentalmente por el incremento de las fuentes subterráneas. La cobertura urbana de agua potable a nivel nacional en los territorios concesionados se mantiene por sobre el 99,9%. A nivel país, el total de captaciones explotadas son de 1709. Dado lo anterior es de gran relevancia producir agua potable, ya que es un elemento esencial para la vida, y ésta debe ser calidad cumpliendo con los estándares mínimos exigidos por la autoridad sanitaria.

Por otro lado, como potenciales clientes, están los sistemas de agua potable rural (APR), en la actualidad existen cerca de 1.897 sistemas de APR, emplazados a lo largo de todo el país, los cuales abastecen a más del 99% de la población de



zonas rurales concentradas, alcanzando a 1.740.639 habitantes. Sólo en la región del Bío Bío hay 103.840 beneficiarios.

#### **4.6 Identificación de dos o más empresas asociadas**

Las empresas asociadas al bionegocio Naturewaters Probiotics corresponden a:

- a) OIKOS Chile LTDA. Es una empresa nacional formada en marzo del 2007, que entrega un servicio de asesoría directa a productores y profesionales del mundo agrícola a fin de desarrollar un sistema conectado para el acondicionamiento de los suelos con el uso de nutrientes y bioestimulación a través de microorganismos. Posee 4 áreas, agrícola, forestal, ambiental y animal, en el área ambiental vende productos probióticos tales como, OIKOSVERSAL AMB, OIKOSVERSAL AG y OIKOSVERSAL PST para biorremediación de lodos y aguas residuales. EL 52% de sus importaciones corresponden a productos probióticos desde SCD PROBIOTICS y un 48% de caña de melaza, desde Estados Unidos y Paraguay respectivamente. En los últimos años el total de importaciones fue de US\$ 222,605. Sus distribuidores son TSGChile, empresa de mediciones odoríficas, Cooprisem, Comercial LLANCANAO y Hortisur, todas pertenecientes al área agrícola. De acuerdo con el producto que OIKOS Chile comercializa se considerará a esta empresa como entidad asociada, ya que han desarrollado la tecnología de fabricación de probióticos a granel para su posterior aplicación al medio ambiente, se contactará en la fase de desarrollo del consorcio. Una vez ya finalizado y probado el consorcio bacteriano en agua contaminadas se ofrecerá al producto obtenido para su posterior integración en la empresa a fin de que amplíen el espectro de mercado ofreciendo este consorcio para biorremediación de agua naturales contaminadas, lo que provocará un gran impacto en el mundo agrícola y sanitario, creando un nuevo nicho de negocio, para OIKOS Chile. Si bien en primera instancia esta empresa se reconoció como un competidor, se asociará como aliado estratégico a Naturewaters Probiotics.

b) Probionature LTDA es una empresa nacional, creada en 2009 como un spin-off de la Universidad de Concepción. Formada por investigadores con amplia experiencia en microbiología y química, que a partir de sus proyectos de investigación lograron el aislamiento de cepas probióticas desde fuentes autóctonas de Chile, con alto potencial de desempeño en distintas aplicaciones. La empresa cuenta con uso exclusivo en aplicaciones de probióticos patentadas y con diversos proyectos de I+D en desarrollo, que incluyen uso de probióticos en dispositivos médicos y biofármacos para humanos. Posee un total de ingresos de \$ US 1 millón. Esta empresa se contactará como aliado estratégico ya que posee la tecnología para el desarrollo de biomasa de manera industrial, siendo una empresa clave en el proyecto, entrará en este proyecto en la etapa de formulación del consorcio, entregando las cepas que conforman el consorcio comercializar de manera nacional.

c) SCD Probiotics es una empresa subsidiaria de Probiotics Holdings, desarrolla biotecnología innovadora, ecoamigable, y no contaminante con el medio ambiente. Posee productos patentados cuyo campo de aplicación es en plantas, animales y personas. Los probióticos son fabricados utilizando microorganismos beneficiosos ambientales mediante tecnologías de fermentación patentadas. SCD Probiotics ha invertido en la investigación y el desarrollo de bacterias beneficiosas desde 1998, ocupa el 1° lugar en Crunchbase Rank como empresa innovadora, durante el 2020 el ingreso fue de US\$ 20,8 millones. La asociación a esta compañía es clave ya que participaría activamente en el desarrollo del producto, utilizando su biotecnología para la producción de biomasa de bacterias ácido lácticas aisladas de agua natural desde cuerpos acuáticos nacionales, debido a que sus tecnologías ya que se encuentran estudiadas y probadas de manera exitosa además se añade el gran número de compañías distribuidoras a nivel mundial con un total de 55 empresas. Dentro de estas compañías se encuentra MesProbiotics, empresa española que comercializa probióticos a nivel europeo utilizando cepas madres provenientes de SCD Probiotics. Esto permitirá indirectamente que el consorcio nacional se conozca a nivel mundial, creando un



nuevo nicho de distribución que contara con una divulgación indirecta a través de sus proveedores y así se utilizaría el producto ofrecido para la biorremediación de un nuevo espectro de fuentes de captación para potabilización.

#### **4.7 Descripción de la estrategia de masificación.**

Se realizará una alianza estratégica entre la Universidad San Sebastián (USS) y la empresa Probionature LTDA, para la producción de biomasa del consorcio de probióticos. Su proceder se indica en la figura 7.

Probionature LTDA, brindara su experiencia en la producción de biomasa a escala industrial, apoyara en los ensayos de laboratorio y en el rediseño del producto, todo en conjunto con la USS. Por su parte la USS apoyara con su cuerpo de investigadores los que ayudarán en la estandarización, diseño y ensayos de laboratorio. Las pruebas de campo las realizará la USS con el apoyo de Probionature LTDA en lo que refiere a la composición del consorcio. Luego de obtenido el producto mínimo variable (PMV), durante la fase de redefinición, en la estrategia de masificación se realizarán los estudios de patentabilidad ante INAPI o bien se determinará por solicitar una PCT como estrategia de patentamiento. Los titulares estarán compuestos por la USS, y Probionature LTDA, para ello se establecerá un acuerdo mediante co-propiedad, que defina los porcentajes de participación, así como la administración y gestión que hacen referencia a dichos derechos y/o acuerdos contractuales.

También se desarrollarán licencias no exclusivas de las cuales se transferirán los derechos de hacer, usar, vender e importar, pero también se reserva el derecho a conceder licencias a otros; Las oficinas de transferencia y licenciamiento pertinentes de la USS-OTL, y si corresponde al área de patente de laboratorio Probionature LTDA, serán las encargadas de administrar y gestionar los derechos de propiedad intelectual tanto en Chile como en el extranjero.

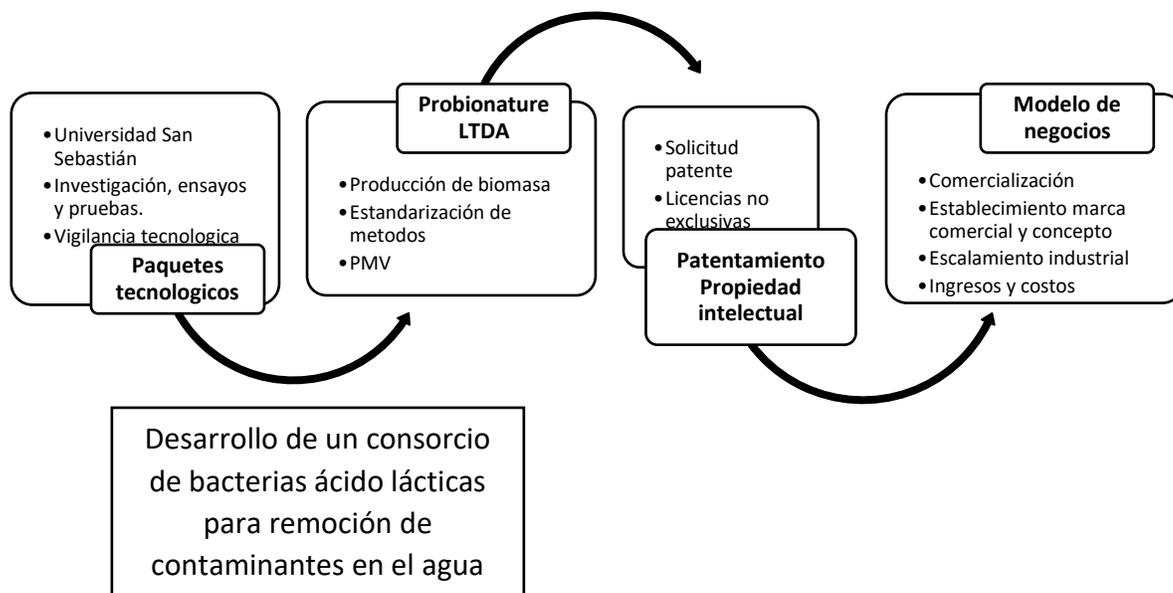


Figura 7: Modelo representativo de la transferencia tecnológica.

#### 4.8 Viabilidad económica.

La viabilidad financiera se verá a través del flujo de caja, reflejando los flujos de entrada como de salida, en un periodo de 5 años. Uno de los factores incidentes en el flujo es la inversión inicial, y la designación del precio del producto, su variabilidad temporal y proyección de venta.

##### 4.8.1 Inversión inicial.

Este bionegocio será llevado a cabo por el financiamiento con fondos gubernamentales a través de CORFO o proyectos FONDEFF, por lo cual para el año 0 y año 1 se dispondrá de los montos para dar inicio al proyecto, ubicado en la USS. Se consideró como inversión inicial la adquisición de insumos, materiales y equipos de terreno y de laboratorio que no se dispone, para luego pasarlos a costos variables. Por lo tanto, la inversión inicial para el desarrollo de Naturewaters Probiotcis, contempla los primeros recursos que se necesitan para dar inicio al bionegocio. Esta inversión contempla bienes a adquirir relacionados



con la primera etapa del proyecto y puesta en marcha siendo indicados en la **Tabla 7**.

**Tabla 7:** Inversión de bienes de capital físico.

INVERSIONES	
Bienes de capital físicos	\$ 11.139.500
Bienes de capital intangibles	\$ 640.000
Gastos de puesta en marcha	\$ 1.000.000

#### 4.8.2 Ingresos

Actualmente en Chile existe 53 empresas sanitarias que logran un abastecimiento de 99,7% de cobertura de servicios sanitarios, abarcando el año 2019 un total de más 16 millones de personas aproximadamente, el crecimiento por abastecimiento es de alrededor de 2,17% anual, y para el 2019 el consumo de agua potable fue de 162,5 L/habitante, de la cantidad de habitantes con servicios sanitarios se espera como mínimo un incremento del 0,6% anualmente, de acuerdo a la cobertura de servicios sanitarios, es decir 96.000 habitantes. Por otra parte, se espera que la demanda aumente un 35% con respecto al año anterior durante los 5 años de funcionamiento del proyecto y el precio del producto tenga un incremento del 5% anualmente. En la **Tabla 8** se muestran los ingresos esperados por cantidad vendida durante el funcionamiento del proyecto.

**Tabla 8:** Ingresos esperados del bionegocio en un plazo de 5 años.

Variable/Período	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Cantidad (L)	0	0	6.269	8.464	11.426	15.425
Precio (\$)	0	0	3.990	4.190	4.399	4.619
Total CLP (\$)	0	0	25.014.693	35.458.327	50.262.178	71.246.637

### 4.8.3 Flujo de caja

En la **Tabla 9** se muestra el flujo de caja correspondiente a los 5 años de funcionamiento del proyecto dando a conocer una proyección de la utilidad generada durante ese periodo de tiempo. Se proyecta un incremento de venta de la cantidad de producto a partir del segundo año de un 5%, por un periodo de 7 meses, con un acumulado anual de 35%, que se proyectó para los próximos 3 años. La variación anual del precio del producto es de 5%, fijando un precio inicial de \$3.990 para cada litro de producto. Se obtuvo un VAN (12%) de \$ 16.221.952 con un TIR de 21,1 %. El retorno sobre la inversión (ROI) al final del periodo fue de 383 %. El plazo de recuperación (*payback*) es a los 4,30 años.

**Tabla 9:** Flujo de caja con variación del precio de producto de 5% anual incremento de ventas en un 35% anual.

Items/ Años	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Ventas		0	25.014.693	35.458.327	50.262.178	71.246.637
<b>EGRESOS</b>						
(-) Costos Variables Producción		0	62.693	169.272	342.777	616.998
(-) Gastos Operacionales		6.740.000	9.681.700	9.681.700	9.681.700	9.681.700
(-) Gastos de Administración		8.100.000	7.800.000	7.800.000	7.800.000	7.800.000
(-) Gastos de Marketing		0	9.480.000	9.480.000	9.480.000	9.480.000
EBITDA		-14.840.000	-2.009.701	8.327.354	22.957.702	43.667.940
(-) Depreciación y Amortización		2.424.025	2.424.025	2.424.025	2.424.025	0
(-) Gastos financieros		0	124.000	124.000	124.000	124.000
(=) Utilidad antes de impuestos		-12.415.975	538.324	10.875.379	25.505.727	43.791.940
(-) Impuestos		0	80.749	1.631.307	3.825.859	6.568.791
(=) Utilidad neta (después de impuesto)		-12.415.975	457.575	9.244.072	21.679.868	37.223.149



(+) Depreciación y Amortización		2.424.025	2.424.025	2.424.025	2.424.025	0
Inversión	12.139.500	0	640.000	0	0	0
Capital de Trabajo	21.381.700					-21.381.700
<b>FLUJO NETO DE CAJA</b>	<b>-33.521.200</b>	<b>-9.991.950</b>	<b>2.241.600</b>	<b>11.668.097</b>	<b>24.103.893</b>	<b>58.604.849</b>

Adicionalmente, simulando un peor escenario (**Tabla 10**), se analizó un nuevo flujo de caja, el cual no incluyera la variación del precio del producto y que el aumento del volumen vendido alcance sólo el 10% anual, obteniendo un VAN (12%) de \$ -24.246.939 con un TIR de -5,06 %, ROI de 95 % y un *payback* a los 5,20 años.

**Tabla 10:** Flujo de caja sin variación del precio de producto, incremento de ventas en un 10% anual.

Items/ Años	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Ventas		0	22.430.730	24.673.803	27.141.183	29.855.301
<b>EGRESOS</b>						
(-) Costos Variables Producción		0	56.217	123.678	204.069	299.301
(-) Gastos Operacionales		6.740.000	9.681.700	9.681.700	9.681.700	9.681.700
(-) Gastos de Administración		8.100.000	7.800.000	7.800.000	7.800.000	7.800.000
(-) Gastos de Marketing		0	9.480.000	9.480.000	9.480.000	9.480.000
<b>EBITDA</b>		-14.840.000	-4.587.188	-2.411.576	-24.586	2.594.300
(-) Depreciación y Amortización		2.424.025	2.424.025	2.424.025	2.424.025	0
(-) Gastos financieros		0	124.000	124.000	124.000	124.000
<b>(=) Utilidad antes de impuestos</b>		-12.415.975	-2.039.163	136.449	2.523.439	2.718.300

<b>(-) Impuestos</b>		0	-305.874	20.467	378.516	407.745
<b>(=) Utilidad neta (después de impuesto)</b>		-12.415.975	-1.733.288	115.982	2.144.923	2.310.555
<b>(+) Depreciación y Amortización</b>		2.424.025	2.424.025	2.424.025	2.424.025	0
<b>Inversión</b>	12.139.500	0	640.000	0	0	0
<b>Capital de Trabajo</b>	21.381.700					-21.381.700
<b>FLUJO NETO DE CAJA</b>	-33.521.200	-9.991.950	50.737	2.540.007	4.568.948	23.692.255



## Capítulo 5: Conclusiones.

- a. Naturewaters Probiotics es un producto natural y biotecnológico que se utiliza para el reúso de fuentes de captación que se encuentran abandonadas o fuera de uso, mejorando la calidad fisicoquímica del agua para potabilización. Como consecuencia de su uso aporta a la disminución de productos oxidantes residuales en el agua potable lo que mejora la percepción de los usuarios, entregando confianza y seguridad en su uso. Industrialmente genera un gran impacto, disminuyendo significativamente el presupuesto para inversiones de prospección de nuevas fuentes de captación y construcción de nuevas obras de explotación de agua. Su etiquetado manifiesta la sostenibilidad y armonía del producto, transmitiendo este mensaje a los clientes, brindando una convicción en su adquisición.
- b. La diferencia fundamental y primordial de Naturewaters Probiotics, con los otros productos de consorcios bacterianos del mercado, es que esta desarrollado por una emulsión de BAL, debido a que su foco de aplicación es para agua de potabilización, que es clasificada como alimento y sólo se pueden utilizar bacterias aptas para aquello, y las BAL cumplen con este requerimiento debido a sus propiedades probióticas y no patogénicas.
- c. La vigilancia tecnológica arrojó patentes que realizan mejoramiento en agua residual, suelo y aguas naturales, sin embargo, algunos son consorcios de microorganismos de diversos grupos taxonómicos, y no específicos para hierro total, como es el caso del patentamiento que se realizará.
- d. Gracias a la implementación de la estrategia de posicionamiento por beneficios, se permitió establecer los beneficios exclusivos del producto Naturewaters Probiotics, y generar un acercamiento al cliente mediante el establecimiento del concepto “Agua sana desde su captación”, lo que favorece a su posicionamiento en el mercado.

- e. En los escenarios que se describen en los estudios de flujo de caja, Tabla 9 y Tabla 10, existe una clara evidencia de que el primer año de comercialización del probiótico es clave para el flujo económico, por tal motivo es que los gastos en marketing son primordiales durante la primera fase del proyecto en conjunto con una variación anual de precio, ambas variables convergen para que el proyecto presente una rentabilidad tal que permita un plazo de recuperación de la inversión de 4,30 años. En un escenario desfavorable, esto es, sin variación del precio y que el incremento de las ventas no alcance valores sobre el 10%, ambos factores impactarían considerablemente en el flujo económico, provocando una extensión en el plazo de recuperación de la inversión a 5,20 años lo que haría menos atractivo el bionegocio.
  
- f. Los procesos creativos poseen una gran relevancia para los bionegocios, entregando una linealidad y ordenamiento de las ideas y la relación con el cliente objetivo, como fue el caso de la utilización de la metodología del *Design Thinking* la que permitió incorporar el modelo de negocios Canvas y la transferencia tecnológica como estrategia de negocio.



## Capítulo 6: Referencias.

Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Wassie, M. (2017). The Role of Microorganisms in Bioremediation-A Review. *Open Journal of Environmental Biology*, 2(1), 38-46. <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>

Abu Hasan, H., Muhammad, M.H., & Ismail, N. I. (2020). A review of biological drinking water treatment technologies for contaminants removal from polluted water resources. *Journal of Water Process Engineering*, 33, 101035. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.101035>

Alluri, H., Ronda, S., Settalluri, V., Bondili, J., Suryanarayana, V., & Venkateshwar, P. (2007). Biosorption: An Eco-Friendly Alternative for Heavy Metal Removal. *African Journal of Biotechnology*, 6(25), 2924-2931. <https://doi.org/10.4314/ajb.v6i25.58244>

Alvarez, A., & Polti, M. (2014). *Bioremediation in Latin America. Current Research and Perspectives*. Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-05738-5>

Ameen, F.A., Hamdan, A.M., & El-Naggar, M.Y. (2020). Assessment of the heavy metal bioremediation efficiency of the novel marine lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* MF042018. *Scientific Reports*, 10, 314. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57210-3>

Barcina, I., Lebaron, P., & Vives-Rego, J. (2006). Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiol Ecol*, 23, 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00385.x>

Bhakta, J., Ohnishi, K., Munekage, Y., & Iwasaki, K. (2010). Isolation and probiotic characterization of arsenic-resistant lactic acid bacteria for uptaking arsenic. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 71, 470-477.

Bhakta, J., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K., & Wei, M. (2012). Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal

sorbents. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 1193-1206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05284.x>

Bitton, G. (2014). *Microbiological Aspects of Drinking Water Treatment*. pp. 29-64. <https://doi.org/10.1002/9781118743942.ch2>

Briceño, G., Tortella, G., Rubilar, O., Palma, G., & Diez, M.C. (2014). Advances in Chile for the Treatment of Pesticide Residues: Biobeds Technology. En: A. Alvarez, M.A. Polti (eds.), *Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives*, pp 53-68. Springer International Publishing Switzerland.

Brown, J., Summers, R., Lechevallier, M., Collins, H., Roberson, A., Hubbs, S., & Dickenson, E. (2015). Biological Drinking Water Treatment? Naturally. *Journal - American Water Works Association*, 107, 20-30. <https://doi.org/10.5942/jawwa.2015.107.0183>

Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., & Harwood, V.J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76, 685-706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>

Chaudhary, D.S., Vigneswaran, S., Ngo, H.H., Geun-Shim, W., & Moon, H. (2003). Biofilter in water and wastewater treatment. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 20, 1054-1065. <https://doi.org/10.1007/BF02706936>

Chawla C, Zwijnenburg A, Kemperman AJB, & Nijmeijer K. (2017). Fouling in gravity driven point of use drinking water treatment systems. *Chemical Engineering Journal*, 319, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.120>.

Cheng, J. (2014). Bioremediation of Contaminated Water-Based on Various Technologies. *Open Access Library PrePrints*, 01, 1-13. <https://doi.org/10.4236/oalib.preprints.1200056>

Chojnacka, K. (2010). Biosorption and bioaccumulation - The prospects for practical applications. *Environment International*, 36(3), 299-307. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.12.001>



Chowdhury, S., Mazumder, M.A. J., Al-Attas, O., & Husain, T. (2016). Heavy metals in drinking water: Occurrences, implications, and future needs in developing countries. *Science of The Total Environment*, 569-570, 476-488. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.166>

Clasen, T., & Edmondson, P. (2006). Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209(2), 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.11.004>

Copaja, S.V., Nuñez, V.R., Muñoz, G.S., González, G.L., Vila, I., & Véliz, D. (2016). Heavy metal concentrations in water and sediments from affluents and effluents of mediterranean chilean reservoirs. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 61(1), 2797-2804. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072016000100011>

Dai, Q., Bian, X., Li, R., Jiang, C., Ge, J., Li, B., & Ou, J. (2019). Biosorption of lead (II) from aqueous solution by lactic acid bacteria. *Water Science and Technology*, 79(4), 627-634. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.082>

Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E., & Braun, R. (2003). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 562-567. <https://doi.org/10.1128/aem.69.1.562-567.2003>

Duar, R., Lin, X., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Perez-Munoz, M., Leulier, F., & Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: Evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux030>

Dzionic, A., Wojcieszynska, D., & Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.003>

Elsanhoty, R.M., Al-Turki, I.A., & Ramadan, M.F. (2016). Application of lactic acid bacteria in removing heavy metals and aflatoxin B1 from contaminated water.

*Water Science and Technology*, 74(3), 625-638.  
<https://doi.org/10.2166/wst.2016.255>

Farhaoui, M., & Derraz, M. (2016). Review on Optimization of Drinking Water Treatment Process. *Journal of Water Resource and Protection*, 8, 777-786.  
<https://doi.org/10.4236/jwarp.2016.88063>

Fontán-Sainz, M., Gómez-Couso, H., Fernández-Ibáñez, P., & Ares-Mazás, E. (2012). Evaluation of the solar water disinfection process (SODIS) against *Cryptosporidium parvum* using a 25-L static solar reactor fitted with a compound parabolic collector (CPC). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(2), 223-228. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0325>

Fowler, S.J., & Smets, B.F. (2017). Microbial biotechnologies for potable water production. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1094-1097.  
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12837>

Franzmann, P.D., Höpfl, P., Weiss, N., & Tindall, B.J. (1991). Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. Nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. Nov. *Archives of Microbiology*, 156(4), 255-262. <https://doi.org/10.1007/BF00262994>

Gänzle, M.G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>

Garzón, J., Rodríguez, J., & Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y Salud*, 19(2), 309-318. <https://doi.org/10.22267/rus.171902.93>

George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F.J., Revol-Junelles, A.M., Borges, F., & Foligné, B. (2018). Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-15.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02899>



Gilbert. J. (1994). Basic attributes of groundwater ecosystems and prospects for research. *Groundwater Ecology*. Eds. Gilbert, J. A. Stanford y D. L. Danielopol. Academic press, San Diego, CA. 571 pp.

Gold, T. (1992). The Deep, hot biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 6045 – 6049.

González, C.J., López-Díaz, T.M., García-López, M.L., Prieto, M., & Otero, A. (1999). Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Food Protection*, 62(11), 1270-1277. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.11.1270>

Griebler, C., & Lueders, T. (2009). Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 54, 649-677. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2427.2008.02013.X>

Gulay A, Tatari K, Musovic S, Mateiu RV, Albrechtsen HJ, & Smets B. (2014). Internal porosity of mineral coating supports microbial activity in rapid sand filters for groundwater treatment. *Appl. Environ. Microbiol*, 80, 7010 – 7020.

Gupta, P., & Diwan, B. (2017). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13, 58-71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>

Halttunen, T., Salminen, S., & Tahvonon, R. (2007). Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040>

Halttunen, T., Collado, M.C., El-Nezami, H., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2), 160-165. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02276.x>

Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Köster, O., & Egli, T. (2008). Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter

for drinking water treatment processes. *Water Research*, 42(1), 269-277.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.009>

Hammes, F., Velten, S., Egli, T., & Juhna, T. (2011). Biotreatment of Drinking Water. En: M. Moo-Young (eds.), *Comprehensive Biotechnology*. pp. 517-530.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00386-X>

Hartke, A., Giard, J.C., Laplace, J.M., & Auffray, Y. (1998). Survival of *Enterococcus faecalis* in an Oligotrophic Microcosm: Changes in Morphology, Development of General Stress Resistance, and Analysis of Protein Synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4238-4245.

Hernández-Padilla, F., Margni, M., Noyola, A., Guereca-Hernandez, L., & Bulle, C. (2017). Assessing wastewater treatment in Latin America and the Caribbean: Enhancing life cycle assessment interpretation by regionalization and impact assessment sensibility. *Journal of Cleaner Production*, 142, 2140-2153.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.11.068>

Huët, M.A.L., & Puchooa, D. (2017). Bioremediation of heavy metals from aquatic environment through microbial processes: A potential role for probiotics? *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 5, 14-23.  
<https://doi.org/10.7324/JABB.2017.50603>

Ippolito, J. A., Barbarick, K. A., & Elliott, H. A. (2011). Drinking water treatment residuals: A review of recent uses. *Journal of Environmental Quality*, 40(1), 1-12.  
<https://doi.org/10.2134/jeq2010.0242>

Jaafar, R., Pentosaceus, P., & Raghad, J. (2020). Bioremediation of lead and cadmium and the strive role of *Pediococcus pentosaceus* probiotic. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 34, 51-57.  
<https://doi.org/10.33899/ijvs.2019.125581.1092>

Kaczorek, E., Chrzanowski, L., Pijanowska, A., & Olszanowski, A. (2008). Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipides and saponins. *Bioresource Technology*, 99, 4285-4291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.049>



Kalinowska, A., Jankowska, K., Fudala-Ksiazek, S., Pierpaoli, M., & Luczkiewicz, A. (2021). The microbial community, its biochemical potential, and the antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. in Arctic lakes under natural and anthropogenic impact (West Spitsbergen). *Science of The Total Environment*, 763,142998. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142998>

Kallmeyer, J., R. Pockalny, RR. Adhikari, DC. Smith & S. D`Hondt. (2012). Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 109, 16213 – 16216.

Kargar, S., Hadizadeh & Shirazi, N. (2020). *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum* bioremediation ability assessment for copper and zinc. *Archives of Microbiology*, 202(4), 1957–1963. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01916-w>

Kirillova, A., Danilushkina, A., Irisov, D., Bruslik, N., Fakhrullin, R., Zakharov, Y., Bukhmin, V., & Yarullina, D. (2017). Assessment of resistance and bioremediation ability of *Lactobacillus* strains to Lead and Cadmium. *International Journal of Microbiology*, 2017(4), 1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/9869145>

Kot, E., Furmanov, S., & Bezkorovainy, A. (1995). Accumulation of Iron in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Journal of Food Science*, 60(3), 547-550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb09823.x>

Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., & Uchiyama, H. (2008). Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 381-386. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.381>

Lautenschlager, K., Hwang, C., Ling, F., Liu, W.T., Boon, N., Köster, O., Egli, T., & Hammes, F. (2014). Abundance and composition of indigenous bacterial communities in a multi-step biofiltration-based drinking water treatment plant. *Water Research*, 62, 40-52. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.035>

Lauzon, H. L., & Ringø, E. (2011). Prevalence and Application of Lactic Acid Bacteria in Aquatic Environments. En *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and*

Functional Aspects, Fourth Edition. pp. 593-631. <https://doi.org/10.1201/b11503-29>

Li, B., Jin, D., Yu, S., Evivie, S., Muhammad, Z., Huo, G., & Liu, F. (2017). In vitro and in vivo evaluation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KLDS1.0207 for the alleviative effect on Lead toxicity. *Nutrients*, 9(8),: 845. <https://doi.org/10.3390/nu9080845>

Liu, S., Gunawan, C., Barraud, N., Rice, S., Harry, E., & Amal, R. (2016). Understanding, Monitoring and Controlling Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems. *Environmental Science and Technology*, 50(17), 8954-8976. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00835>

Lin, B., Braster, M., van Breukelen, B. M., van Verseveld, H. W., Westerhoff, H. W., & Röling, W. F. M. (2005). Geobacteraceae community composition is related to hydrochemistry and biodegradation in an iron-reducing aquifer polluted by a neighboring landfill. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5983 – 5991.

Lindström, E.S., & Östman, Ö. (2011). The Importance of Dispersal for Bacterial Community Composition and Functioning. *PLoS ONE*, 6(10), e25883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025883>

Llorca, M., Farré, M., Eljarrat, E., Díaz-Cruz, S., Rodríguez-Mozaz, S., Wunderlin, D., & Barcelo, D. (2016). Review of emerging contaminants in aquatic biota from Latin America: 2002-2016. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(7), 1716-1727. <https://doi.org/10.1002/etc.3626>

Madsen, E. I. & Ghiorse, W. C. (1993). Groundwater microbiology: subsurface ecosystem processes. *In: Aquatic Microbiology - An Ecology Approach*. Ed. T. E. Ford. Blackwell Scientific Publication. 167 – 213 pp.

Majkić-Dursun, B., A. Petković., & M. Dimkić. (2015). The effect of iron oxidation in the groundwater of the alluvial aquifer of the Velika Morava River, Serbia, on the clogging of water supply wells. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 80(7), 947–957. <https://doi.org/10.2298/JSC140204089M>



Mañes-Lázaro, R., Song, J., Pardo, I., Cho, J.C., & Ferrer, S. (2009). *Lactobacillus aquaticus* sp. Nov., isolated from a Korean freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2215-2218. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.008276-0>

Martino, M.E., Bayjanov, J.R., Caffrey, B.E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., van Hijum, S.A.F.T., & Leulier, F. (2016). Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4974-4989. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13455>

Meril, D., Aanand, S., Srinivasan, A., & Ahilan, B. (2015). Bioremediation – An eco-friendly tool for effluent treatment: A Review. *International Journal of Applied Research*, 1, 530-537.

Milanowski, M., Pomastowski, P., Railean-Plugaru, V., Rafińska, K., Ligor, T., & Buszewski, B. (2017). Biosorption of silver cations onto *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus casei* isolated from dairy products. *PloS ONE*, 12(3), e0174521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174521>

Monachese, M., Burton, J.P., & Reid, G. (2012). Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes: A Potential Role for Probiotics? *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6397-6404. <https://doi.org/10.1128/AEM.01665-12>

Morgan, B., & Lahav, O. (2007). The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O<sup>2</sup> in aqueous solution - basic principles and a simple heuristic description. *Chemosphere*, 68 (11), 2080-2084.

Mörschbacher, A.P., Dullius, A., Dullius, C.H., Brandt, C.R., Kuhn, D., Brietzke, D.T., José Malmann Kuffel, F., Etgeton, H.P., Altmayer, T., Gonçalves, T.E., Schweizer, Y.A., Oreste, E.Q., Ribeiro, A.S., Lehn, D.N., Volken de Souza, C.F., & Hoehne, L. (2018). Assessment of selenium bioaccumulation in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 10626-10635. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14852>

McMahon, S., & Parnell, J. (2014). Weighing the Deep continental biosphere. *FEMS Microbiol Ecol*, 87, 113 – 120.

Mrvčić, J., Prebeg, T., Barišić, L., Stanzer, D., Bačun-Družina, V., & Stehlik-Tomas, V. (2009). Zinc binding by lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 47(4), 381-388.

Mrvčić, J., Stanzer, D., Solić, E., & Stehlik-Tomas, V. (2012). Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: Opportunities for improving food safety and quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2771-2782. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1094-2>

Mwirichia, R., Muigai, A., Tindall, B., Boga, H., & Stackebrandt, E. (2010). Isolation and characterization of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya. *Extremophiles*, 14, 339-348. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0311-x>

Nanda, M., Kumar, V., & Sharma, D.K. (2019). Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to 'clean-up' heavy metal contaminants from water. *Aquatic Toxicology*, 212, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.011>

Nitzsche, K.S., Lan, V.M., Trang, P.T.K., Viet, P.H., Berg, M., Voegelin, A., Planer-Friedrich, B., Zahoransky, J., Müller, S.K., Byrne, J.M., Schröder, C., Behrens, S., & Kappler, A. (2015). Arsenic removal from drinking water by a household sand filter in Vietnam-Effect of filter usage practices on arsenic removal efficiency and microbiological water quality. *Science of the Total Environment*, 502, 526-536. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.055>

Obuekwe, C.O., Al-Jadi, Z.K., & Al-Saleh, E.S. (2009). Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(3), 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.10.004>

Ortiz-Hernández, M.L., Rodríguez, A., Sánchez-Salinas, E., & Castrejón-Godínez, M.L. (2014). Bioremediation of Soils Contaminated with Pesticides:



Experiences in Mexico. En: A. Alvarez, M.A. Polti (eds.), *Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives*, pp. 69-100. Springer International Publishing Switzerland.

Patel, R. J., & Chandel, M. (2015). Effect of pH and temperature on the biosorption of heavy metals by *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Science and Research*, 4, 2272-2275.

Patel, A., SV, A., Shah, N., & Verma, D. (2018). Lactic acid bacteria as metal quenchers to improve food safety and quality. *Agrolife Scientific Journal*, 6(2), 146-154.

Pinto, A., Xi, C., & Raskin, L. (2012). Bacterial Community Structure in the Drinking Water Microbiome Is Governed by Filtration Processes. *Environmental Science and Technology*. 46(16): 8851-8859. <https://doi.org/10.1021/es302042t>

Phaiboun, A., Zhang, Y., Park, B., & Kim, M. (2015). Survival Kinetics of Starving Bacteria Is Biphasic and Density-Dependent. *PLoS Computational Biology*, 11(4), e1004198. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004198>

Plappally, A., & Lienhard, V, J. (2012). Costs for water supply, treatment, end-use and reclamation. *Desalination and water treatment - desalin water treat*, 51, 1-33. <https://doi.org/10.1080/19443994.2012.708996>

Pugazhenthiran, N., Anandan, S., & Ashokkumar, M. (2016). Removal of Heavy Metal from Wastewater. En: Ashokkumar, M. (eds.), *Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry* pp. 813-839. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-287-278-4\\_58](https://doi.org/10.1007/978-981-287-278-4_58)

Rawat AP, Giri K, & Rai JPN. (2014). Biosorption kinetics of heavy metals by leaf biomass of *Jatropha curcas* in single and multi-metal system. *Environ Monit Assess*, 186, 1679–1687. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3485-8>

Ren, D., & Smith, J.A. (2013). Retention and transport of silver nanoparticles in a ceramic porous medium used for point-of-use water treatment. *Environmental Science and Technology*, 47(8), 3825-3832. <https://doi.org/10.1021/es4000752>

Ridolfi, A.S., Álvarez, G.B., & Rodríguez-Girault M. E. (2014). Organochlorinated Contaminants in General Population of Argentina and Other Latin American Countries. En: A. Alvarez, M.A. Polti (eds.), *Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives*, pp 17-40. Springer International Publishing Switzerland.

Rosa, G., Miller, L., & Clasen, T. (2010). Microbiological Effectiveness of Disinfecting Water by Boiling in Rural Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 473-477. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0320>

Saheh. S.K., & Ahmaed, A.S. (2020). Removal of some heavy metal from aqueous solutions by lactic acid bacteria (whole bacteria and biofilm). *Plant Archives*, 20(2), 4105-4108.

Salman, A., & Ahmaed, A.S. (2019). Removal of lead from aqueous solutions using the biofilm formed by *Leuconostoc mesentroides* and *Lactobacillus casei*. *Plant Archives*, 19(2), 1751-1755.

Saratale, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S., & Govindwar, S.P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138-157. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.06.006>

Singh, A., & Sarma, P. (2010). Removal of Arsenic (III) from waste water using *Lactobacillus acidophilus*. *Bioremediation Journal*, 14, 92-97. <https://doi.org/10.1080/10889861003767050>

Siezen, R.J., & van Hylckama Vlieg, J.E.T. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories*, 10, S3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S3>

Sode, S., Bruhn, A., Balsby, T.J.S., Larsen, M.M., Gotfredsen, A., & Rasmussen, M.B. (2013). Bioremediation of reject water from anaerobically digested wastewater sludge with macroalgae (*Ulva lactuca*, Chlorophyta). *Bioresource Technology*, 146, 426-435. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.062>



Sofu, A., Sayilgan, E., & Guney, G. (2015). Experimental design for removal of Fe (II) and Zn (II) ions by different lactic acid bacteria biomasses. *International Journal of Environmental Research*, 9, 93-100.

Stauber, C., Printy, E., Mccarty, F.A., Liang, K., & Sobsey, M. (2012). Cluster randomized controlled trial of the plastic biosand water filter in Cambodia. *Environmental Science and Technology*, 46, 722-728. <https://doi.org/10.1021/es203114q>

Superintendencia de Servicios Sanitarios. (2018). Centro de documentación: Informes sector sanitario, infografías. Agua Potable. <https://www.siss.gob.cl/586/w3-channel.html>

Tang, H., & Chen, H. (2015). Nitrification at full-scale municipal wastewater treatment plants: Evaluation of inhibition and bioaugmentation of nitrifiers. *Bioresource Technology*, 190, 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.063>

Tannock, G. (2004). A Special Fondness for Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3189-3194. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3189-3194.2004>

Torres, S., Pandey, A., & Castro, G.R. (2011). Organic solvent adaptation of Gram positive bacteria: Applications and biotechnological potentials. *Biotechnology Advances*, 29(4), 442-452. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.002>

Treacy, J. (2019). Drinking water treatment and challenges in developing countries En: Potgieter, N., Traore, A.N. (eds.), *The relevance of hygiene to health in developing countries*. UK. Intechopen online <https://www.intechopen.com/books/the-relevance-of-hygiene-to-health-in-developing-countries>

Walter, J. (2008). Ecological role of Lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 4985-4996. <https://doi.org/10.1128/AEM.00753-08>

Whitman W. B., Coleman D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 6578 – 6583. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>

Wu, X., Holmfeldt, K., Hubalek, V., Lundin, D., & Aström, M. (2016). Microbial metagenomes from three aquifers in the Fennoscandian shield terrestrial deep biosphere reveal metabolic partitioning among populations. *ISME J* 10, 1192–1203. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.185>

Yanagida, F., Chen, Y.S., & Yasaki, M. (2007). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from lakes. *Journal of Basic Microbiology*, 47, 184-190. <https://doi.org/10.1002/jobm.200610237>

Yilmaz, M., Tay, T., Kivanc, M., & Turk, H. (2010). Removal of copper (II) ions from aqueous solution by a lactic acid bacterium. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(2), 309-314.

Zheng, J., Ruan, L., Sun, M., & Gänzle, M. (2015). A genomic view of Lactobacilli and Pediococci demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7233-7243. <https://doi.org/10.1128/AEM.02116-15>